

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

SÒNIA LÓPEZ MORENO

Tesi Doctoral

1. INTRODUCCIÓ

1.1. EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (VIH)

1.1.1. Inicis de la sida i descobriment del VIH

El 1981 es van detectar als Estats Units els primers casos de pacients infectats pel virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1) (Gottlieb MS, N Engl J Med 1981). En aquell moment es desconeixia per complet la naturalesa vírica de la simptomatologia que presentaven els individus afectats. Els pacients eren homes joves, homosexuals que presentaven un quadre clínic similar: sarcoma de Kaposi, infeccions oportunistes (p.e. pneumònia causada per *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*) i/o limfadenopaties (Centers for Disease Control (CDC), MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981). Tots ells compartien com a característica comuna un dèficit adquirit de la immunitat cel·lular, principalment una depleció de limfòcits T CD4⁺, que sovint conduïa a la mort del pacient en qüestió de pocs anys (Masur H, N Engl J Med 1981). El conjunt de la malaltia es va descriure com la síndrome de la immunodeficiència adquirida (sida). Inicialment, l'afectació de la síndrome es va limitar a la comunitat homosexual, però no va trigar en expandir-se a altres grups socials, com prostitutes, drogaaddictes, hemofílics, receptors de transfusions sanguínies i nens nascuts de mares infectades. La descripció dels grups de risc va suggerir que l'origen de la malaltia era un agent infecció de transmissió sexual o sanguínia (Francis DP, J Natl Cancer Inst 1983). La sida s'anava expandint arreu del món a un ritme tan accelerat que no va trigar en ser qualificada d'epidèmia mundial. Davant aquesta situació, la comunitat científica va dedicar els seus esforços inicials, bàsicament, en determinar la causa de la sida. En aquest context, estudis d'epidemiologia i immunopatogènesi van suggerir que l'agent infecció causant de la sida era un retrovirus (Montagnier L, Science 2002) (Gallo RC, Science 2002) (Gallo RC, Science 2002).

El 1983, el VIH-1 va ser identificat com el retrovirus causant de la sida pel grup d'investigació francès liderat per Luc Montagnier a l'Institut *Pasteur* de París (Barre-Sinoussi F, Science 1983). El 1984, Robert Gallo i els seus col·laboradors del *U.S. National Institutes of Health* als Estats Units van proporcionar més evidències científiques convincents de que la infecció pel VIH era la causa de la sida. Aquest gran descobriment va ser possible gràcies a avenços científics previs, basats en investigacions sobre el desenvolupament de tumors causats per retrovirus, que es van iniciar a la dècada del 1960. En primer lloc, el descobriment per H.M. Temin (Temin HM, Nature 1970) i D. Baltimore (Baltimore D, Nature 1970) l'any 1970 de l'enzim transcriptasa inversa (TI), responsable de la replicació de tots els retrovirus, va permetre al grup de R. Gallo el desenvolupament de tècniques prou sensibles per detectar el virus en cultius cel·lulars. Paral·lelament, el mateix grup va descobrir la interleuquina-2, o 'factor de creixement de les cèl·lules T', que va permetre la propagació del virus en una línia cel·lular

de limfocits T procedent de pacients amb càncer. D'altra banda, el grup de L. Montagnier va demostrar que l'interferó endògen que produïen els tumors inhibia l'expressió dels retrovirus i, per tant, per la detecció del virus en cultius cel·lulars calia la utilització d'antisèrum contra l'interferó. El desenvolupament de les tècniques de cultiu cel·lular, que possibilitaven el creixement de limfòcits T i la propagació dels retrovirus, van conduir el 1979 per part del grup de R. Gallo, a la identificació del primer retrovirus humà que causava leucèmia de cèl·lules T (HTLV-1). Tres anys després el mateix grup va identificar el HTLV-2. Inicialment, es va pensar que el virus causant de la sida pertanyia a la família dels HTLV, i el van anomenar HTLV-III, ja que presentaven un patró de transmissió similar i tots dos infectaven preferentment limfòcits T CD4⁺, produint depressió de la immunitat cel·lular, però estudis moleculars i de microscopia electrònica confirmaren que es tractava d'un retrovirus diferent, que pertanyia al gènere lentivirus. El conjunt d'aquests descobriments científics van constituir les eines bàsiques per la identificació del VIH com a causant de la sida.

El 1984 el virus fou aïllat de forma independent per Jay Levy a la Universitat de Califòrnia, San Francisco. Va demostrar la presència del VIH en pacients amb sida i en individus asimptomàtics procedents de grups de risc (Levy JA, Science 1984) D'aquesta manera, es va determinar que l'exposició a l'agent infeccios ve seguida d'un període d'incubació del virus, en l'individu afecte, de mesos o inclús anys abans que es manifestin els símptomes clínics de la sida.

El 1985 es va desenvolupar un test per detectar anticossos contra el VIH en mostres de sang (Weiss SH, JAMA 1985) (Sarngadharan MG, Science 1984) (Safai B, Lancet 1984). Aquest avanç tecnològic, sens dubte va marcar un abans i un després en la història de la sida, doncs no només va permetre confirmar la presència del VIH en pacients amb sida, sinó que també va contribuir a prevenir milions de noves infeccions a través de transfusions de sang i a detectar el virus durant la fase asimptomàtica de la malaltia. Els drets per la patent del test sanguini i el reconeixement de la paternitat del descobriment del VIH va generar disputes entre els Estats Units i França i, temporalment, suscità desacords entre els principals científics implicats.

A banda de les disputes per la patent científica, el conjunt d'investigadors van ser capaços d'identificar el virus causant de la sida només uns dos anys després que saltés l'alarma social, i a més, tan sols dos anys més tard d'aquest descobriment ja es disposava d'un test sanguini fiable i específic per a la seva detecció. Això cal considerar-ho, doncs, un èxit sense precedents en la història de la Medicina.

El 1986 es va aïllar el VIH-2 a partir de pacients de l'oest d'Àfrica. El VIH-2 és una variant del VIH-1 que també causa la sida però la seva transmissió és més difícil i causa la malaltia

amb menor freqüència i menor virulència que el VIH-1. Un any més tard es va introduir la zidovudina (AZT), com el primer fàrmac antiretroviral (ARV) contra la infecció pel VIH, que bloquejava l'activitat de la TI del virus, evitant així, la seva replicació.

Ara ja fa més de 20 anys que es va identificar el VIH com l'agent infecció causant de la sida i, des d'aleshores, els esforços dels investigadors per controlar la infecció no han fet sinó créixer i el coneixement de la patogènia del virus ha contribuït al desenvolupament de teràpies que actuen en punts clau del cicle vital del VIH.

1.1.1.1. Origen del VIH

El coneixement de la procedència exacta del VIH pot resultar un element clau pel desenvolupament d'una vacuna i de tractaments més eficaços. Actualment, existeixen evidències científiques que el VIH procedeix d'un virus que causa immunodeficiència en simis africans (Gao F, Nature 1999), però l'origen exacte del VIH no es coneix.

El material genètic del VIH presenta gran homologia de seqüència amb el virus de la immunodeficiència dels simis (VIS), una família de virus que afecta a micos del centre d'Àfrica, on també es van començar a identificar casos de sida des de l'inici de l'aparició de la malaltia. Donada aquesta similitud entre les dues famílies víriques, actualment es considera que el VIH descendeix del VIS. El VIS és molt freqüent entre els micos d'Àfrica Central, i no provoca la mort de l'hoste infectat. Sembla ser que els ximpanzés en estat salvatge que habitaven aquesta zona s'alimentaven de dues espècies de micos diferents, cada un dels quals era infectat per un VIS similar. Es creu que els ximpanzés van ser co-infectats de forma quasi simultània pels dos tipus de VIS i, l'intercanvi genètic d'aquests dos virus als ximpanzés va donar lloc a un nou tipus de virus capaç d'infectar als humans. S'hipotetitzava que la transmissió del virus a l'espècie humana es va produir pel contacte dels humans amb la sang infectada dels ximpanzés, a través de la caça habitual d'aquests animals destinats al consum humà.

Donat que el primer cas documentat d'una mostra infectada pel VIH data del 1959, procedent d'un pacient de l'Àfrica central (mostra de sang d'un estudi de l'època, analitzada el 1998), i tenint en compte la taxa de mutació dels virus d'immunodeficiència coneguts, els científics estimen que el VIH es va transmetre als humans cap el 1930 i que, probablement els principals subtipus del VIH es van desenvolupar a l'espècie humana a partir d'un ancestre comú del VIH i no a partir de diferents variants del VIS dels simis (Cohen J, Science 2000) (Hooper E, Science 2000).

1.1.2. Característiques principals i estructura del VIH

El VIH és un retrovirus animal, del gènere lentivirus, que infecta principalment als limfòcits T CD4⁺ i macròfags de l'espècie humana, amb l'objectiu de replicar-se i completar el seu cicle vital.

El VIH pot entrar a l'organisme per qualsevol de les tres vies principals de transmissió que es coneixen:

- transmissió sexual: constitueix la principal forma de contagi, que es dona per contacte directe amb les secrecions d'una persona infectada. La major quantitat de virus es troba a la sang i al fluid seminal.
- transmissió parenteral: per l'ús compartit d'agulles o xeringues, instruments contaminats, transfusió sanguínia, transplantament d'òrgans, etc.
- transmissió vertical: de la mare al fetus (durant l'embaràs, el part o la lactància).

Es coneixen dos tipus de VIH: el VIH-1 i el VIH-2, que presenten un 40%-60% d'homologia proteica. La majoria de casos d'infecció pel VIH ho són pel VIH-1. El VIH-2 és més freqüent a l'oest d'Àfrica i resulta fins a 8 vegades menys transmissible i menys virulent que el VIH-1. Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral fan referència únicament i exclusivament a la infecció pel VIH-1.

El VIH-1 es divideix en diferents subtipus, doncs s'han detectat algunes variants víriques (o genotips), que presenten una determinada distribució geogràfica (Osmanov S, J Acquir Immune Defic Syndr 2002). El subtipus predominant a Europa occidental és el B (veure taula 1).

Taula 1. Distribució geogràfica dels subtipus predominants del VIH-1.

Su tipus VIH-1	
A	Oest, Est i Centre d'Àfrica, Est d'Europa
B	Nord d'Amèrica, Europa, Est d'Àsia, Amèrica Llatina
C	Sud d'Àfrica, Sud d'Àsia, Etiòpia
D	Est d'Àfrica
E	Sudest d'Àsia

El VIH consisteix en una partícula esfèrica d'uns 100 nm, formada per una estructura de tres capes (veure figura 1):

- embolcall lipídic: representa l'estructura més externa. Consisteix en una bicapa lipoproteica que deriva de la cèl·lula infectada, i per tant conté diferents proteïnes que provenen de l'hoste, com antigens d'histocompatibilitat de classe I i II, i algunes molècules d'adhesió, que poden facilitar el contacte amb altres cèl·lules diana. A més, s'integren 72 complexos glucoproteics (gp) virals com gp120 i gp41, que es projecten cap a l'exterior de la partícula vírica.
- càpside o matriu: consisteix en una estructura intermitja en forma circular, associada a la part interna de l'envolta lipídica, i constituïda per la proteïna p17.
- nucleocàpside o *core*: representa l'estructura més interna amb forma d'icosaedre, constituïda per la proteïna p24, a l'interior de la qual es localitza el genoma del virus més les nucleoproteïnes p9 i p7 i la maquinària enzimàtica necessària per a la replicació viral (transcriptasa inversa, integrasa i proteasa).

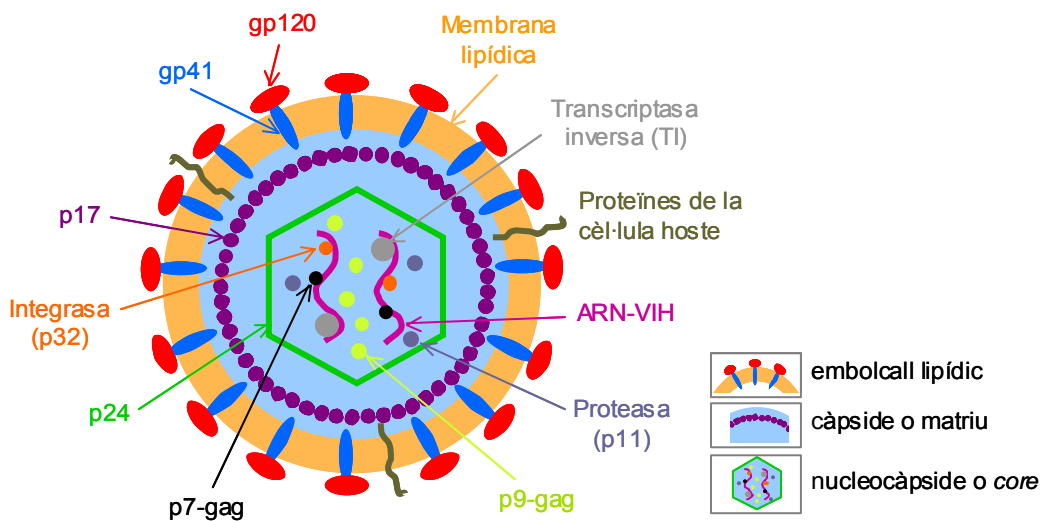


Figura 1. Estructura del VIH.

El genoma del virus està format per dues molècules idèntiques d'ARN monocatenari de polaritat positiva de ~ 9,5 Kb encapsidat al *core*.

Com en tots els retrovirus, l'acció enzimàtica de la TI transforma l'ARN víric en ADN proviral bicatenari a l'interior de la cèl·lula hoste, que s'integra al genoma cel·lular per replicar-se. A partir de l'ADN proviral es transcriuen els ARN missatgers (ARNm) que codifiquen les proteïnes virals. Aquestes, juntament amb l'ARN genòmic viral nou, constitueix una nova partícula infectiva que emergeix per gemmació a través de la membrana de la cèl·lula infectada.

El genoma del VIH està constituït per tres gens estructurals: *gag*, *pol* i *env*, característics de tots els retrovirus, que codifiquen components proteics de la partícula vírica; i per sis gens accessoris reguladors: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu*, que codifiquen proteïnes que controlen l'expressió vírica i la infectivitat (veure figura 2).

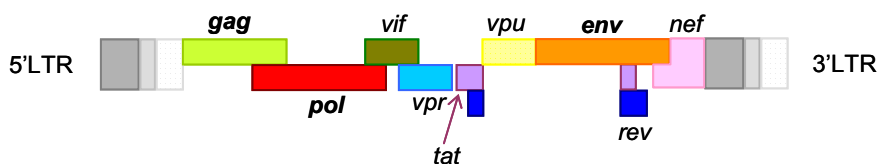


Figura 2. Organització del genoma del VIH. El genoma del VIH està format dues molècules d'ARN idèntiques de 9,5 Kb, que conté tres gens estructurals (*gag*, *pol* i *env*), comuns a tots els retrovirus, i sis gens reguladors (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* i *nef*). Les regions LTR (long terminal repeat) no codifiquen cap proteïna del virus, i representen els extrems finals del genoma víric, que s'uneixen a l'ADN de la cèl·lula hoste un cop integrat al nucli.

El gen *gag* codifica proteïnes de la càpside i el *core*. El gen *env* produeix les glicoproteïnes de l'embolcall lipídic, i el gen *pol* genera la TI i altres enzims necessaris per a la replicació del virus. Els gens *tat* i *rev* codifiquen proteïnes reguladores que estimulen la transcripció de l'ADN proviral a l'interior del nucli. A més, la proteïna Rev exporta els ARNm virals del nucli al citosol cel·lular. La proteïna Nef realitza diverses funcions, entre les que cal destacar la seva contribució a la patogenicitat del virus, mitjançant la regulació negativa de l'expressió d'antigens CD4 i antigens d'histocompatibilitat de classe I i II, la qual cosa representa un mecanisme de protecció contra l'atac citotòxic mediat per les cèl·lules T CD8⁺, i evita el reconeixement pels limfòcits T CD4⁺. Vpr incrementa el cicle de replicació viral en les cèl·lules infectades, estimulant així la producció de partícules víriques. Igualment, sembla ser important pel transport de l'ADN proviral cap el nucli. Vpu és una proteïna essencial pel procés de gemmació, en el que s'alliberen noves partícules víriques infectives al plasma sanguini. La proteïna Vif és important pel transport intracel·lular de molts components vírics. A més, sembla afectar a la morfogènesi viral, i s'associa a la capacitat infectiva del virus extracel·lular. A la

taula 2, s'indiquen de forma resumida els productes gènics del VIH i la funció general que exerceixen.

Taula 2. Descripció dels gens i la funció principal de les proteïnes del VIH.

Gen	Precursor	Proteïna	Funció
<i>gag</i>	p55	p17	Proteïna estructural de la matriu
		p24	Proteïna estructural principal de la nucleocàpside
	p15	p9	Proteïna estructural de la nucleocàpside
		P7	Proteïna estructural de la nucleocàpside, associada a l'ARN viral
<i>pol</i>	p190	p11	Activitat proteasa
		p13	Activitat ARNasa
		p66; p51	Activitat transcriptasa inversa (TI)
		p32	Activitat integrasa
<i>env</i>	gp160	Gp120	Proteïna extracel·lular, permet la unió del virus a la cèl·lula
		Gp41	Proteïna transmembrana, permet la fusió del virus a la cèl·lula
<i>tat</i>		Tat (p14)	Activador potent de la transcripció viral
<i>rev</i>		Rev (p18)	Regula l'expressió dels gens estructurals
<i>nef</i>		Nef (p27)	Pleiotròpica, necessària per la producció vírica i la progressió de la malaltia
<i>vif</i>		Vif (p23)	Promou la infectivitat del virus extracel·lular
<i>vpr</i>		Vpr (p15)	Activador dèbil de la transcripció viral
<i>vpu</i>		Vpu (p16)	Promou la maduració i l'alliberament de les partícules virals

El genoma del VIH es caracteritza per presentar una elevada taxa de mutació, degut als errors que comet la TI durant la còpia de l'ARN a ADN i a la capacitat de recombinació que tenen els genomes de dos virus diferents quan co-existeixen en una mateixa cèl·lula. En conseqüència, el VIH exhibeix una extrema variabilitat genètica, que genera una població viral heterogènia, que existeix entre diferents individus i dintre d'una mateixa persona. Aquest fet dificulta, d'una banda, el reconeixement i l'eliminació de les partícules víriques per part del sistema immune i, d'altra banda, obstaculitza la síntesi d'una vacuna eficaç contra la infecció pel VIH.

1.1.3. Patogènia de la infecció pel VIH

D'igual forma que la totalitat dels virus, el VIH és un paràsit intracel·lular que necessita infectar les cèl·lules per replicar-se i completar el seu cicle biològic. Els mecanismes patogènics de la infecció pel VIH són extremadament complexes i multifactorials (Fauci AS, Science 1993).

El VIH, després de penetrar a l'organisme per qualsevol de les tres vies de transmissió descrites anteriorment, infecta les cèl·lules que expressen el receptor de superfície CD4 a la membrana plasmàtica. El virus ràpidament colonitza el sistema limfàtic, per arribar al corrent sanguini i induir la seroconversió.

Les principals cèl·lules diana del VIH són els limfòcits T CD4⁺, però altres tipus cel·lulars, com macròfags, monòcits, limfòcits T CD8⁺, limfòcits B, limfòcits NK (*natural killers*), cèl·lules dendrítiques (o cèl·lules de Langerhans), cèl·lules endotelials, cèl·lules de la microglia, cèl·lules epitelials gastrointestinals, fibroblastes, etc, també poden ser susceptibles de ser infectats pel virus.

En primer lloc, el virus és captat per les cèl·lules dendrítiques (CD; o cèl·lules de Langerhans) de la submucosa del tracte gastrointestinal, genitourinari o respiratori, principalment; i pels limfòcits circundants, que constitueixen autèntics fòliculs limfoides i formen part del sistema limfoide difús. Les CD són cèl·lules presentadores d'antigen que deriven de la medul·la òssia, i que es troben en estat immadur en diferents teixits. Quan contacten amb l'antigen viral s'activen i migren cap als nòduls limfàtics (òrgans limfàtics secundaris), a on presenten l'antigen a les cèl·lules T CD4⁺, activant una resposta immune específica. Un cop al teixit limfoide, s'estableix una infecció aguda en les cèl·lules T CD4⁺. La replicació del virus s'accelera donant lloc a una producció massiva de partícules víriques, que es disseminen per tots els teixits limfoides de l'organisme, fins arribar al corrent sanguini.

L'evolució de la infecció a partir del moment en què s'ha produït el contagi, en principi, no depèn de la via de transmissió, i sí de la dosi infectiva, de la virulència de la soca vírica i de la capacitat de resposta immune del pacient infectat.

El diagnòstic de la infecció aguda pel VIH consisteix principalment en la detecció de l'ARN víric mitjançant la tècnica d'amplificació d'ADN basada en la reacció en cadena de la polimerasa (*PCR*; o *polymerase chain reaction*). La detecció de l'antigen viral p24 mitjançant l'enzimoimmunoassaig *ELISA* (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), constitueix una prova diagnòstica alternativa a l'anterior. Tot i que resulta altament específica, és menys sensible que la primera, i sovint s'utilitzen com a complementàries. La detecció d'anticossos específics contra el VIH no és possible durant les primeres setmanes de la infecció, ja que fins el moment de la seroconversió del pacient infectat (que sol tenir lloc al cap de 4-12 setmanes després del contagi) no es produeix una resposta humoral productora d'anticossos.

La detecció precoç de la infecció primària permetrà, principalment, disminuir el risc de transmissió viral i aplicar una teràpia ARV efectiva des de les etapes inicials de la infecció, la qual cosa modificarà positivament el curs natural de la malaltia.

1.1.3.1. El cicle vital del VIH

Rera la infecció de les cèl·lules diana, s'inicia tot un procés replicatiu a l'interior cel·lular, en el que el virus s'apodera de la maquinària bioquímica de la cèl·lula infectada per completar el seu cicle vital i propagar-se.

Cada un dels passos que tenen lloc a l'interior de la cèl·lula hoste després de la infecció constitueixen el cicle vital del VIH, que es pot dividir en quatre punts clau segons es descriu a continuació (veure figura 3):

1. Fusió i internalització del VIH

El primer contacte entre el VIH i la cèl·lula hoste es realitza a través de la glucoproteïna vírica gp120 i el receptor CD4 de la cèl·lula (Dalglish AG, Nature 1984). La unió de gp120 amb determinats epítops de CD4 provoca un canvi conformacional en gp120 que permet la seva interacció amb un correceptor, que és una proteïna transmembrana de set dominis de la família de receptors de quimioquines, associada a una proteïna G reguladora. La unió amb el correceptor cel·lular provoca un canvi en la conformació de gp41 del virus, que resulta crític per a la fusió entre el virus i la cèl·lula.

Seguidament, el virus es fusiona amb la bicapa lipídica de la cèl·lula diana, i allibera al citoplasma cel·lular el seu material genètic (ARN), juntament amb les proteïnes víriques necessàries per a la propagació del virus. Actualment s'està treballant en la síntesi de nous fàrmacs antiretrovirals (ARVs) amb capacitat d'inhibir aquest punt del cicle vital (inhibidors de la fusió), per evitar l'entrada del virus a la cèl·lula diana, però la majoria es troben en fase d'investigació i només algun fàrmac s'ha començat a comercialitzar recentment. Aquest tema es tractarà amb profunditat a la secció 1.2 de la Tesi, que tracta sobre les teràpies ARVs.

2. Transcripció inversa i integració de l'ADN proviral

A continuació, l'ARN monocatenari del VIH es transforma en ADN de doble cadena, mitjançant un procés de retrotranscripció catalitzat per la **TI** del virus. La TI, constitueix una de les principals dianes terapèutiques que existeixen en l'actualitat, juntament amb altres enzims vírics (veure secció 1.2). Presenta tres dominis enzimàtics ben diferenciats: un domini amb activitat ADN polimerasa-ARN dependent, un domini ARNasa i un domini ADN polimerasa-ADN dependent. La retrotranscripció ve definida per la unió d'un encebador d'ARN de transferència (ARNt) a l'ARN víric, que inicia la producció de la primera cadena d'ADN complementari proviral, per la degradació de l'ARN víric mitjançant la ribonucleasa H de la TI, i finalment, per la síntesi de la segona cadena d'ADN proviral. La TI no presenta activitat correctora d'errors i, en

conseqüència, genera un gran nombre de mutacions que contribueixen a l'elevada variabilitat genètica característica del VIH.

Posteriorment, l'ADN proviral de doble cadena, o complex de preintegració, és transportat amb l'ajut de proteïnes virals cap a l'interior del nucli per integrar-se al genoma cel·lular, mitjançant l'acció de la **Integrasa** del virus.

Per a la integració de l'ADN proviral és absolutament necessari l'activació de les cèl·lules diana, a partir d'estímuls generats per antigens, citoquines i mitògens. En cas contrari, si el VIH penetra a l'interior de cèl·lules T quiescents, el complex de preintegració s'acumula al citosol de la cèl·lula sense integrar-se, en situació de latència. Les cèl·lules que contenen el provirus latent representen reservoris cel·lulars de llarga duració que impossibiliten l'erradicació del VIH, ja que no expressen productes virals a la seva membrana i per tant, poden escapar del control immunològic. A més, els fàrmacs ARVs disponibles avui dia, tot i mantenir nivells de VIH indetectables a l'organisme infectat, no tenen capacitat per eliminar el provirus en estat latent, de manera que en cas de suspendre el tractament ARV, els reservoris cel·lulars actuen de fonts de VIH que tornen a promoure la infecció i augmentar la càrrega viral. En aquest cas, el provirus latent es reactiva mitjançant estímuls cel·lulars i es transporta al nucli on s'integra als cromosomes.

3. Replicació, transcripció i traducció del genoma víric

Un cop l'ADN proviral s'ha integrat en el nucli de la cèl·lula infectada, algunes proteïnes víriques, juntament amb factors de transcripció cel·lular, com el factor nuclear KB (NF-KB; o *nuclear factor KB*) promouen l'activació de la replicació i la transcripció del genoma víric. Inicialment, la transcripció resulta en la síntesi de proteïnes del VIH reguladores, com Tat, Rev i Nef. Tat s'uneix a l'element de resposta a la transactivació (*TAR*; o *transactivation response element*) localitzat a l'extrem *LTR* (*long terminal repeat*) del genoma del virus, i estimula la transcripció, permetent l'elongació completa de l'ARNm del virus. L'ARNm del VIH se sintetitza com un únic transcrit que s'ha de transportar al citosol per ser processat en ARN de diferents mides. Rev processa i transporta l'ARNm cap el nucli, activant l'expressió de gens estructurals i enzimàtics i, en definitiva, promou la formació de partícules víriques madures. L'ARNm del VIH es tradueix al citosol generant grans molècules proteiques precursors, que necessiten ser proteolitzades postraduccionalment per la **Proteasa** vírica, per a donar lloc a proteïnes funcionals i generar partícules víriques amb capacitat infectiva. La Proteasa del VIH, també ha estat objecte d'estudi i investigació en el camp de la teràpia ARV (veure secció 1.2).

4. Ensamblatge i gemmació de noves partícules víriques infectives

Tots els components vírics funcionals derivats de l'actuació de la Proteasa vírica, s'organitzen i s'ensamblen formant una població de nous virus genèticament heterogenis, que finalment s'alliberen per un procés de gemmació al plasma sanguini per infectar més cèl·lules. Durant el procés de gemmació el virus incorpora part de la bicapa lipídica de la cèl·lula a la seva estructura, de forma que contindrà proteïnes cel·lulars que juguen un paper important en el procés d'infecció.

La vida mitja del VIH al plasma d'un individu infectat s'ha estimat que és de ~ 6 hores. Es calcula que, per mantenir una concentració de virus constant en l'organisme, la replicació vírica deu generar aproximadament unes 10^9 - 10^{10} noves partícules víriques per dia, donant lloc a un conjunt de poblacions víriques genèticament heterogènies, denominades 'quasiespècies'. Aquest fet permet al virus evolucionar ràpidament enfront a pressions selectives generades pel sistema immunitari i el tractament ARV.

LIMFÒCIT T CD4+ INFECTAT PEL VIH

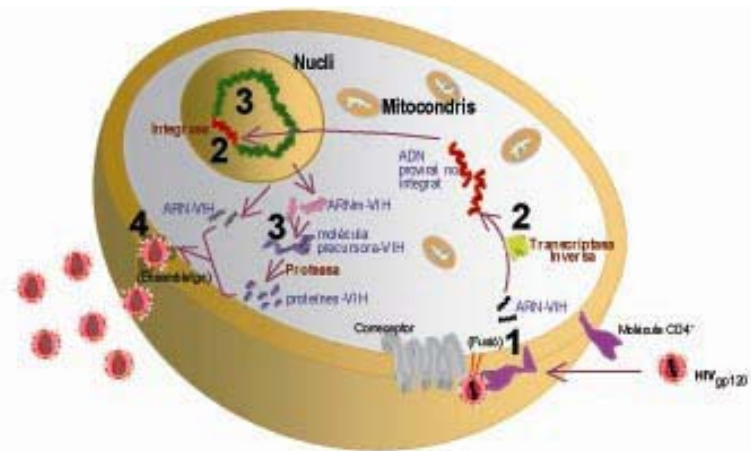


Figura 3. El cicle vital del VIH. 1. Fusió i internalització del VIH; 2. Transcripció inversa i integració de l'ADN proviral; 3. Replicació, transcripció i traducció del genoma víric; 4. Ensamblatge i gemmació de noves partícules víriques infectives.

1.1.3.2. Tropisme viral

El VIH presenta un cert tropisme cel·lular, que ve determinat per les proteïnes de l'embolcall lipídic i els correceptors de la cèl·lula hoste amb els que interacciona durant la fusió. Els principals correceptors amb els que el VIH contacta *in vivo* són CCR5 i CXCR4. La utilització d'un o l'altre defineix tres tipus de soques víriques que infecten les cèl·lules de forma selectiva: R5, X4 o R5X4. Les soques R5 interaccionen amb el correceptor CCR5 i són monocitotròpiques (M-tròpiques), és a dir, infecten principalment cèl·lules T CD4⁺, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques (Deng H, Nature 1996). Els virus R5 no indueixen la formació de sincitis (cèl·lules gegants multinucleades resultants de la fusió d'una cèl·lula infectada, a través de les glucoproteïnes de superfície gp120, amb molècules CD4 de cèl·lules no infectades). Són els que es transmeten de forma preferent d'un individu a un altre, i es detecten predominantment a les etapes primerenques de la infecció. Durant la progressió de la infecció, l'ús de diferents correceptors s'expandeix i es generen soques víriques amb tropisme X4 o dual R5X4, que utilitzen el correceptor CXCR4. Són limfotròpiques (T-tròpiques), ja que infecten principalment limfòcits T CD4⁺ activats, línies cel·lulars de limfòcits T immortalitzats, i tenen poca capacitat per infectar macròfags (Feng Y, Science 1996) (Doranz BJ, Cell 1996). Es desenvolupen freqüentment durant les fases més avançades de la infecció (Connor RI, J Exp Med 1997), i són inductores de sincitis, que es relacionen amb la depleció dels limfòcits T CD4⁺.

Els lligands naturals del correceptor CCR5 són les quimioquines MIP-1 α (proteïna inflamatòria dels macròfags 1 α ; o *macrophage inflammatory protein*), MIP-1 β i RANTES (*regulated upon activation normal T expressed and secreted*), produïdes pels limfòcits T CD8⁺. Són pèptids supressors de la replicació del VIH, ja que són capaces d'inhibir l'entrada del virus M-tròpic a les cèl·lules T CD4⁺ (Cocchi F, Science 1995). Les quimioquines són un grup de citoquines de baix pes molecular capaces de produir quimiotaxis dels leucòcits durant els processos inflamatoris. La quimioquina SDF-1 (factor tipus 1 derivat de l'estroma; o *stroma-derived factor type 1*) és el lligand natural del correceptor CXCR4, i inhibeix l'entrada del virus T-tròpic a les cèl·lules T activades.

L'existència de defectes o polimorfismes en els gens que codifiquen els receptors de quimioquines pot determinar certa protecció enfront el VIH o una progressió més lenta de la infecció. En aquest sentit, s'ha demostrat que els individus homozigots per a una deleció de 32 pb al gen que codifica el correceptor CCR5 exhibeixen una resistència natural a la infecció pel VIH (Liu R, Cell 1996), i els individus heterozigots per a la mateixa deleció presenten una progressió de la infecció molt lenta, i generalment s'engloben dins el grup de pacients no progressadors (*LTNP*; o *long-term non-progressors*) (Michael NL, Nat Med 1997).

Aproximadament el 10-20% de la població caucàsica és heterozigota per la deleció en CCR5, i el 1% és homozigota (Dean M, Science 1996). Els resultats d'aquests estudis han ofert una oportunitat per desenvolupar noves perspectives terapèutiques contra la infecció per VIH (Simmons G, Science 1997).

1.1.3.3. Història natural de la infecció pel VIH

El curs natural de la infecció pel VIH té un desenvolupament típicament crònic i pot variar d'un pacient a un altre. Clínicament es caracteritza per una fase aguda inicial, definida com a infecció primària, durant la qual es produeix la seroconversió. Segueix una llarga fase de latència clínica assintomàtica, de temps variable que pot arribar a ser de 10-12 anys, i que és deguda a l'equilibri entre replicació viral i resposta immunològica del pacient. Posteriorment, aquest equilibri es trenca: augmenta la càrrega viral i es deteriora la funció immunitària, de forma que s'arriba a l'etapa de sida, caracteritzada per l'aparició de tumors i d'infeccions oportunistes. Finalment, el pacient mor al cap d'uns 3 anys després del diagnòstic de la sida (veure figura 4).

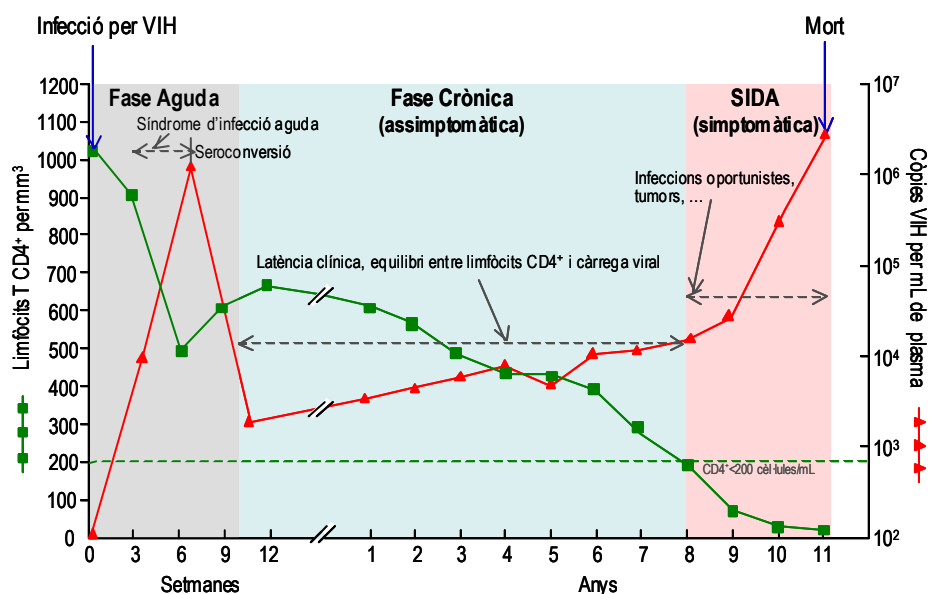


Figura 4. Història natural de la infecció pel VIH. El gràfic descriu la progressió natural de la infecció pel VIH als pacients sense teràpia ARV des del moment de la transmissió fins a la mort al cap dels 10-11 anys.

A continuació es descriuen els trets més característics de les tres fases principals que tenen lloc durant l'evolució natural de la infecció pel VIH:

1. Fase aguda

Durant la infecció primària pel VIH es dona una fase d'infecció aguda, que es caracteritza per un increment de la càrrega viral en sang, degut a la replicació massiva del virus, acompanyat d'una disminució dràstica dels nivells de limfòcits T CD4⁺, que resulta inversament proporcional a l'augment viral. El virus es disemina ràpidament pels òrgans limfoides i arriba a la sang abans de que es desenvolupi una resposta immune contra la infecció. En aquest moment, la determinació plasmàtica de l'ARN víric, superior a 10.000 còpies per mil·lilitre de plasma, confirmaria el diagnòstic. La depressió del sistema immunitari que provoca el virus, condueix al desenvolupament d'un quadre clínic similar a una mononucleosis infecciosa, que es pot confondre amb un procés gripal (veure taula 3). Els símptomes clínics apareixen a les 2-3 setmanes després del contagi en el 40-90% dels individus infectats, i desapareixen 1-2 setmanes després com a resultat d'una forta resposta citotòxica específica i una gran producció d'anticossos específics contra el VIH, que condueix a la seroconversió del pacient infectat. Aquesta resposta immune ve associada a una disminució neta de la càrrega viral i a un increment del nombre de cèl·lules T CD4⁺, que tot i que malauradament no és capaç d'eradicar el virus, manté un equilibri entre replicació viral en sang i resposta immune que dona pas a la fase crònica de la infecció.

Taula 3. Infecció primària: simptomatologia clínica més freqüent.

▪ febre (97%)	▪ ulceracions cutànies i de mucoses (37%)
▪ sudoració (97%)	▪ diarrea (33%)
▪ limfadenopaties (77%)	▪ cefalea (32%)
▪ faringitis (70%)	▪ nàusees o vòmits (27%)
▪ erupció cutània (70%)	▪ pèrdua de pes (20%)
▪ miàlgies (58%)	▪ símptomes neurològics (12%)
▪ artràlgies (58%)	▪ candidiasis oral i esofàgica (10%)
▪ trombocitopènia (51%)	▪ altres (6%)
▪ leucopènia (38%)	

Cal tenir en compte que el VIH pot escapar del control immunològic per diferents mecanismes, que contribueixen a la impossibilitat d'eradicar el virus. Alguns d'aquests mecanismes venen determinats per l'elevada variabilitat genètica que es genera en cada cicle

de replicació vírica, per l'emascament dels epítops vírics de neutralització que són tributaris de ser reconeguts pels anticossos neutralitzants de l'individu infectat, i per la capacitat del provirus de romandre en estat de latència a l'interior dels reservoris cel·lulars.

Els reservoris cel·lulars contribueixen a una producció de virus molt baixa, inferior al 1% respecte el total, però són de gran transcendència perquè poden explicar la recidiva després de la suspensió del tractament ARV (Chun TW, Proc Natl Acad Sci U S A 1999). El sistema nerviós central (SNC) constitueix un dels reservoris cel·lulars de la infecció més importants (Garcia F, AIDS 1999), donat que determinats fàrmacs ARVs no poden travessar la barrera hematoencefàlica. Altres reservoris cel·lulars de gran importància venen representats pel tracte genital, el teixit limfoide associat al tracte gastrointestinal, la medul·la òssia i les cèl·lules T CD4⁺ en repós.

2. Fase crònica

La fase crònica de la infecció pel VIH es caracteritza per una resposta cel·lular i humoral intensa que permet assolir durant anys un equilibri més o menys constant entre la replicació viral i resposta immune, que manté al pacient en un estat de latència clínica, malgrat la replicació activa del virus. La severitat de la primoinfecció i la càrrega viral que el pacient manté un cop assolit l'equilibri entre la replicació del VIH i el sistema immune representen uns paràmetres de gran valor pronòstic en l'evolució de la infecció. En general, els pacients que després de generar una resposta immunitària mantenen nivells de virus en sang elevats tenen un pronòstic desfavorable i progressen ràpidament a sida. La replicació viral en aquesta fase és molt activa als teixits limfàtics, malgrat la virèmia en sang es vegi reduïda. Amb el temps, el sistema immunitari es va deteriorant gradualment, com a conseqüència de la progressiva reducció de les cèl·lules CD4⁺, de manera que la seva capacitat per mantenir l'equilibri viral va disminuint, fins que s'arriba a l'etapa final de sida.

Malgrat l'activació del sistema immunitari necessària per actuar contra el virus, el pacient experimenta al mateix temps una immunodepressió progressiva. Aquest fet pot resultar paradoxal, però cal recordar que el virus necessita activar el sistema immunològic per poder-se propagar. En aquest sentit, s'ha demostrat que varies citoquines segregades pel sistema immune activat indueixen la replicació del VIH (Kinter A, Immunol Rev 2000).

3. Fase de sida

En aquesta fase la replicació del virus en sang ha reduït marcadament el nombre de limfòcits T CD4⁺, fins a un nivell inferior a 200 cèl·lules per mil·lilitre de plasma. El sistema immunològic esdevé incapaç de combatre el virus, i condueix al pacient a un estat simptomàtic, que es manifesta clínicament pel desenvolupament d'infeccions oportunistes i alguns tumors

com el sarcoma de Kaposi, el tumor de coll uterí i l'aparició de trastorns neurològics, juntament amb un agreujament de l'estat general del pacient, conegut com *wasting syndrome* (pèrdua de pes, astènia, anèmia, etc.). A partir d'aquest moment el considera que el pacient té la sida, i experimentarà un retrocés immunològic que el conduirà a la mort en menys de tres anys després del diagnòstic de la síndrome d'immunodeficiència. El criteri diagnòstic de la sida, basat en l'actualitat en la valoració d'una sèrie de paràmetres clínics i analítics, es resumeix a la taula 4.

Actualment, gràcies a la disponibilitat de les noves teràpies ARVs (veure secció 1.2), el curs natural de la infecció pel VIH ha millorat considerablement, prolongant-se la cronicitat de la fase assintomàtica i alentint-se la progressió a sida.

Taula 4. Classificació de la infecció pel VIH proposta pels *Centers for Disease Control (CDC)*.

Categories segons la xifra de limfòcits T CD4 ⁺	Categories clíniques		
	A	B	C
>500/mm ³ (≥29%)	A1	B1	C1
200-499/mm ³ (14%-28%)	A2	B2	C2
<200/mm ³ (<14%)	A3	B3	C3

La **categoria clínica A** s'aplica a la primoinfecció (o infecció aguda) i als pacients assintomàtics (amb o sense limfadenopaties). La **categoria clínica B** s'aplica als pacients que presentin o hagin presentat símptomes clínics no associats a la categoria C (com per exemple simptomatologia atribuïda a la infecció pel VIH), o als pacients als que la clínica o el tractament s'hagin pogut complicar degut a la infecció pel VIH. La **categoria clínica C** s'aplica a pacients que presentin o hagin presentat alguna de les complicacions associades a la definició de sida. Els pacients de les **categories A3, B3 i C1-C3 es consideren afectes de sida**.

1.1.4. Dades epidemiològiques de l'any 2004

Els grans progressos en el coneixement de la patògenia i l'estructura del virus, juntament amb el desenvolupament d'una teràpia ARV eficaç, han permès controlar l'evolució clínica de la infecció pel VIH, i considerar la sida actualment com una malaltia crònica.

Malgrat els avenços científics, que han conduït a una millora de la supervivència i la qualitat de vida dels pacients que conviuen amb la infecció, les dades epidemiològiques més recents no deixen de ser preocupants. Segons l'informe sobre l'epidèmia mundial de sida emès pel Programa conjunt de l'Organització de les Nacions Unides sobre el VIH/sida (ONUSIDA) l'any 2004, el nombre de persones que s'infecten a diari pel VIH no deixa d'augmentar, malgrat existeixen estratègies eficaces de prevenció. Des de que es va diagnosticar la malaltia el 1981, ara fa més de 20 anys, la sida ha causat la mort a més de 20 milions de persones. L'estimació mundial a finals de 2004, situava la xifra de persones infectades en 39,4 milions. D'aquest total, només a l'Àfrica subsahariana s'ha comptabilitzat una mitjana de 25.4 milions d'individus infectats, on les dones representen el percentatge majoritari d'infeccions. El mateix any 2004, el nombre de nous casos d'infeccions per VIH va ascendir a 4,9 milions, i la xifra de morts causades per la malaltia superà els 3,1 milions en tot en món. De nou, l'Àfrica susahariana va ser la zona més castigada per la sida (veure figura 5).

A la taula 5 s'indiquen les estimacions mundials del VIH i la sida especificades per diferents regions del món. Les dades d'incidència de la infecció i mortalitat mostren una marcada diferència en l'impacte de l'epidèmia entre els països desenvolupats i els més pobres, a on en aquests últims el contacte amb la informació sobre la prevenció de la malaltia i les teràpies ARVs és realment molt limitat.

Taula 5. Estimació mundial sobre l'impacte del VIH/sida per diferents regions continentals.

Regió Continental	Persones infectades pel VIH el 2004	Nous casos d'infecció pel VIH el 2004	Morts causades per la sida el 2004
Àfrica Subsahariana	25,4 M (23,4 M-28,4 M)	3,1 M (2,7 M-3,8 M)	2,3 M (2,1 M-2,6 M)
Àsia Meridional i Sudoriental	7,1 M (4,4 M-10,6 M)	890.000 (400.000-2,0 M)	490.000 (300.000-750.000)
Amèrica Llatina	1,7 M (1,3 M-2,2 M)	890.000 (400.000-2,0 M)	490.000 (300.000-750.000)
Europa Oriental i Àsia Central	1,4 M (920.000-2,1 M)	210.000 (110.000-480.000)	60.000 (39.000-87.000)
Àsia Oriental	1,1 M (560.000-1,8 M)	290.000 (84.000-830.000)	51.000 (25.000-86.000)
Amèrica del Nord	1,0 M (540.000-1,6 M)	44.000 (16.000-120.000)	16.000 (84.000-25.000)
Europa Occidental	610.000 (480.000-760.000)	21.000 (6.500-<8.500)	490.000 (300.000-750.000)

(continua a la pàgina següent)

(continua de la pàgina anterior)

Àfrica del Nord i Orient Mitjà	540.000 (230.000-1,5 M)	92.000 (34.000-350.000)	28.000 (12.000-72.000)
Carib	440.000 (270.000-780.000)	53.000 (27.000-140.000)	36.000 (24.000-61.000)
Oceania	35.000 (25.000-48.000)	5.000 (2.100-13.000)	700 (<1.700)

M: milions. Les xifres s'expressen com el valor mitjà estimat i, entre parèntesi, s'indica l'interval en el que es troba el valor real.

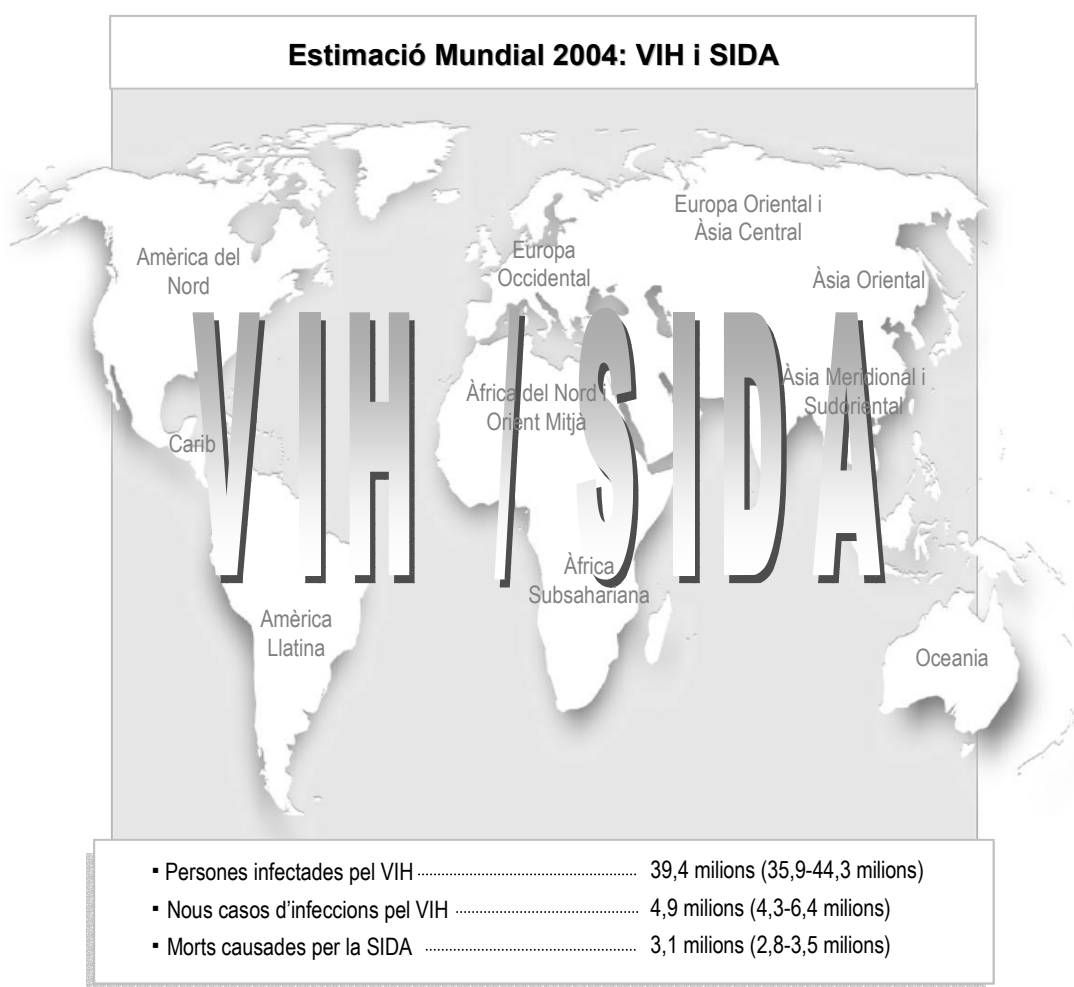


Figura 5. Estimació mundial del VIH i sida durant l'any 2004. S'indiquen les mitjanes i els intervals de les estimacions sobre l'impacte mundial de la infecció pel VIH i la sida, a finals de l'any 2004. Dades facilitades per l'Organització de les Nacions Unides sobre el VIH/sida (ONUSIDA).

1.2. LA TERÀPIA ANTIRETROVIRAL

1.2.1. Història de la teràpia antiretroviral contra la infecció pel VIH

La identificació del VIH com l'agent infeccios causant de la sida constitueix un dels aconteixements científics més importants de la història de la medicina. Igualment, el desenvolupament d'una teràpia ARV eficaç contra la infecció pel VIH ha estat, sens dubte, un dels avenços més importants que han tingut lloc al llarg dels 24 anys transcorreguts des de l'inici de l'epidèmia de la sida.

Durant aquest temps els esforços de la comunitat científica per controlar la infecció no han fet sinó créixer i el coneixement de la patogènia del virus ha contribuït al desenvolupament de teràpies que actuen en punts clau del cicle vital del VIH.

Bàsicament, la teràpia ARV pretén disminuir al màxim la virèmia en l'organisme del pacient infectat, i contribuir al restabliment normal del sistema immunitari. D'aquesta manera, s'aconsegueix millorar l'evolució natural de la infecció i disminuir dràsticament la mortalitat dels pacients.

El primer fàrmac ARV administrat contra el VIH fou la zidovudina (AZT), que va ser aprovat per la *FDA (Food and Drug Administration)* l'any 1987. Originàriament, l'AZT es va desenvolupar com un fàrmac contra el càncer, però no va resultar efectiu en aquest sentit. No obstant, el 1985 es va demostrar la seva activitat anti-VIH *in vitro* (Mitsuya H, Proc Natl Acad Sci U S A 1985), i des d'aleshores s'ha utilitzat amb aquesta finalitat. L'AZT és un anàleg del nucleòsid timidina capaç d'interferir en la replicació del virus mitjançant la inhibició de la TI del VIH. S'inclou dins la família de fàrmacs coneguts com inibidors de la TI anàlegs de nucleòsid (ITIAN). Durant anys va constituir l'únic ARV capaç de frenar la progressió de la infecció vírica, que va millorar la supervivència dels pacients amb sida. Però la seva administració en forma de monoteràpia resultava insuficient (Hamilton JD, N Engl J Med 1992) (Volberding PA, N Engl J Med 1995) i, a més, la seva utilització continuada produïa miopatia als pacients com a principal efecte secundari (veure secció 1.4).

Entre 1991 i 1994 es van introduir altres fàrmacs anàlegs de nucleòsid alternatius contra el VIH, com la didanosina (ddI), la zalcitabina (ddC) i l'estavudina (d4T), que presentaven un mecanisme d'acció ARV similar a l'AZT. A mida que proliferaven els fàrmacs ARVs, augmentava la probabilitat d'èxit terapèutic, però també la incertesa sobre quin era el fàrmac més adequat i la dosi més eficaç. Situant-nos en contexte, aquesta època va resultar una de les més mortíferes per la sida, doncs molts individus s'havien contagiat a l'inici de la dècada

dels 80. La preocupació sanitària, científica i social anava en augment, i els esforços es concentraven en el desenvolupament d'una teràpia eficaç contra el VIH i contra les infeccions oportunistes. El 1995 es va demostrar que l'eficàcia de la teràpia amb dos anàlegs de nucleòsid era significativament superior a la monoteràpia (Delta, Lancet 1996) (Hammer SM, N Engl J Med 1996). A partir d'aquest moment es va implantar l'administració d'una teràpia combinada amb dos anàlegs de nucleòsid. Paral·lelament, gràcies als progressos en el coneixement de l'estructura molecular del VIH, es van desenvolupar els fàrmacs inhibidors de la proteasa (IP) (saquinavir -SQV-, ritonavir -RTV- i indinavir -IDV-), un nou grup d'ARVs amb capacitat d'interferir amb la proteasa del VIH. El 1996 es va demostrar que l'addició d'un IP (RTV) al tractament amb dos anàlegs de nucleòsids millorava radicalment l'eficàcia ARV i la supervivència dels pacients infectats (Cameron DW, Lancet 1998) (Brodt HR, AIDS 1997). Aquesta investigació revolucionà el camp de la teràpia ARV, i va iniciar una era farmacològica basada en l'ús del tractament combinat amb tres ARVs, conegut com a teràpia ARV de gran activitat (TARGA). Donat el benefici clínic del TARGA, el seu ús es va anar generalitzant a gran velocitat, fins el punt que actualment constitueix el patró terapèutic habitual als països desenvolupats des del moment en el què està indicat l'inici del tractament. A partir d'aleshores, van continuar emergint ARVs amb més potència terapèutica. El 1996 es van incorporar els ARVs inhibidors de la TI no-anàlegs de nucleòsid (ITINAN) (nevirapina -NVP-), i més recentment, els inhibidors de la fusió (IF) (enfuvirtide -T20-), que interfereixen amb l'entrada del virus a la cèl·lula.

La intensa investigació farmacològica portada a terme durant aquests anys ha aportat grans beneficis als pacients que conviuen amb el VIH (veure taula 6). En primer lloc, ha donat com a fruit un ampli espectre terapèutic, doncs actualment s'utilitzen en humans més de 20 ARVs diferents, que combinats entre si augmenta la possibilitat de tractament de forma considerable. Com a resultat, el TARGA ha aconseguit disminuir la càrrega viral de molts dels malalts infectats pel VIH fins a uns nivells indetectables i augmentar el nivell de limfòcits T CD4⁺, la qual cosa ha reduït dràsticament la mortalitat i morbiditat dels pacients. A més, la impressió que tenen els pacients d'absoluta dependència del tractament farmacològic ha disminuït, doncs el nombre de comprimits diaris i la dosi administrada s'ha reduït considerablement. En conseqüència s'ha millorat l'adherència a la teràpia ARV, la qual cosa suposa un punt clau per l'èxit terapèutic, que depèn molt estretament de la correcta administració dels fàrmacs. En aquestes condicions, la infecció pel VIH ha passat de ser una malaltia d'elevada mortalitat a considerar-se una malaltia crònica. D'altra banda, l'ús crònic dels ARVs, juntament amb una major supervivència dels pacients ha anat associat amb un augment de la descripció clínica d'efectes farmacològics adversos, que actualment representen un dels principals problemes vinculats a l'administració d'ARVs (veure secció 1.4). També, cal tenir en

compte que una adherència baixa al tractament pot promoure la generació de soques víriques resistents als fàrmacs i conduir al fracàs virològic. Aquest fet, juntament amb els efectes secundaris que pot ocasionar el tractament, implica que moltes vegades els pacients es vegin sotmesos a canvis en les pautes ARVs.

L'objectiu fixat en el desenvolupament dels fàrmacs ARVs futurs consisteix bàsicament en produir un efecte anti-VIH més potent, durant més temps, amb una dosi farmacològica mínima efectiva, i amb un mínim efecte tòxic per al pacient. Malgrat la gran innovació terapèutica, l'AZT continua essent en l'actualitat un dels components més utilitzats en les combinacions de tractament ARV.

Taula 6. Aportacions de la teràpia antiretroviral als pacients infectats pel VIH.

• disponibilitat d'un ampli espectre terapèutic	• millora de l'adherència terapèutica
• increment de l'eficàcia clínica pel TARGA	• reducció de resistència als fàrmacs
• increment de les possibilitats terapèutiques	• increment de l'èxit terapèutic
• càrrega viral indetectable	• millora de la qualitat de vida
• restabliment dels nivells normals de CD4 ⁺	• disminució de la mortalitat
• reducció del nombre de pastilles diàries	• cronicitat de la infecció
• reducció de dosis	

1.2.2. Classes de fàrmacs antiretrovirals disponibles el 2005

L'esquema general del TARGA consisteix en la combinació de dos ITIAN més un tercer fàrmac que pot ser un ITINAN, un IP o un altre ITIAN (veure figura 6). Actualment s'estan assajant les possibilitats antiretrovirals d'altres combinacions farmacològiques. Donat el gran ventall de fàrmacs que es comercialitzen actualment, les possibles combinacions terapèutiques són múltiples. L'administració d'una combinació o altra dependrà de l'historial clínic i terapèutic de cada pacient (p.e. de si es tracta d'una teràpia de primera línia o pel contrari és de rescat, de la virèmia i de l'estat immunològic del pacient, dels factors de risc per desenvolupar algun efecte secundari al tractament, del patró de resistència del pacient, etc.).

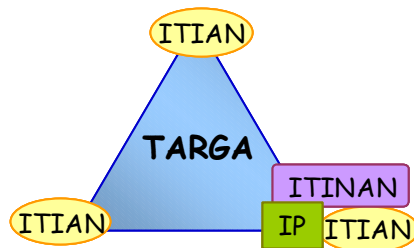


Figura 6. Esquema general del TARGA.

TARGA: tractament antiretroviral de gran activitat; ITIAN: inhibidor de la transcriptasa inversa (TI) anàleg de nucleòsid (o nucleòtid); ITINAN: inhibidor de la TI no-anàleg de nucleòsid; IP: inhibidor de la proteasa.

Els fàrmacs ARVs aprovats per la *FDA* i comercialitzats a Europa fins l'any 2005 actuen inhibint diferents enzims vírics que intervenen en diferents punts clau del cicle replicatiu del VIH. Bàsicament es divideixen en tres famílies segons el pas del cicle víric que bloquegen: els inhibidors de la transcriptasa inversa, els inhibidors de la proteasa i els inhibidors de la fusió.

A continuació es descriu el mode d'acció de les diferents classes de fàrmacs ARVs:

1.2.2.1. Inhibidors de la transcriptasa inversa (ITI)

Inhibeixen la transcriptasa inversa (TI) del virus, l'enzim ADN polimerasa ARN-depenent, responsable de transformar l'ARN del virus en ADN de doble cadena, per permetre la seva integració al genoma de la cèl·lula hoste. En conseqüència, s'atura el cicle vital del VIH i el virus no es pot replicar. Es classifiquen en 2 subfamílies segons siguin anàlegs de nucleòsids (o nucleòtids) o no anàlegs (veure taula 7).

- Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids/nucleòtids (ITIAN/ITIANt)

Els ITIAN són dideoxinucleòsids que actuen com a substractes alternatius de la TI, competint amb els nucleòsids fisiològics adenosina (A), timidina (T), citidina (C) i guanosina (G). Per poder exercir la seva funció s'activen per fosforilació a l'interior de la cèl·lula hoste, gràcies a l'acció de quinases cel·lulars. Els derivats trifosfat (ddNTPs; o dideoxinucleòsids trifosfat) resultants inhibeixen la replicació de l'ADN proviral quan són incorporats per la TI a la cadena d'ADN víric que s'està sintetitzant (veure figura 7), ja que els manca el grup hidroxil a la posició 3' (3'-OH) de la molècula de ribosa, i en conseqüència, l'enllaç fosfodièster necessari en la polimerització de l'ADN no es pot formar (veure figura 8).

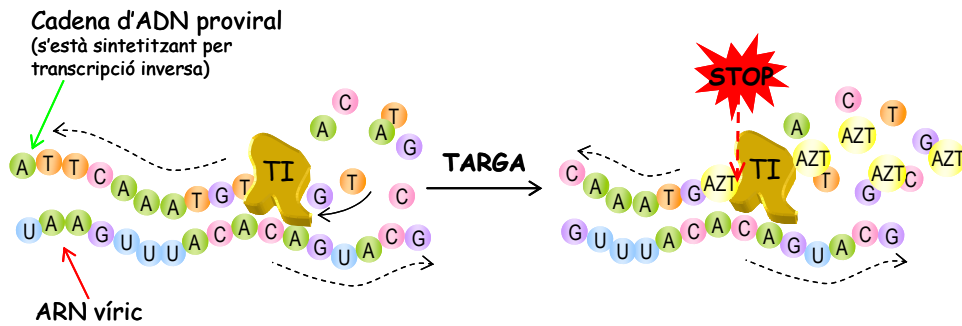


Figura 7. Mecanisme d'acció dels ITIAN. L'anàleg del nucleòsid timidina (p.e. AZT) competeix amb els nucleòsids naturals per la TI. La incorporació de l'AZT a la cadena d'ADN proviral naixent bloqueja la síntesi d'ADN, ja que no pot formar l'enllaç fosfodièster necessari per a la polimerització.

A la taula 7 s'indiquen els ITIAN avui dia disponibles pel tractament contra el VIH.

L'AZT i el d4T són anàlegs de la timidina, i com que competeixen per les mateixes bases la seva combinació conjunta no és recomanada. El ddC, la lamivudina (3TC) i la emtricitabina (FTC) són anàlegs de la citidina, i no se solen combinar conjuntament per la mateixa raó que els ARVs anteriors. El ddl és un anàleg de la inosina i és transformat en dideoxiadenosina abans d'exercir la seva funció. L'abacavir (ABC) és un anàleg de la guanosina.

L'únic anàleg de nucleòtid (ITIANt) avui dia disponible contra la infecció pel VIH és el tenofovir disoproxil fumarat (TDF). El TDF és un profàrmac del tenofovir, que actua com un anàleg del nucleòtid adenosina 5'-monofosfat. A diferència dels anàlegs de nucleòsids, el TDF conté un grup fosfat a la seva estructura i, per tant, només requereix dues fosforilacions per les quinases cel·lulars per generar el metabòlit actiu, tenofovir difosfat. El tenofovir actua de forma similar als anàlegs de nucleòsid, com un fals substrat de l'enzim TI. El TDF s'administra en una sola dosi al dia, presenta una elevada biodisponibilitat, una activitat anti-VIH potent, un perfil de resistència favorable i una gran tolerabilitat, per la qual cosa es considera un nou fàrmac de gran atractiu per a l'ús clínic.

Els ITIAN són potents inhibidors de la replicació del VIH, la majoria s'administren en una sola dosi diària i presenten poca interacció amb altres fàrmacs. Per aquest motiu, formen part de la majoria de combinacions ARVs que s'administren en l'actualitat, i solen representar una part important de qualsevol esquema TARGA. D'altra banda, el seu ús continuat ha estat associat a una sèrie d'efectes adversos greus com acidosi làctica, polineuropatia, pancreatitis i lipoatròfia (alteració del greix corporal), que sovint obliga al pacient a modificar la combinació TARGA. Aquests efectes tòxics, i en especial, el que afecta al greix corporal es tracten amb més detall a la secció 1.4.

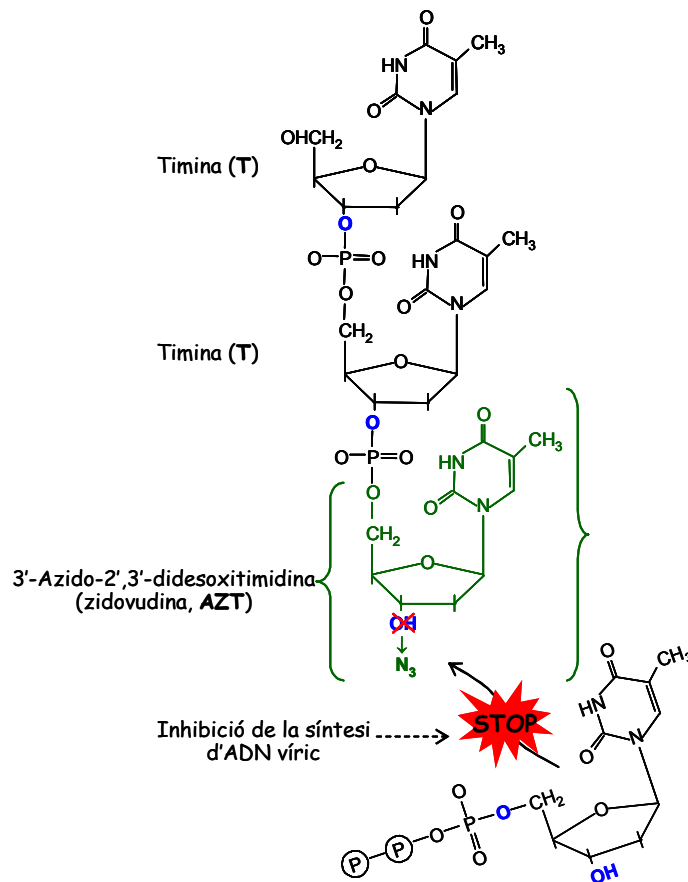


Figura 8. Bloqueig de la síntesi d'ADN pels ITIAN. Els anàlegs de nucleòsids substitueixen el grup hidroxil de la posició 3' de la ribosa per un altre grup químic (p.e. grup azido $-N_3$ -, en el cas de l'AZT). En aquestes condicions la polimerització de l'ADN es bloqueja perquè l'enllaç fosfodièster no es pot formar.

- Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsids (ITINAN)

Els ITINAN són compostos no anàlegs dels nucleòsids naturals que, a diferència dels ITIAN no competeixen amb els nucleòsids fisiològics, sinó que interaccionen directament amb la TI del VIH bloquejant la seva activitat enzimàtica. S'uneixen a un lloc pròxim al centre d'unió del substrat, provocant un canvi de conformació en l'enzim que bloqueja el centre catalític, de forma que la polimerització de l'ADN proviral s'inhibeix significativament. A diferència dels ITIAN, els ITINAN no requereixen activar-se a l'interior de la cèl·lula per exercir la seva funció (veure figura 9).

Exerceixen gran activitat anti-VIH en combinació triple amb altres ARVs, especialment amb els ITIAN. Malgrat que el desenvolupament de nous ITINAN no ha estat tan prolífic com els anàlegs, són components habituals en les combinacions TARGA, especialment NVP i

efavirenz (EFV), doncs presenten una posologia simple i un gran perfil de tolerabilitat. Delavirdina (DLV) presenta una prescripció més limitada, donat la seva posologia més complexa. L'ús crònic dels ITINAN no s'ha associat amb efectes secundaris de gran rellevància, però poden generar resistència amb facilitat.

A la taula 7 s'indiquen els ITINAN avui dia disponibles pel tractament contra el VIH.

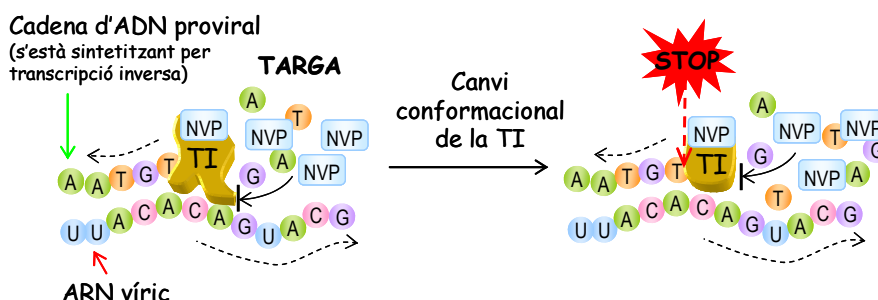


Figura 9. Mecanisme d'acció dels ITINAN. La unió d'un ITINAN (p.e. nevirapina – NVP-) a la TI provoca un canvi de conformació en l'enzim que bloqueja la seva activitat, i en conseqüència, la síntesi d'ADN proviral queda inhibida.

1.2.2.2. Inhibidors de la proteasa (IP)

Els IP són compostos que utilitzen la proteasa del VIH com a diana terapèutica. Actuen inhibint la proteasa del virus, que s'encarrega de proteolitzar postraduccionalment les poliproteïnes víriques per donar lloc a les subunitats funcionals. La inhibició de la proteasa evita, per tant, la maduració i activació de les proteïnes del virus i, en conseqüència, es formaran noves partícules víriques no infectives (veure figura 10).

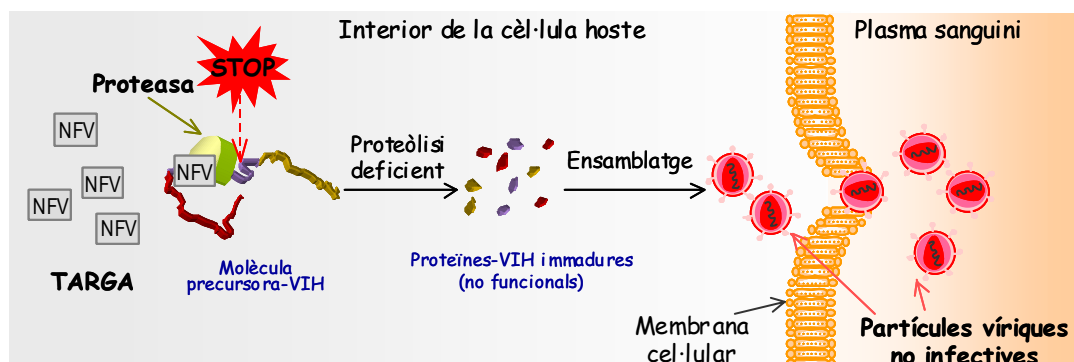


Figura 10. Mecanisme d'acció dels IP. Els IP (p.e. nelfinavir –NFV-) s'uneixen a la proteasa del VIH alterant la seva activitat proteolítica. En conseqüència, es generen proteïnes immadures, que s'ensamblen donant lloc a partícules víriques que no podran infectar noves cèl·lules.

Són fàrmacs amb una gran eficàcia clínica, per la qual cosa es consideren una part fonamental del TARGA, especialment en pacients prèviament tractats. L'administració dels IP s'associa amb alteració del perfil lipídic, resistència a la insulina i diabetis, que condueixen a un increment del risc cardiovascular. Igualment, s'ha atribuït als IP un possible paper patogènic en el desenvolupament d'un efecte secundari greu de redistribució de greix corporal, que es comentarà amb detall a la secció 1.4.

A la taula 7 s'indiquen els IP avui dia disponibles pel tractament contra el VIH.

1.2.2.3. Inhibidors de la fusió (IF)

Els IF són fàrmacs d'última generació. Recentment s'ha començat a comercialitzar en Europa el T-20, l'únic prototip d'aquesta categoria actualment disponible en la pràctica clínica. Actuen evitant la fusió entre el virus i la cèl·lula, i per tant bloquegen l'entrada del VIH a l'interior

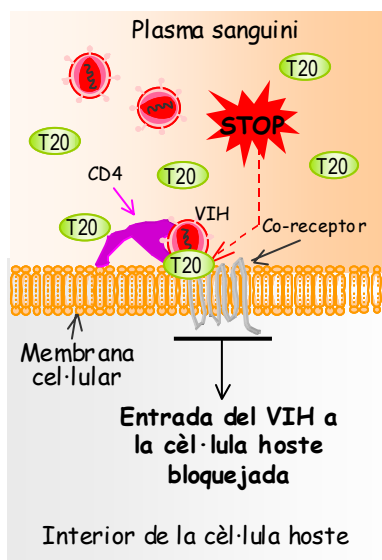


Figura 11. Mecanisme d'acció dels IF. El IF enfuvirtide (T-20) s'uneix a la proteïna gp41 del VIH, evitant així la fusió del virus amb la membrana de la cèl·lula diana.

de la cèl·lula diana, evitant així noves infeccions (veure figura 11). Es consideren molts importants perquè aquesta família d'ARVs actuen extracel·lularment i, per tant, s'espera que tinguin una baixa citotoxicitat. El T-20 és un pèptid de 36 aminoàcids que s'administra per via subcutània, com la insulina. Presenta una eficàcia limitada, però una gran tolerabilitat. El principal efecte secundari derivat de la seva administració a curt termini és una lleu reacció local a la zona de la injecció. La seva prescripció està especialment indicada en les teràpies de rescat. El desenvolupament i la comercialització del T-20, ha permès obrir una nova etapa en el tractament de la infecció pel VIH, ja que actua per un mecanisme diferent al de la resta de fàrmacs existents.

A la taula 7 s'indica l'únic fàrmac IF que es comercialitza avui dia pel tractament contra el VIH.

La investigació per al desenvolupament de nous fàrmacs, més efectius i amb menys efectes tòxics pels pacients, és avui dia una tasca molt activa. En aquest sentit, s'estan estudiant possibles dianes terapèutiques, com el **receptor CD4** que permet la unió del virus a la cèl·lula, i els **co-receptors** necessaris per la fusió virus-cèl·lula que, de la mateixa manera que els IF, actuarien evitant l'entrada del VIH a l'interior cel·lular. Una altra diana en

desenvolupament ve representada per la **integrasa del VIH**. Actualment, s'estan assajant fàrmacs inhibidors de la integrasa, que bloquegen la incorporació del genoma víric al nucli. Possiblement, en els propers anys hi hagi disponibles nous fàrmacs, tant de les tres famílies ja existents, com d'altres diferents. També s'està incrementant l'estudi en el camp de la immunoteràpia, que pot suposar una nova alternativa terapèutica en el futur. Consisteix en potenciar una combinació TARGA amb un tractament immunomodulador, basat en la utilització d'interferó, interleuquina, hidroxiurea, etc., que potencialment pot produir un efecte ARV addicional.

Taula 7. Fàrmacs antiretrovirals 2005.

Classe	Nom Genèric	Nom comercial	Data aprovació per la FDA
ITIAN	Abacavir sulfat (ABC)	Ziagen	Desembre 1998
	Didanosina (ddl)	Videx	Octubre 1991
	Lamivudina (3TC)	Epivir	Novembre 1995
	Estavudina (d4T)	Zerit	Juny 1994
	Tenofovir disoproxil fumarat (TDF)	Viread	Octubre 2001
	Zalcitabina (ddC)	Hivid	Juny 1992
	Zidovudina (AZT, ZDV)	Retrovir	Març 1987
	Emtricitabina (FTC)	Emtriva	Juliol 2003
	FTC + TDF	Truvada	Agost 2004
	3TC + AZT	Combivir	Setembre 1997
	ABC + 3TC + AZT	Trizivir	Novembre 2000
ITINAN	Delavirdina mesilat (DLV)	Rescriptor	Abril 1997
	Efavirenz (EFV)	Sustiva	Setembre 1998
	Nevirapina (NVP)	Viramune	Juny 1996
IP	Amprenavir (APV)	Agenerase	Abril 1999
	Indinavir sulfat (IDV)	Crixivan	Març 1996
	Lopinavir (LPV) + Ritonavir (RTV)	Kaletra	Setembre 2000
	Nefinavir (NFV)	Viracept	Març 1997
	Ritonavir (RTV)	Norvir	Març 1996
	Saquinavir (SQV)	Fortovase	Novembre 1997
	Saquinavir mesilat (SQV)	Invirase	Desembre 1995
IF	Enfuvirtide (T-20)	Fuzeon	Març 2003

FDA: Food and Drug Administration; ITIAN: inhibidors de la transcriptasa inversa (TI) anàlegs de nucleòsid; ITINAN: inhibidors de la TI no-anàlegs de nucleòsid; IP: inhibidors de la proteasa; IF: inhibidors de la fusió.

1.3. EL MITOCONDRI

1.3.1. Origen dels mitocondris

Els orígens del descobriment dels mitocondris es remunten a mitjans del segle XIX, quan van aparèixer els primers estudis de microscopia òptica que indicaven la presència de petits grànuls en diferents tipus cel·lulars. El 1890, R. Altman va realitzar estudis de citologia que indicaven que l'estructura d'aquests grànuls era molt similar a la dels bacteris i els va anomenar 'bioplastes', considerant-los la unitat bàsica de l'activitat cel·lular. El terme 'mitochondri' (procedent del grec *mitos*: filament i *chondros*: grànul) va ser introduït per C. Benda a finals del segle XIX, pel seu aspecte de grànul filamentós. Des d'aleshores, els avenços científics i tecnològics que durant la primera meitat del segle XX van contribuir al coneixement del metabolisme energètic dels organismes aeròbics, van proporcionar les eines necessàries per investigar l'estructura i la funció mitocondrial.

L'any 1948 A. Lehninger i E. Kennedy van demostrar que el cicle dels àcids tricarboxílics i la β -oxidació es localitzen a la matriu mitocondrial, i van concloure que la fosforilació oxidativa té lloc a l'interior del mitochondri. Paral·lelament, B. Ephrussi proposà l'existència de material genètic citosòlic diferent al nuclear que podria estar directament relacionat amb aquests òrgans productors d'energia (Ephrussi B, Ann Inst Pasteur 1949).

El 1961 el bioquímic Peter Mitchell va proposar la 'Teoria Quimiosmòtica', que el va fer mereixedor del Premi Nobel de Química el 1978. La 'Teoria Quimiosmòtica' explica el mecanisme d'acoblament de la transferència d' e^- a la síntesi d'ATP (adenosina trifosfat) durant la fosforilació oxidativa, tal i com es coneix avui dia.

El 1962 R. Luft i col·laboradors (Luft R, J Clin Invest 1962) van descriure la primera malaltia produïda per una alteració mitocondrial en un pacient que presentava hipermetabolisme no tiroïdal, que va rebre el nom de malaltia de Luft. Des d'aleshores els processos patològics en els que el mitochondri s'ha vist implicat directa o indirectament han anat augmentant, de forma que, actualment hi ha més de 50 classificacions d'alteracions mitocondrials ben definides.

En quant a l'origen evolutiu dels mitocondris, una de les teories més recolzades és la 'Teoria endosimbiòtica', en la que es postula que els mitocondris dels eucariotes moderns van evolucionar fa més de mil milions d'anys a partir de bacteris aeròbics que van establir una relació d'endosimbiosi amb les cèl·lules eucariotes anaeròbics primitives, incapaces de sobreviure en una atmosfera oxidant generada per l'evolució de bacteris fotosintètics (Lang BF, Annu Rev Genet 1999). Avui dia, representa una teoria molt acceptada, ja que els mitocondris i

els bacteris comparteixen moltes característiques bioquímiques i genètiques. Actualment, moltes proteïnes mitocondrials estan codificades per gens nuclears, per la qual cosa es creu que alguns dels gens presents als bacteris autònoms originals deuen haver estat transferits a l'ADN nuclear de l'eucariota hoste durant el curs de l'evolució.

1.3.2. Característiques principals i estructura mitocondrial

Els mitocondris són orgànuls cel·lulars que es troben a la majoria de cèl·lules eucariotes i es consideren el principal centre productor d'energia química en forma d'ATP. L'ATP, imprescindible en la majoria de les vies metabòliques i en el transport de molts metabolits intermediaris, es genera majoritàriament en els mitocondris a través d'un procés de transducció d'energia anomenat 'fosforilació oxidativa', que representa el pas final del metabolisme energètic als organismes aeròbics.

Habitualment, els orgànuls mitocondrials es descriuen com a cilindres allargats d'aproximadament 1 µm de diàmetre i fins a 10 µm de llarg, similar al de les cèl·lules bacterianes. Però la seva mida, forma, nombre i localització, pot variar depenent del tipus cel·lular. Generalment, les cèl·lules de teixits metabòlicament més actius tenen més mitocondris al seu citoplasma, per on es poden desplaçar dirigits pel citoesquelet cel·lular, cap a les zones d'elevat requeriment energètic.

A més de produir més del 90% de l'ATP necessari per a la viabilitat cel·lular, els mitocondris realitzen altres funcions no menys importants: intervenen en l'homeòstasi del Ca²⁺, en la producció de calor, en la síntesi de precursors de moltes vies biosintètiques (p.e. grup hemo, porfirines, aminoàcids, nucleòtids, fosfolípids, purines i pirimidines) i estan directament implicats en els mecanismes d'apoptosi cel·lular. A més a més, els mitocondris oxiden metabolits intermediaris a través del cicle de Krebs (o cicle dels àcids tricarboxílics) i la β-oxidació dels àcids grassos. Els mitocondris estan implicats en un gran nombre de malalties humanes, en el procés natural d'envelliment i en la carcinogènesi. Aquest fet promou encara més l'estudi d'aquest orgànu cel·lular i no es descarta la seva influència en altres patologies.

Els mitocondris estan constituïts, bàsicament, per una membrana externa i una interna separades per un espai intermembrana, que en el seu conjunt engloben la matriu mitocondrial. Les dues membranes són altament especialitzades i difereixen en la seva composició bioquímica (veure figura 12). Al llarg de la membrana interna es formen una sèrie d'invaginacions anomenades 'crestes mitocondrials', que incrementen la superfície total de la membrana interna. A les crestes mitocondrials es localitza el sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS), constituït per la cadena de transport electrònic (CTE; o cadena respiratòria mitocondrial –CRM-) i el complex enzimàtic ATP sintasa, que en el seu conjunt permeten

l'oxidació de molècules orgàniques per obtenir ATP. Una activitat metabòlica cel·lular elevada implicaria major densitat de 'crestes' als mitocondris. A la matriu mitocondrial tenen lloc diverses reaccions metabòliques de vital importància, com el cicle de Krebs i la β -oxidació dels àcids grassos, que aporten el poder reductor necessari per cedir electrons (e^-) a la CTE i poder sintetitzar ATP. Cal destacar especialment que, a part del nucli, els mitocondris representen l'únic orgànul cel·lular que conté el seu propi sistema genètic, localitzat a l'interior de la matriu mitocondrial.

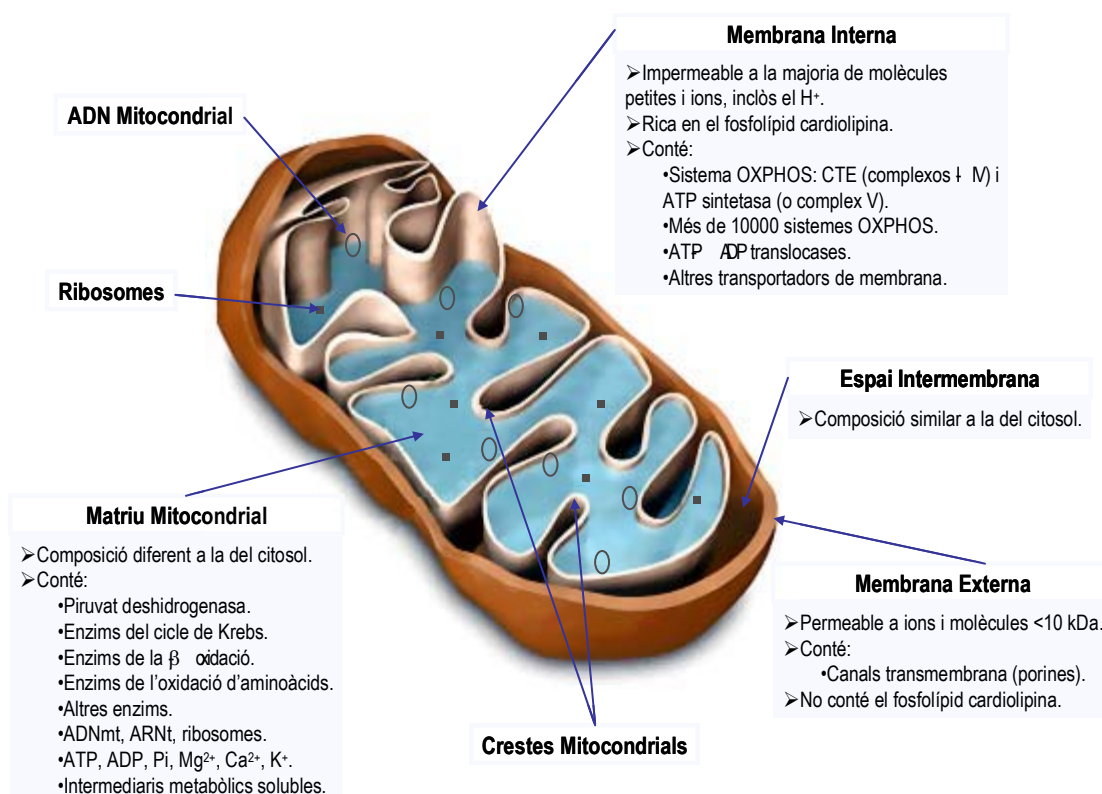


Figura 12. Estructura Mitocondrial.

1.3.2.1. El sistema OXPHOS

El sistema OXPHOS mitocondrial és el responsable del procés de fosforilació oxidativa, que implica síntesi d'ATP acoblada al consum d'oxigen (veure figura 13).

El sistema OXPHOS està constituït per la CTE, formada per 4 complexos enzimàtics que intervien en les reaccions redox (complex I –C I-, C II, C III i C IV), i per un cinquè complex

proteic responsable de la síntesi d'ATP (ATP sintasa o C V). Cada complex està format per diverses subunitats proteiques, parcialment codificades per l'ADN mitocondrial (ADNmt), a excepció del C II, que únicament està codificat pel genoma nuclear (veure taula 8). A més dels diferents complexos, també formen part del sistema OXPHOS dues molècules, que es mouen lliurement per la membrana interna mitocondrial transportant e⁻: el coenzim Q (CoQ, o ubiquinona) i el citocrom c (Cit c). En estat oxidat el CoQ i el Cit c funcionen com a acceptors d'e⁻ i en estat reduït actuen com a donadors.

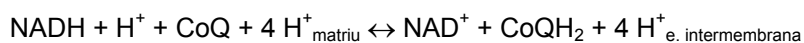
Taula 8. Codificació dual (nuclear i mitocondrial) de les subunitats proteiques dels complexos del Sistema OXPHOS.

	C I	C II	C III	C IV	C V	Total
ADN mt	7	0	1	3	2	13
ADN n	~ 39	4	10	10	12	> 75
Subunitats proteiques	~ 46	4	11	13	14	> 88

▪ Descripció funcional dels complexos enzimàtics del sistema OXPHOS

Els components de la cadena respiratòria es presenten ordenats de forma seqüencial, la qual cosa determina una gran eficiència del sistema per a la síntesi d'ATP (veure figura 13).

El primer complex enzimàtic de la CTE és el C I, també conegut com **NADH-CoQ reductasa**. La seva funció és oxidar el NADH (nicotinamida adenina dinucleòtid –reduïda-) produït a la matriu mitocondrial pel cicle de Krebs i transferir els e⁻ al CoQ per reduir-lo. Té forma de 'L', amb un braç horitzontal hidrofòbic integrat a la membrana mitocondrial interna i un braç vertical que es projecta cap a la matriu, on contacta amb el NADH. Representa el complex més gran de la cadena mitocondrial, format per ~46 subunitats proteiques (pes molecular –PM- ~1000 KDa), una de les quals és una flavoproteïna anomenada NADH deshidrogenasa (NDH), que conté el grup prostètic flavina mononucleòtid (FMN) com a primer acceptor dels e⁻ del NADH. El C I també conté 10 centres ferro-sulfurats (Fe-S) que participen en la transferència electrònica. El fluxe de 2 e⁻ des del NADH fins el CoQ a través del C I transloca 4 protons (H⁺) des de la matriu fins l'espai intermembrana. L'activitat enzimàtica del C I és específicament inhibida per rotenona, un insecticida d'origen vegetal que actua evitant el pas d'e⁻ des dels centres Fe-S al CoQ. La reacció global catalitzada pel C I és la següent:



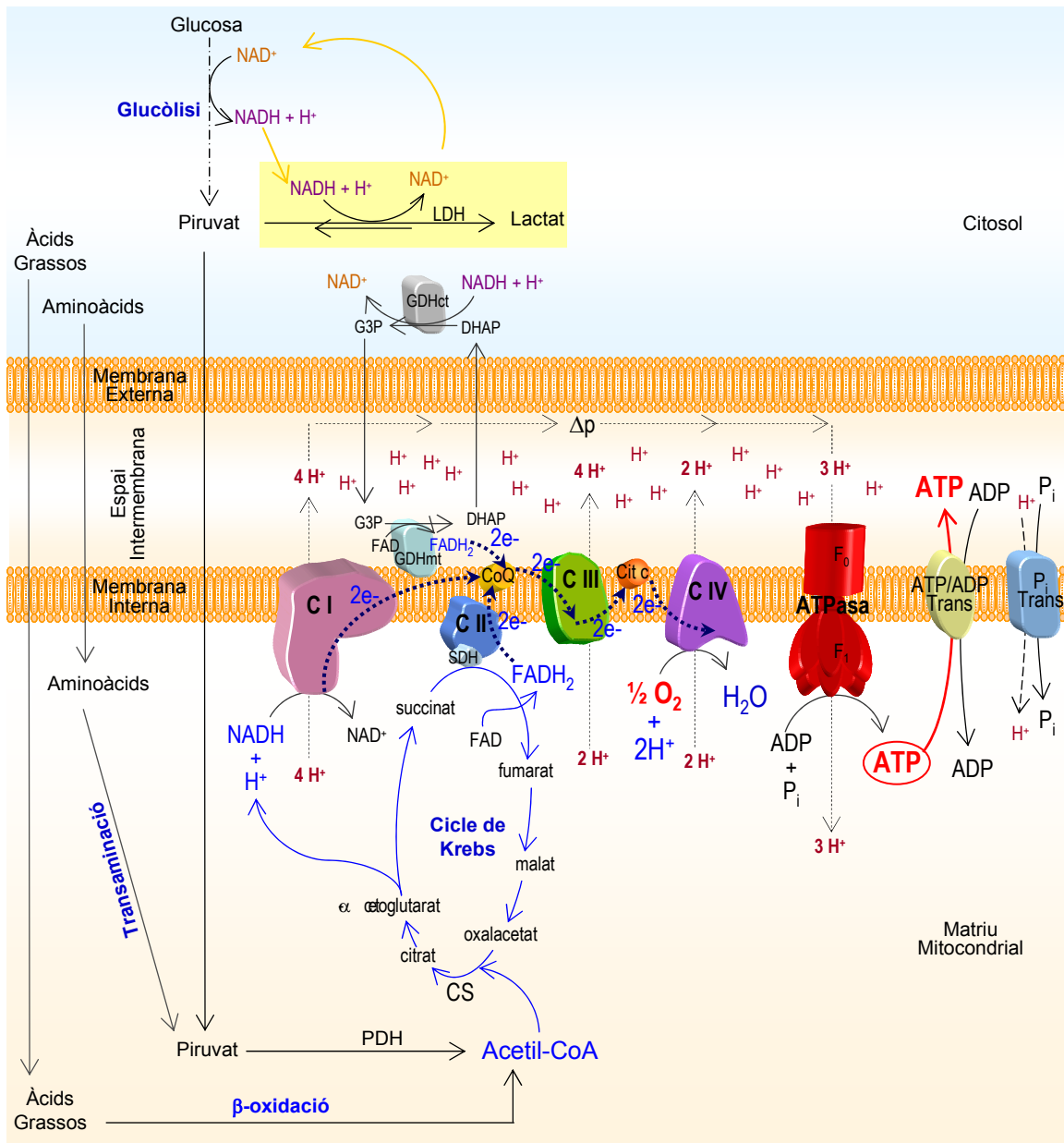
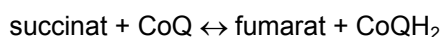


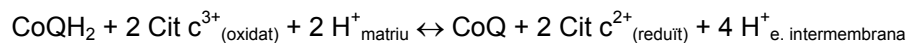
Figura 13. Esquema del metabolisme intermediari i el sistema OXPHOS. En color groc s'indica la reducció del piruvat a lactat, que es dona en condicions anaeròbiques al citosol cel·lular, per oxidar el NADH produït durant la glucòlisi. En condicions aeròbiques, el piruvat, els àcids grassos i els aminoàcids s'oxiden a Acetil-CoA, que entra al cicle de Krebs per oxidar-se completament i generar poder reductor en forma de NADH i FAD₂ que cedeixen els electrons (e-) a la CTE per la síntesi d'ATP acoblada al cosum d'oxigen. La llançadera glicerol-3-fosfat (GDHct i GDHmt) capta els e- del NADH citosòlic i els cedeix igualment a la CTE per generar energia.

LDH: lactat deshidrogenasa; PDH: pruvat deshidrogenasa; CS: citrat sintasa; GDHct: glicerol-3-fosfat deshidrogenasa citosòlica; GDHmt: glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial; G3P: glicerol-3-fosfat; DHAP: dihidroxiacetona fosfat; SDH: succinat deshidrogenasa; C I: complex I; C II: complex II; C III: complex III; C IV: complex IV; ATPasa: ATP sintetasa o complex V; CoQ: coenzim Q; Cit c: citocrom c; ATP/ADP Trans: ATP/ADP translocasa; Pi Trans: fosfat inorgànic translocasa; Δp: força protó-motriu.

El C II, conegut com **succinat-CoQ reductasa**, és el segon complex enzimàtic de la cadena mitocondrial. Es troba integrat a la membrana mitocondrial interna i realitza la transferència d'e- des del succinat produït al cicle de Krebs al CoQ. Constitueix el complex més petit, format per només 4 subunitats proteiques codificades exclusivament pel nucli cel·lular (PM ~132 KDa), una de les quals és la flavoproteïna succinat deshidrogenasa (SDH), que conté el grup prostètic FAD (flavina adenina dinucleòtid –oxidada-). El Cit b₅₅₈ i tres centres Fe-S també conformen el C II. El succinat cedeix els e- en forma de dos hidrogens al FAD, generant FADH₂ (flavina adenina dinucleòtid –reduïda-), que finalment redueix el CoQ. En aquesta etapa no es produeix translocació de protons a través de la membrana. L'activitat enzimàtica del C II és específicament inhibida per malonat, un inhibidor competitiu, que té més afinitat per la SDH que el succinat. La reacció global catalitzada pel C II és la següent:



El **CoQ** és una quinona amb una cadena lateral poliisoprenoide (CoQ₁₀, en humans), que actua de centre receptor dels e- en forma d'hidrogens procedents del C I i C II, i de donador al C III. Representa un transportador essencial de la CTE. El CoQ reduït (CoQH₂) és reoxidat pel següent complex enzimàtic, el C III o **CoQH₂-Cit c reductasa**, que transfereix els e- al transportador electrònic Cit c. El C III està format per 11 subunitats proteiques (PM ~245 KDa) i a més, conté Cit b₅₆₂, Cit b₅₆₆, Cit c₁ i un centre Fe-S. Donat que el CoQ és una molècula capaç de transportar 2 e- i els citocroms, pel contrari, només poden transportar 1 sol e-, la transferència electrònica del CoQH₂ fins el Cit c a través dels diferents components del C III (cit c₁, cit b₅₆₂, cit b₅₆₆) es realitza en dos passos gràcies a un mecanisme conegut com Cicle Q, que implica la producció del radical semiquinona (CoQH•) com intermediari (veure figura 14). En aquesta etapa el fluxe de 2 e- produeix el bombeig de 4 H⁺ a l'espai intermembrana. L'activitat enzimàtica del C III és específicament inhibida per antimicina, un antibiòtic que actua evitant la transferència d'e- del Cit b₅₆₆ a la semiquinona. La reacció global catalitzada pel C III és la següent:



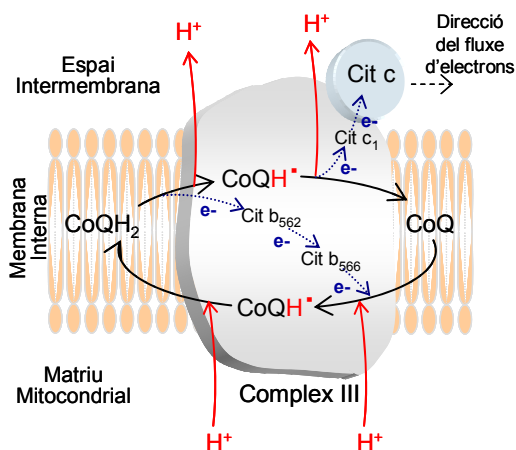


Figura 14. Ciclo Q. El Ciclo Q representa el mecanismo de transferencia d'e- del CoQH₂ al Cit c a través de l'acció enzimàtica del C III. El CoQH₂, que transporta 2 e⁻, cedeix un primer electró (e⁻) al al Cit b₅₆₂ i després al Cit b₅₆₆, alliberant un H⁺ a l'espai intermembrana. En conseqüència es produeix el radical semiquinona (CoQH[•]) com intermediari, que en ser altament inestable reacciona ràpidament transferint el segon e⁻ al Cit c₁, que redueix finalment el Cit c, i allibera un altre H⁺. En aquest moment el CoQ es presenta en la seva forma completament oxidada, però serà reduït parcialment per l'e⁻ del Cit b₅₆₆ a CoQH[•], acceptant un H⁺ de la matriu mitocondrial. La forma CoQH[•] serà reduïda completament a CoQH₂ un cop accepti un e⁻ procedent del C I o del C II i un altre H⁺ de la matriu. Per transferir els 2 e⁻ del CoQH₂ calen, doncs, dos cicles, dos Cit c i 4 H⁺ alliberats a l'espai intermembrana.

El **Cit c** és una hemoproteïna localitzada a la cara externa de la membrana interna mitocondrial que realitza la transferència d'e⁻ entre el C III i el C IV. El C IV, quart i últim complex de la seqüència conegut com **Cit c oxidasa** o COX, catalitza la transferència de 4 e⁻ des del Cit c a l'oxigen molecular (O₂) per generar dues molècules d'aigua (H₂O). El C IV està format per 13 subunitats proteïques (PM ~160 KDa), tres de les quals estan codificades pel genoma mitocondrial i representen el centre actiu del complex. A més, conté Cit a, Cit a₃ i proteïnes amb àtoms de coure (Cu_A i Cu_B) que participen en el transport electrònic cap a l'oxigen. El C IV s'inhibeix específicament per cianur (CN⁻), que actua com a lligand del grup hemo del Cit a₃ i evita la unió de l'oxigen. La reacció global catalitzada pel C IV, durant la transferència de 4 e⁻, és la següent:



L'**ATP sintasa** (ATPasa, F₀F₁-ATPasa; o C V) és un gran complex enzimàtic que es presenta integrat a la membrana mitocondrial interna. No intervé en la transferència electrònica, sinó que sintetitza ATP als mitocondris per condensació d'ADP (adenosina difosfat) i Pi (fosfat inorgànic), gràcies al gradient electroquímic de protons que es genera durant el fluxe d'e⁻ a través de la cadena mitocondrial. Està format per dues subunitats funcionals: F₀ i F₁. La **subunitat F₀** és un segment hidrofòbic integrat a la membrana mitocondrial interna que conté el canal transmembrana per on passen els protons desde l'espai intermembrana cap a la matriu mitocondrial i que impulsen la síntesi d'ATP. Consisteix en un anell format per 10-14 subunitats c i una subunitat a. El gradient de protons que es genera durant la transferència electrònica no és estrictament necessari per la síntesi d'ATP, sinó per alliberar l'ATP format del centre catalític a la matriu mitocondrial. La **subunitat F₁** es projecta cap a la matriu mitocondrial i conté

l'activitat catalítica sintasa. Està constituïda per cinc tipus de cadenes polipeptídiques (α , β , γ , δ , i ϵ) que tenen una relació estequiomètrica de 3:3:1:1:1, respectivament. Les subunitats α i β s'alternen formant un anell hexamèric. Les dues uneixen nucleòtids, però només les subunitats β participen directament en la catàlisi, mentre que les subunitats α exerceixen una funció reguladora. La part central de l'ATPasa, que connecta les subunitats F_0 i F_1 , està formada per dues proteïnes: γ i ϵ , on la subunitat γ presenta una estructura en hèlix- α que s'extén cap el centre de l'hexàmer $\alpha_3\beta_3$. Una columna exterior, formada per una subunitat a, dues subunitats b i una subunitat δ , igualment ajuda a mantenir unides les dues subunitats funcionals principals del complex.

El mecanisme detallat de síntesi d'ATP a través de l'ATPasa es basa en el model de catàlisi rotacional proposat per P. Boyer el 1997 (Boyer PD, Annu rev Biochem 1997), que representa una de les teories més recolzades (veure figura 15). D'acord amb aquest model, la subunitat γ confereix unes propietats d'unió al nucleòtid d'adenina diferents a cada subunitat β , segons la part de la subunitat γ amb la que interaccionin, la qual cosa resulta crucial per la síntesi d'ATP. D'aquesta forma, una subunitat β adopta la conformació *L* (*loose* o fixació feble) permetent la unió de l'ADP i el Pi, una altra subunitat β adopta la conformació *T* (*tight* o fixació forta) permetent la síntesi d'ATP i una altra subunitat β adopta la conformació *O* (*open* o fixació molt feble) on l'afinitat de l'enzim per l'ATP disminueix, permetent l'alliberament de l'ATP format. La interconversió de les tres conformacions ve dirigida per la rotació de la subunitat γ . En aquest sentit, la funció del complex ATPasa es pot comparar amb la funció d'una turbina que es mou per generar energia: l'anell c i la part central $\gamma\epsilon$ representen la unitat mòbil o rotor; i la columna exterior i l'anell hexamèric $\alpha_3\beta_3$ representen la unitat fixa o dinamo. Aquest model considera que l'anell c de la subunitat F_0 i la part central $\gamma\epsilon$ representen una estructura que gira en resposta a la força protó-motriu, al pas dels protons pel canal transmembrana, conferint uns canvis conformacionals en l'estructura $\alpha_3\beta_3$ que permeten la unió seqüencial d'ADP i Pi, la síntesi d'ATP i finalment l'alliberament de l'ATP a la matriu mitocondrial.

En un principi, la teoria de Boyer no fou àmpliament acceptada. En canvi, el 1994 JE Walker i el seu equip van fer servir tècniques amb raigs X per establir l'estructura de l'enzim ATPasa. La investigació de Walker va confirmar les teories de Boyer i va oferir algunes revelacions sobre el complicat procés molecular pel que l'enzim ATPasa transforma l'energia en ATP. P. Boyer i JE Walker van rebre el 1997 el premi Nobel de Química per les seves investigacions entorn el mecanisme enzimàtic que subratlla la síntesi de l'ATP.

L'activitat específica ATPasa mitocondrial és inhibida per l'antibiòtic oligomicina a nivell de la subunitat F_0 . La subunitat F_1 aïllada, o el complex F_0F_1 integrat de forma invertida en

partícules submitocondrials, catalitza la reacció contrària: la hidròlisi de l'ATP en ADP i Pi. De fet, l'ATP sintasa pertany al grup de les ATPases, que són bombes de protons depenents d'ATP que utilitzen l'energia alliberada en la hidròlisi de l'ATP per translocar protons a través de membranes contra un gradient de concentració. En canvi, quan la translocació de protons a través de la membrana es realitza a favor del gradient de concentració catalitza la síntesi d'ATP, que representa la seva funció biològica als mitocondris. La reacció global catalitzada pel C V és la següent:

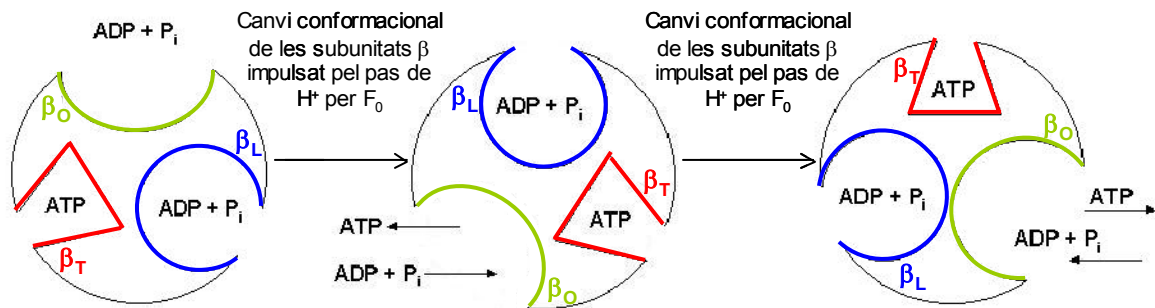
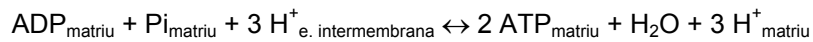


Figura 15. Mecanisme de síntesi d'ATP per l'ATP sintasa segons el model de catàlisi rotacional.

Al principi d'un cicle catalític la subunitat β de F_1 amb conformació T (subunitat β_T) està ocupada per ATP unit fortament al centre catalític de l'enzim, mentre que l'ADP i el Pi s'uneixen dèbilment a la subunitat β_L . La força protó-motriu impulsa el pas de protons a través del canal transmembrana de la subunitat F_0 i, en conseqüència, es produeix un canvi conformacional seqüencial en el que la subunitat β_T es transforma en la subunitat β_O i l'ATP es dissocia del centre actiu. La subunitat β_L adquireix la conformació β_T en el que l'ADP i el Pi es condensen ràpidament formant de nou ATP, i la subunitat β_O adopta la conformació β_L a on s'uneix dèbilment ADP i Pi.

- Transferència d'electrons a la CTE i síntesi d'ATP

En condicions aeròbies, els e- que es transfereixen a la CTE per sintetitzar ATP deriven bàsicament de l'oxidació de glúcids, àcids grassos i aminoàcids que hi ha a la cèl·lula. Tots ells formen acetil-CoA, a través de diferents reaccions catabòliques (glucòlisi, β -oxidació, i transaminació, respectivament). L'acetil-CoA entra al cicle de Krebs i completa l'oxidació dels metabòlits intermediaris, generant els cofactors NADH i FADH_2 , que transfereixen els seus e- a la cadena mitocondrial a nivell del C I i del C II, respectivament. D'altra banda, el NADH citosòlic que es produeix a la glucòlisi no pot travessar la membrana interna del mitocondri, de forma que transfereix els seus e- a la cadena mitocondrial a nivell del C III, gràcies a l'acció de

la llançadera glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (GDH), que implica l'acció de dos isoenzims: la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial (GDHmt) i la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa citosòlica (GDHct). El glicerol-3-fosfat (G3P), que es forma al citosol com a conseqüència de la degradació dels triglicèrids, entra lliurement a l'espai intermembrana del mitocondri i és oxidat a dihidroxiacetona fosfat (DHAP) per l'enzim GDHmt localitzat a la cara externa de la membrana interna mitocondrial, generant FADH_2 , que cedeix els e^- al CoQ de la CTE. La DHAP s'allibera al citosol, on es redueix a G3P per l'acció enzimàtica de la GDHct, que utilitza NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleòtid –oxidada-) com a acceptor d' e^- , a diferència de la GDHmt que utilitza FAD (veure figura 13).

Els e^- proporcionats pel metabolisme intermediari flueixen al llarg dels diferents complexos per finalment reduir una molècula d'oxigen, amb la conseqüent formació d'aigua. Aquest fluxe d' e^- és un procés exergònic, ja que els e^- flueixen espontàniament des dels transportadors que tenen un potencial de reducció estàndard (E'_0) més baix cap als que tenen un E'_0 més elevat. L'energia alliberada es fa servir per bombar protons, a nivell dels complexos I, III i IV, des de la matriu cap a l'espai intermembrana. En conseqüència, es genera un gradient electroquímic de protons, que consisteix en una diferència del potencial elèctric ($\Delta\psi$), i una diferència en la concentració d'ions hidrogen (ΔpH), que resulten de la separació d'espècies carregades a través de la membrana interna mitocondrial. El gradient de protons que es forma representa la 'força protó-motriu' (Δp^1 o $\Delta\mu\text{H}^+$) que impulsa la síntesi d'ATP a partir d'ADP i fosfat inorgànic (Pi), doncs els protons tendeixen a re-entrar, a favor del gradient electroquímic, a l'interior de la matriu a través de l'ATP sintasa. Finalment, l'ATP que s'ha format a la matriu és translocat al citosol cel·lular per enzims transportadors ATP-ADP translocases ancorats a la membrana mitocondrial interna. Al mateix temps, l'ADP és transportat per antiport amb l'ATP cap a l'interior de la matriu mitocondrial; i el Pi és cotransportat amb un protó cap a la matriu a través d'un transportador Pi translocasa per a garantir, d'aquesta forma, uns nivells adequats d'ADP i Pi durant la fosforilació oxidativa.

El sistema OXPHOS permet optimitzar el rendiment energètic de la cèl·lula. A la glucòlisi es formen, per fosforilació a nivell de substrat, només 2 molècules d'ATP per 1 molècula de glucosa oxidada. En canvi, l'oxidació completa de la glucosa a través del complex piruvat deshidrogenasa i dels enzims del cicle de Krebs, permet la fosforilació oxidativa, que genera fins a 38 molècules d'ATP per molècula de glucosa metabolitzada.

¹ $\Delta p = \Delta\psi - Z\Delta\text{pH}$; on $Z = 2.3RT/F = 59\text{mV}$

▪ Producció de lactat

Tal i com ja s'ha explicat, en condicions aeròbies la llançadera glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (GDH) actua transferint a la cadena mitocondrial els e- del NADH citosòlic produït a la glucòlisi. D'aquesta manera, el NAD⁺ que es genera tornarà a ser utilitzat a la glucòlisi per produir més NADH. D'altra banda, el piruvat entra a la matriu mitocondrial i s'oxida fins a acetil-CoA, que entra al cicle de Krebs per completar l'oxidació i derivar els e- cap el sistema OXPHOS (veure figura 13).

En condicions d'anòxia (p.e. múscul esquelètic durant exercici vigorós), la transferència d'e- a la cadena mitocondrial no es pot mantenir i el piruvat segueix una ruta catabòlica alternativa. En aquest cas, el piruvat es redueix en el citosol fins a lactat a través d'una reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH). Aquesta reacció implica la reoxidació del NADH a NAD⁺, que torna a estar disponible per a ser reduït durant la glucòlisi (veure figura 13).

En el cas d'una disfunció mitocondrial, l'oxidació aeròbica del piruvat i el NADH citosòlic es veu limitada, de forma anàloga a la situació d'anòxia tissular. Aleshores, l'oxidació del NADH necessària per mantenir els nivells cel·lulars adequats de NAD⁺ dependrà absolutament de la via alternativa en la que el piruvat es redueix a lactat. A més a més, la producció d'ATP passarà a dependre exclusivament de la via glucolítica i per tant el rendiment energètic serà més petit. En aquesta situació, es produeix un increment en la concentració del lactat a la cèl·lula, que pot augmentar fins a uns nivells patològics i manifestar-se clínicament com a hiperlactatèmia o acidosi làctica, que pot causar la mort del pacient.

1.3.2.2. *Espècies reactives d'oxigen (ROS, reactive oxygen species)*

Les molècules ROS són subproductes de la fosforilació oxidativa amb gran capacitat oxidant, que resulten altament reactives. Quan la cadena mitocondrial funciona correctament, la majoria de l'oxigen consumit pel mitocondri és convertit en H₂O per la CTE a nivell del C IV, i les molècules ROS es generen en percentatge baix (~ 4-5%). En canvi, quan hi ha una disfunció mitocondrial la quantitat de molècules ROS augmenta, de forma que resulta nociva pel mitocondri. Les molècules ROS deriven de l'oxigen molecular i es generen en forma d'ions superòxid (O₂⁻), de peròxid d'hidrogen (H₂O₂), d'anió hidroxil (OH⁻) i de peroxinitrit (ONOO⁻). L'ió O₂⁻ i el H₂O₂ són relativament estables en comparació amb els radicals OH⁻ i ONOO⁻. Tots ells són precursors del O₂⁻. El radical ONOO⁻, en concret, resulta de la reacció del O₂⁻ amb l'òxid nítric (NO), que pot estar present al mitocondri. Els punts principals de producció de O₂⁻, i conseqüentment de H₂O₂, OH⁻ i ONOO⁻, a la CTE són a nivell del C I i a nivell del C III, que contenen ubiquinona com a component comú. Es considera que l'autoxidació de la semiquinona és la responsable de la reducció monovalent de l'oxigen que dóna lloc al O₂⁻ als

mitocondris (Cadenas E, Mol Aspects Med 2004) (Cadenas E, Arch Biochem Biophys 1977). (Turrens JF, Arch Biochem Biophys 1985) (Turrens JF, Biochem.J. 1980) En general, aquests agents químics oxidants es consideren radicals lliures, doncs la majoria presenten e-desaparellats altament inestables. En condicions normals, són neutralitzats per enzims antioxidants que actuen com un mecanisme de protecció cel·lular, entre els que cal destacar la superòxid dismutasa, la catalasa o peroxidasa i la glutatió peroxidasa. La superòxid dismutasa catalitza la conversió del O_2^- a H_2O_2 , les catalases o peroxidases catalitzen la conversió del H_2O_2 a H_2O , i la glutatió peroxidasa catalitza la reducció de H_2O_2 a H_2O , la reducció d'hidroperòxids (R-OOH) intracel·lulars i de peròxids lipídics procedents de l'atac dels radicals lliures d'oxigen sobre els lípids poliinsaturats de les membranes i participa en la detoxificació de xenobiòtics com herbicides i fàrmacs. L'organisme també utilitza molècules antioxidants no enzimàtiques, com la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (àcid ascòrbic), carotenoids, quinones, glutatió, seleni, zinc, ferro, coure, etc. que ajuden a minimitzar els nivells tòxics dels radicals lliures. En situació de producció excessiva de radicals lliures, els mecanismes de protecció poden resultar insuficients i, en conseqüència, les molècules ROS produeixen dany oxidatiu mitocondrial. L'ADNmt, per la seva proximitat a la CTE on es generen els radicals lliures i la seva desprotecció proteica, resulta una diana fàcil per les molècules ROS, que poden causar lesions i mutacions en el genoma mitocondrial. Els lípids de membrana i les proteïnes mitocondrials, ja siguin les que conformen el sistema OXPHOS o les que intervenen en processos metabòlics o de transport, poden ser igualment atacades pels radicals lliures, que podrien conduir a una major disfunció mitocondrial i cel·lular (Castro L, Nutrition 2001) (Freeman BA, Lab Invest 1982). Per aquest motiu, la localització dels enzims antioxidants en relació al mitocondri és important. La superòxid dismutasa i la glutatió peroxidasa presenten dues isoformes, una citosòlica i una altra de localització mitocondrial. La catalasa, en canvi es troba als peroxisomes, però no en mitocondris. D'aquesta manera, les defenses enzimàtiques de detoxificació existeixen dintre i fora de l'organel·la.

Tot i que els mitocondris representen la principal font de generació de molècules ROS, a la cèl·lula també es generen radicals lliures a través de l'acció de diverses oxidases cel·lulars, algunes de les quals es localitzen als peroxisomes, al reticle endoplasmàtic o associades a la membrana plasmàtica. Actualment es coneix que les molècules ROS, en concentracions no citotòxiques, actuen com a molècules de senyalització i regulació de funcions cel·lulars (Gamaley IA, Int Rev Cytol 1999).

En definitiva, la generació de radicals inestables altament reactius té lloc de forma natural en processos fisiològics, i es veu incrementada en molts processos patològics. El desequilibri entre la producció de molècules ROS i la defensa antioxidant provoca un 'estrès oxidatiu' que pot conduir a una sèrie de canvis fisiològics i bioquímics, que poden provocar

disfunció i mort cel·lular. Les molècules ROS poden ser causa d'una alteració mitocondrial, en el cas d'un increment de radicals lliures provocat per una via no mitocondrial (p.e. infecció crònica, intoxicació) o degut a un funcionament incorrecte dels mecanismes cel·lulars de detoxificació. Però també poden ser efecte d'una alteració mitocondrial ja existent, que implica funcionament incorrecte del sistema OXPHOS.

1.3.2.3. *Genoma mitocondrial*

El genoma mitocondrial humà consisteix en una molècula d'ADN circular de doble cadena de 16569 pb (parells de bases) (veure figura 16) que representa al voltant del 0,5-1% del contingut d'ADN total d'una cèl·lula humana. Es localitza a l'interior de la matriu mitocondrial a prop de la membrana interna en nombre variable.

Les primeres evidències de l'existència de material genètic al citosol, diferent del nuclear, van tenir lloc el 1949 (Ephrussi B, Ann Inst Pasteur 1949) a través d'estudis en els que el material genètic citosòlic de llevats mutants estava lligat a defectes en la respiració mitocondrial. Però no va ser fins el 1963 que es va descobrir l'ADNmt com a tal (Nass MMK, J Cell Biol 1963). Des del 1981 es coneix la seqüència completa del genoma mitocondrial humà (Anderson S, Nature 1981). L'estudi de les variacions en la seqüència interindividual de l'ADNmt ha contribuït a l'estudi de les poblacions i les migracions humanes al llarg de la història de l'evolució. Aquestes variacions del genoma mitocondrial, que es generen a partir de polimorfismes procedents d'un ADNmt comú, es coneixen com haplogrups. Avui dia hi ha descrits uns 18 haplogrups diferents, alguns dels quals s'associen amb la longevitat, la malaltia de Parkinson, la diabetis i la motilitat espermàtica. Una mutació causant d'una malaltia mitocondrial pot tenir diferent efecte fenotípic segons l'haplogrup mitocondrial que es presenti, però és important tenir molt en compte l'efecte de la interacció de la variabilitat del genoma nuclear i del genoma mitocondrial. La variabilitat genètica del mitocondri també afecta a l'eficiència del sistema OXPHOS (Ruiz-Pesini E, Am J Hum Genet 2000).

La major part de les proteïnes mitocondrials estan codificades pel nucli i sintetitzades al citoplasma, des d'on seran importades cap a l'interior de l'organel·la (Walter N, Annu Rev Biochem 1997). En referència a la 'Teoria endosimbiòtica', introduïda en l'apartat 1.3.1, es creu que durant el curs de l'evolució la majoria de gens dels bacteris capaços d'assimilar l'oxigen present a l'atmosfera que van establir una relació de simbiosi amb les cèl·lules eucariotes anaeròbies fa més de mil milions d'anys han estat transferits al nucli de la cèl·lula hoste. L'ADNmt codifica un petit, però essencial nombre de proteïnes del sistema OXPHOS importants pel seu funcionament, tal i com queda reflectit per la manifestació patològica davant alteracions en la síntesi d'aquestes proteïnes (Wallace DC, Annu Rev Biochem 1992). Conté un total de 37 gens que codifiquen 13 polipèptids que formen part de quatre complexos enzimàtics

(C I, C III, C IV i C V) del sistema OXPHOS, i 22 ARN de transferència (ARNt) i 2 ARN ribosòmics (ARNr) que intervenen en el procés de traducció mitocondrial (veure figura 16). Els gens mitocondrials es repliquen, es transcriuen i es tradueixen a l'interior de la matriu, a través de processos catalitzats per enzims codificats per gens nuclears importats al mitocondri (Clayton DA, Human Reprod 2000).

A continuació es comenten les característiques que presenta el genoma mitocondrial i que són diferents a les del genoma nuclear (veure resum a la taula 10):

1. L'ADNmt té caràcter **poliploide**. A diferència del genoma nuclear diploide, que presenta únicament dues còpies de cada gen per cèl·lula, un mitocondri pot presentar entre 2-10 molècules d'ADN mitocondrial (ADNmt). Tenint en compte que una cèl·lula humana pot contenir entre 100 i 1000 mitocondris, depenent del tipus cel·lular, el nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula pot oscil·lar des de centenars fins a milers.
2. L'ADNmt està format per una cadena pesada (**cadena H**, heavy) i una cadena lleugera (**cadena L**, light). Presenten diferent densitat degut a que tenen diferent contingut de guanines (G) i timines (T), que és superior en la cadena H.

La majoria dels gens estan codificats a la cadena *H*, doncs conté informació per les subunitats ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L i ND5 del C I, pel Cit c del C III, per les subunitats COX I, COX II i COX III que són les subunitats catalítiques del C IV, per les subunitats ATPasa 6 i ATPasa 8 del C V, pels ARNr 16S i 12S i per 14 ARNt (que donaran lloc als aminoàcids treonina –Thr-, leucina –Leu-, serina –Ser-, histidina –His-, arginina –Arg-, glicina –Gly-, lisina –Lys-, aspartat –Asp-, triptòfan –Trp-, metionina –Met-, isoleucina –Ile-, leucina –Leu-, valina –Val- i fenilalanina –Phe-). En canvi, la cadena *L* només conté informació per la subunitat ND6 del C I i per 8 ARNt (que donaran lloc als aminoàcids prolina –Pro-, glutamat –Glu-, serina –Ser-, tirosina –Tyr-, cisteïna –Cys-, asparagina –Asn-, alanina –Ala- i glutamina –Gln-).

3. L'ADNmt es replica de forma no sincrònica amb la divisió cel·lular. Presenta dos orígens de replicació: un per la cadena H (O_H) i un altre per la cadena L (O_L). En els últims anys, el procés de replicació mitocondrial ha suscitat certa controvèrsia entre els mitocondriòlegs. Alguns d'ells, posen en dubte el model clàssic de replicació unidireccional asimètrica de l'ADNmt proposat per Clayton, i que ha estat àmpliament acceptat durant els darrers 20 anys (Clayton DA, Hum Reprod 2000). En canvi, proposen un model de replicació simètrica de cadena conductora i retardada, anàleg al que es dona a l'ADNn amb els fragments d'Okazaki (Holt IJ, Cell 2000). Actualment aquest tema està essent objecte d'intensa investigació.

4. L'ADNmt es replica únicament i exclusivament per l'acció de l'enzim **ADN polimerasa- γ** (ADNpol- γ). És un proteïna formada per dues subunitats codificades pel nucli: una subunitat catalítica de 140 kDa codificada pel gen POLG localitzat al cromosoma 15q25, i una subunitat accessòria de 55 kDa codificada pel gen POLG2 localitzat al cromosoma 17q23-24. Un cop sintetitzada al citosol de la cèl·lula és importada a l'interior de la matriu mitocondrial per exercir la seva funció. Presenta activitat polimerasa que li permet replicar específicament l'ADNmt, i activitat exonucleasa a través de la qual pot corregir errors.
5. Es considera que l'ADNmt **no presenta recombinació genètica** (Elson JL, Am J Hum Genet 2001), tot i que actualment hi ha algun estudi que ho posa en dubte (Eyre-Walker A, J Mol Evol 2001) (Piganeau G, Mol Biol Evol 2004).
6. L'ADNmt presenta una **organització molt compactada dels gens**, de forma que totes les seqüències codificants es disposen de forma contigua sense introns o separades per només algunes bases (Anderson S, Nature 1981). A més, alguns gens estructurals, que codifiquen proteïnes, presenten alguns nucleòtids solapats amb el gen contigu. La majoria de gens estructurals no presenten codó de terminació, sinó que aquest es genera per poliadenilació post-transcripcional. Els gens que codifiquen ARNt es disposen regularment entre les seqüències codificants d'ARNr i els gens estructurals, jugant un paper important en el procés de maduració de l'ARN a partir dels transcrits policistrònics.
7. L'ADNmt conté una regió no codificant d'aproximadament 1000 pb anomenada bucle de **desplaçament** (bucle D), situada entre els gens ARNt^{Phe} i ARNt^{Pro}. És una estructura de triple hèlix que es forma en les fases inicials de la replicació a partir d'un segment d'ADN de la cadena *H* que s'està formant, quan aquesta es desplaça i s'uneix a la cadena *L* parental. Presenta l'origen de replicació de la cadena *H* (O_H) i els promotors de la transcripció de les dues cadenes. A més, conté seqüències conservades que regulen l'inici de la replicació i transcripció del genoma mitocondrial. La regió del bucle D és una regió de control en la que també es troben zones amb una elevada variabilitat de seqüència i mida entre diferents espècies, conegudes com 'zones hipervariables'. L'ADNmt conté una segona regió no codificant més petita, d'uns 30 pb, que conté l'origen de replicació de la cadena *L* (O_L).
8. L'ADNmt **s'hereda exclusivament per via materna**. L'Oòcit, amb ~100.000 molècules d'ADNmt, és el que aporta quasi la totalitat de mitocondris en el moment de la fecundació. L'espermatozou concentra els seus mitocondris a la cua per impulsar el moviment cap a l'oòcit i finalment només aporta el nucli. Hi ha evidències de que

l'ADNmt patern que s'ha pogut transmetre a l'oòcit s'elimina a l'inici de l'embriogènesi a través d'un mecanisme dependent d'ubiquitina (Sutovsky P, Biol Reprod 2000) (Cummins JM, Zygote 1998) (Shitara H, Genetics 2000). Tot i que s'ha descrit algun cas d'herència d'ADNmt patern en humans (Schwartz M, N Engl J Med 2002), la seva transmissió i permanència a l'oòcit resulta tan excepcional que, segons les dades que actualment disposem, es considera conseqüència d'algun error en el mecanisme d'eliminació de l'ADNmt aportat per l'espermatozou.

9. L'ADNmt es distribueix a l'atzar a les cèl·lules filles per **segregació mitòtica**, ja que durant la divisió cel·lular els mitocondris es reparteixen aleatòriament entre les cèl·lules que s'estan generant. En conseqüència les cèl·lules poden rebre diferent contingut d'ADNmt salvatge i mutat que poden coexistir en percentatge variable en un mateix mitocondri, en una mateixa cèl·lula o en un mateix teixit, donant lloc al concepte d'**heteroplàsmia**. En aquest contexte, qualsevol teixit és susceptible de presentar certs nivells d'heteroplàsmia, donant lloc a diferents fenotips: homoplàsmia salvatge, heteroplàsmia salvatge, heteroplàsmia mutant, homoplàsmia mutant. El fenotip s'expressa d'acord amb un **efecte llindar**, que fa referència al percentatge de molècules d'ADNmt mutades necessàries per a que la mutació s'expressi fenotípicament. Si el nombre de molècules d'ADNmt mutades és inferior al llindar fenotípic es produirà una complementació de la funció per part de les macromolècules normals (ARNt, ARNm i subunitats proteiques) que la cèl·lula disposa en reserva. Quan se supera el llindar fenotípic, la proporció de molècules anormals és tan gran que la complementació (Rossignol R, Biochem J 2003) es fa més difícil i, en conseqüència la producció energètica a la cèl·lula o teixit resulta insuficient pel seu funcionament normal, fins que s'adquireix un fenotip patològic. Cal tenir en compte que el llindar fenotípic pot variar d'un teixit a un altre, degut a que els requeriments energètics són particulars de cada teixit, per això un determinat percentatge de molècules d'ADNmt mutades pot tenir repercussions completament diferents segons sigui l'òrgan afectat, des de no tenir repercussió en el funcionament fins a alterar-lo significativament. Els teixits que resultaran més afectats per un cert nivell d'heteroplàsmia seran aquells que presentin més dependència de la fosforilació oxidativa per obtenir ATP, i que per tant tinguin major nombre de mitocondris o molècules d'ADNmt. Si a més aquests teixits són postmitòtics, encara serien més vulnerables, doncs la seva capacitat per eliminar els mitocondris afectats serà menor. En aquest sentit, els òrgans o teixits que més afectació pateixen quan es dona una alteració mitocondrial suficientment important com per a què hi hagi expressió clínica són el sistema nerviós (incloent retina -ulls- i sistema auditiu), el múscul, el cor, el

pàncreas, el ronyó i el fetge. El llindar per a l'expressió fenotípica de les malalties mitocondrials clàssiques pot arribar a requerir fins el 80-95% d'ADNmt mutat, depenent del tipus de mutació o alteració i del teixit afecte, de forma que tan sols amb el 20% del genoma mitocondrial salvatge s'expressa un fenotip normal (White AJ, Sex Transm Inf 2001) (Rossignol R, 2003). La funció mitocondrial juga un paper tan important per la viabilitat cel·lular que la natura ha situat aquest percentatge o llindar fenotípic en un valor elevat com a mecanisme de protecció per a compensar d'alguna manera la gran taxa de mutació de l'ADNmt i la manca d'un mecanisme de reparació d'errors eficient.

- 10. El codi genètic mitocondrial difereix de l'universal** en cinc codons: UGA codifica Trp en comptes de ser un codó de terminació; AGA i AGG són codons de terminació en comptes de codificar Arg; AUA i AUU codifiquen Met en comptes de Ile. A més, els codons AUA, AUU i AUG són els tres codons d'inici possibles (veure taula 9).

Taula 9. Diferències entre codi genètic mitocondrial i el codi genètic universal.

Codó	ADNn	ADNmt
UGA	STOP	Trp
AGG, AGA	Arg	STOP
AUA, AUU	Ile	Met i inici
AUG	Met i Inici	Inici

- 11. L'ADNmt presenta una elevada taxa de mutació**, que pot ser 10-20 vegades superior a la de l'ADNn. L'increment de mutacions al genoma mitocondrial pot ser induït per:

- Excés d'**espècies reactives d'oxigen** (ROS, *reactive oxygen molecules*) generades per un funcionament incorrecte del sistema OXPHOS, que poden danyar l'ADNmt. Aquest efecte nociu està afavorit pel fet que l'ADNmt està en contacte amb la membrana mitocondrial interna i, per tant, molt a prop de la CRM que genera les espècies ROS.
- L'ADNmt **no es presenta associat a proteïnes i no conté histones**, per tant es troba completament desprotegit en un ambient hostil.

➤ L'ADNmt no disposa de mecanismes de reparació d'errors eficients (Shen CC, Mutat Res 1995) (Stierum RH, Nucleic Acids Res 1999).

12. Les dues cadenes d'ADNmt es transcriuen en forma de tres molècules policistròniques, que per un procés proteolític generen finalment els ARNm, ARNt i ARNr madurs.

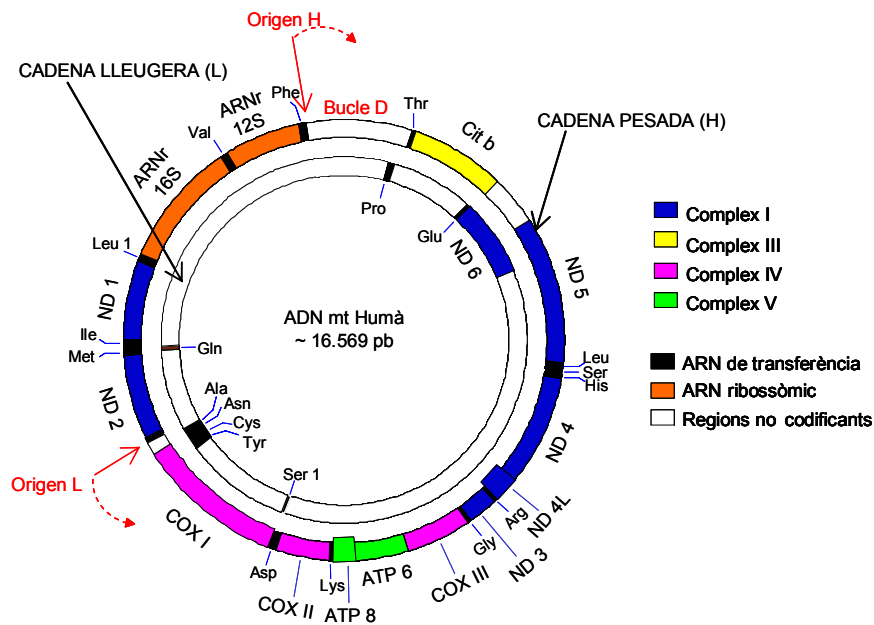


Figura 16. Estructura del Genoma Mitocondrial. L'ADN mt humà és una doble hèlix circular de ~16,6 Kb (kilobases), que presenta una estructura altament compactada.

Taula 10. Característiques de l'ADN mitocondrial.

<ul style="list-style-type: none"> ▪ ADN circular de doble cadena (H i L) (16.569 pb). ▪ Caràcter poliploide. ▪ Herència exclusivament materna. ▪ Segregació mitòtica a l'atzar. Heteroplàsmia. ▪ Estructura molt compactada, sense introns i gens solapats. ▪ Taxa de mutació 10-20 vegades superior a la de l'ADNn: afavorida per molècules ROS, per la manca d'histones i per mecanismes pobres de reparació. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Replicació exclusiva per l'ADNpol-γ. ▪ Conté dos orígens de replicació (O_H i O_L). ▪ Replicació no sincrònica amb la divisió cel·lular. ▪ Codi genètic diferent de l'universal. ▪ No presenta recombinació genètica. ▪ Es transcriu en forma de 3 molècules policistròniques. Un cop processades s'originen els 2 ARNr, 13 ARNm i 22 ARNt madurs.
--	---

1.3.2.4. Malalties mitocondrials

L'interès per l'estudi de les alteracions mitocondrials es va iniciar el 1962 amb la descripció de la malaltia de Luft, associada a un desacoblament del sistema OXPHOS (Luft R, J Clin Invest 1962). Des d'aleshores les alteracions de la funció mitocondrial han estat lligades a un ampli espectre de patologies, que han estat reagrupades sota el nom d'encefalomiopaties mitocondrials o, més correctament, malalties mitocondrials (DiMauro S, Brain Pathol 2000) (Donald RJ, N Engl J Med 1995) (Andreu AL, Neurologia. 2004) (Andreu AL, J Neurol. 2003).

Donat que totes les cèl·lules humanes contenen mitocondris (a excepció dels glòbuls vermells, que realitzen la respiració anaeròbia), qualsevol sistema de l'organisme pot resultar una diana de les malalties mitocondrials. Una de les característiques principals de les malalties mitocondrials és la gran heterogeneïtat clínica que presenten, que comprén des de miopaties, encefalomiopaties, cardiopaties, fins a afectacions multisistèmiques complexes. De fet, una mutació concreta en l'ADNmt pot donar lloc a diferents variants fenotípiques i diferents defectes moleculars poden confluïr en una mateixa manifestació clínica. Aquesta àmplia heterogeneïtat patològica es deu principalment 1) a la gran variabilitat genètica que introdueix l'heteroplàsmia, 2) a diferències en la distribució de la mutació entre els diversos teixits, 3) a diferències en els requeriments energètics de cada teixit i 4) a diferències en la capacitat dels teixits d'eliminar els mitocondris anòmals.

Durant l'oogènesi i les fases inicials de l'embriogènesi es produeix un efecte de 'coll d'ampolla' en la segregació mitòtica de les molècules d'ADNmt (Marchington DR, Am J Hum Genet 1998). Aquest fenomen es basa en el fet que durant l'oogènesi el nombre de mitocondris augmenta de forma molt considerable, mentre que el nombre de molècules d'ADNmt no ho fa amb la mateixa proporció. D'aquesta manera, el contingut d'ADNmt per mitocondri disminueix dràsticament fins una ratio ADNmt/mitocondri propera a 1. En conseqüència, la transmissió de mitocondris amb un contingut molt reduït d'ADNmt a les generacions futures, disminueix considerablement la variabilitat genètica mitocondrial. Segons aquest fenomen, els oòcits són majoritàriament homoplàsmics, amb molècules d'ADNmt normals, de forma que el genotip mitocondrial en un individu al naixement sol ser homoplàsmic, amb la majoria de còpies d'ADNmt idèntiques. Ocasionalment, pot haver-hi una subpoblació d'ADNmt mutat a la línia germinal i, aleshores, la segregació mitòtica dels mitocondris que es dona de manera aleatòria durant la divisió cel·lular, produeix diferències en el percentatge de molècules d'ADNmt mutades entre germans i entre generacions. Quan l'heteroplàsmia està present durant l'embriogènesi, la segregació a l'atzar dels mitocondris genera diferències en el percentatge de molècules d'ADNmt mutades entre els diferents teixits, en canvi, durant el desenvolupament d'un individu les diferències es donen entre les cèl·lules d'un mateix teixit.

Els defectes mitocondrials poden afectar a molts sistemes fisiològics, en especial a aquells que requereixen una elevada activitat mitocondrial pel seu funcionament normal, com els sistemes muscular, nerviós, endocrí, auditiu i visual. Igualment, es troben especialment afectats aquells teixits postmitòtics (p.e múscul esquelètic, cèl·lules nervioses i pàncreas) que pel seu elevat grau d'especialització cel·lular han entrat en la fase G₀ del cicle cel·lular i no es divideixen, amb la qual cosa la capacitat d'eliminar els mitocondris anormals es veu reduïda. En aquest sentit les manifestacions clíniques més freqüents són alteracions neuromusculars, sordesa, estatura baixa, ceguesa, pancreatitis, diabetis, hepatopatia, cardiomiopatia i acidosi làctica. A nivell histològic, les alteracions mitocondrials es caracteritzen en el múscul per presentar mitocondris anormalment grans, que s'acumulen a nivell subsarcolèmic formant el que es coneix com a fibres roges-desestructurades (ragged-red fibers, -RRF-). Igualment, es poden detectar alteracions funcionals dels mitocondris a través de tincions immunohistoquímiques específiques a nivell del C IV i del C II de la cadena mitocondrial. En aquest sentit, les cèl·lules amb disfunció mitocondrial es caracteritzen per una disminució de la reacció immunohistoquímica amb la citocrom c oxidasa, el que es coneix com a 'cèl·lules COX negatives'; i un augment de la reacció amb la succinat deshidrogenasa, que es coneix com a 'cèl·lules SDH positives'. El perfil histològic d'una alteració mitocondrial també pot descriure inclusions lipídiques en les cèl·lules afectes.

Actualment hi ha identificades unes 200 **mutacions puntuals** en l'ADNmt, que afecten tant a gens estructurals que codifiquen polipèptids del sistema OXPHOS, com a gens que codifiquen ARNt i ARNr mitocondrials (<http://www.mitomap.org>) i que s'associen a diversos fenotips patològics (Zeviani M, Molecular Human Reproduction 1997). La majoria són d'herència materna, però també poden ser esporàdiques. Igualment, s'han identificat més de 100 **delecions** i unes 17 **duplicacions o insercions** d'algun fragment de l'ADNmt, que coexisteixen en heteroplàsmia amb molècules d'ADNmt normals (<http://www.mitomap.org>). Les delecions simples i duplicacions es consideren reordenaments esporàdics que es generen durant l'embriogènesi, tot i que en algun cas s'han descrit en oòcits i per tant també, en aquests casos, es podrien transmetre per via materna (Chen X, Am J Hum Genet. 1995). S'associen freqüentment a tres fenotips patològics: la síndrome de Kearns Sayre (KSS) (Zeviani M, Neurology 1988), l'oftalmoplegia externa progressiva (PEO) (Moraes CT, N Engl J Med 1989) i la síndrome de Pearson (Casademont J, Hum Mol Genet. 1994) (Odoardi F, Am J Med Genet A 2003). Donada la compactació del genoma mitocondrial, les delecions simples o múltiples, impliquen la pèrdua completa o parcial de gens mitocondrials. També, s'han descrit casos de **depleció del genoma mitocondrial**, que es defineix com una reducció del contingut total de molècules d'ADNmt. La depleció de l'ADNmt, causada específicament per alguns fàrmacs ARVs, representa una de les alteracions genètiques que es tractarà en profunditat en aquesta

Tesi (veure secció 1.4). A diferència de les duplicacions, delecions i mutacions puntuals, la depleció no implica l'alteració de la seqüència de nucleòtids, sinó que genera una disminució dels productes gènics mitocondrials imprescindibles pel correcte funcionament del sistema OXPHOS, la qual cosa podria conduir a una disminució de la capacitat cel·lular per generar energia. Molts pacients afectes de la síndrome de depleció d'ADNmt presenten hipotonia i acidosi làctica o disfunció hepato-renal des dels primers dies de vida (Tritschler HJ, Neurology 1992) (Morris AA, J Hepatol 1998). La majoria moren en els primers anys d'edat, depenent de la severitat de la depleció, que pot oscil·lar en els teixits afectes des d'un 70% fins a un 98% en les formes més greus. Malgrat no es coneix el mecanisme exacte a través del qual es produeix la síndrome de depleció del genoma mitocondrial en aquests pacients, estudis realitzats *in vitro* indiquen que està causada per un defecte en la intercomunicació genòmica, en la que una mutació en algun gen nuclear, implicat en el control de la biogènesi mitocondrial, interfereix en la regulació de la quantitat de l'ADNmt (Taanman JW, Hum Mol Genet 1997) (Bodnar AG, Am J Hum Genet 1993). De fet, qualsevol defecte en algun punt de la replicació pot alterar el nombre de còpies d'ADNmt (Hirano M, Brain Pathol 2000). Les delecions múltiples, presents en algunes malalties mitocondrials, també s'associen a defectes en la intercomunicació genòmica interferint, en aquest cas, en la regulació de la integritat de l'ADNmt. També s'han descrit fins a 54 mutacions que afecten al gen nuclear POLG, que codifica la subunitat catalítica de l'ADNpol- γ humana, únic enzim responsable de la replicació i correcció de l'ADNmt. Les alteracions mitocondrials degudes a defectes en el gen POLG són mutacions puntuals, depleció i delecio de l'ADNmt, associades a diverses patologies mitocondrials (p.e. PEO, síndrome d'Alpers, infertilitat masculina) (<http://dir-apps.niehs.nih.gov/polg/>). En general, les mutacions puntuals en gens nuclears associats a la biogènesi mitocondrial no han estat tan estudiades, però són actualment objecte d'intensa investigació.

Les alteracions mitocondrials adquirides no són menys importants que els defectes primaris que s'han comentat, doncs tenen una gran repercussió patològica. En aquest sentit, s'ha demostrat l'efecte negatiu sobre els mitocondris de tòxics com el fum del tabac (Cardellach F, J Toxicol Clin Toxicol 2003), el monòxid de carboni (CO) (Miró Ò, Med Clin (Barc) 2004) (Cardellach F, N Engl J Med. 2003) (Alonso JR, Pharmacol Toxicol 2003) (Miró Ò, Toxicol Lett 1999) (Miró Ò, Pharmacol Toxicol 1998) (Zhang J, J Clin Invest 1992), l'òxid nítric (NO) (Maneiro E, Ann Rheum Dis 2005) (Xu W, Cell Res 2005), l'etanol (Fiamingo FG, Biochemistry 1990) (Hajnoczky G, Alcohol Clin Exp Res 2005) (Xu Y, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2005) (Venkatraman A, J Biol Chem 2004) (Hoek JB, Gastroenterology 2002), la fialuridina (McKenzie R, N Engl J Med 1995), i alguns fàrmacs ARVs utilitzats per a tractar la infecció pel VIH. En referència a aquest últim, el 1990 es va descriure per primera vegada una forma de depleció d'ADNmt adquirida en pacients infectats per VIH tractats amb zidovudina (AZT), que

podia estar produïda per inhibició de l'ADNpol- γ induïda pel fàrmac ARV administrat (Dalakas MC, N Engl J Med 1990) (Herzberg NH, Muscle Nerve 1992). Aquest tema, serà àmpliament tractat en la secció 1.4.1 sobre la toxicitat mitocondrial deguda als ARVs. Igualment, la implicació mitocondrial en moltes altres patologies actualment està essent objecte d'intensa investigació i controvèrsia. Algunes d'aquestes patologies són l'esquizofrènia (Ben-Shachar D, Int Rev Neurobiol 2004) (Ben-Shachar D, J Neurochem 2002), l'Alzheimer (Casademont J, Aging Clin Exp Res. 2005) (Casademont J, J Neurol Sci. 2003) (Rodríguez Santiago B, Rev Neurol. 2001) (Rodríguez-Santiago B, Eur J Hum Genet. 2001) (Zhu X, Am J Alzheimers Dis Other Demen 2004), el càncer (Erol A, Med Hypotheses 2005) (Mallery SR, Carcinogenesis 2004) (Herrmann PC, Proteomics 2003), l'esclerosi lateral amiotròfica (Vijayvergiya C, J Neurosci 2005) (Xu Z, J Bioenerg Biomembr 2004), la malaltia de Parkinson (Cardellach F, Neurology. 1993), l'esclerosi múltiple (Andrews HE, Med Hypotheses 2005), algunes formes de diabetis mellitus tipus II (Lowell BB, Science 2005), algunes alteracions de la còrnia (Atilano SR, Invest Ophthalmol Vis Sci 2005) i l'envelliment (Barrientos A, Brain Res Mol Brain Res. 1997) (Barrientos A, Biochem Mol Med. 1997) (Singh KK., Ann N Y Acad Sci 2004).

Davant d'aquest escenari tan complex, on l'extrema variabilitat d'expressió fenotípica de les malalties mitocondrials moltes vegades dificulta el diagnòstic, es fa necessari un abordatge metodològic ampli que englobi simultàniament dades clíniques, histològiques, bioquímiques i genètiques.

1.3.3. Mitocondri i apoptosi

El procés d'apoptosi, també conegut com a mort cel·lular programada, consisteix en un programa fisiològic de suïcidi cel·lular, que resulta essencial pel desenvolupament i per l'homeòstasi (o control del nombre cel·lular) dels teixits proliferatius als organismes pluricel·lulars. Les alteracions en el control del procés normal d'apoptosi (inhibició o activació) s'associen amb processos patològics, com per exemple malalties neurodegeneratives, càncer o sida.

Cal tenir en compte que la mort d'un teixit es pot donar per necrosi o per apoptosi, dos processos cel·lulars amb aspectes morfològics, mecanismes de regulació i significat biològic diferents.

Les cèl·lules que entren en apoptosi mostren una sèrie d'alteracions morfològiques i bioquímiques característiques (veure taula 11): agregació de la cromatina, condensació nuclear i citoplasmàtica, fragmentació de l'ADNn i trencament cel·lular. El trencament de les cèl·lules genera la formació de petites vesícules envoltades de membrana anomenades 'cossos apoptòtics', que seran finalment reconeguts i eliminats *in vivo* pels macròfags. Donada

l'eliminació eficient de les cèl·lules apoptòtiques, el procés d'apoptosi no produeix una resposta inflamatòria.

Els mitocondris representen un centre clau en el desencadenament del procés d'apoptosi (Green DR, Science 1998). Estan implicats en les dues vies principals d'apoptosi actualment acceptades com a models de mort cel·lular: la via intrínseca i la via extrínseca, en les que les cisteïna-proteases cel·lulars, conegudes com caspases, representen el centre efector de l'apoptosi (veure figura 17).

La via d'apoptosi extrínseca està mediada per receptors cel·lulars. La unió del lligand inductor de l'apoptosi (p.e. FasL, TNF- α) al seu receptor desencadena l'activació al citosol de la caspasa-8, que activa per proteòlisi la proteïna proapoptòtica Bid, de la família de proteïnes Bcl-2. La proteïna activa Bid truncada (Bidt) es transloca al mitocondri on interacciona amb altres membres proapoptòtics de la família Bcl-2, com la proteïna Bax. A continuació, el procés apoptòtic succeeix des del mitocondri, punt on conflueix amb la via d'apoptosi intrínseca. La caspasa-8 activada també pot activar directament altres membres de la família de les caspases (concretament, activa la caspasa-3 efectora), i induir el procés apoptòtic sense la participació mitocondrial. Tot i així, la implicació mitocondrial en l'apoptosi mediada per factors extrínsecs, magnifica el senyal d'activació del programa de mort cel·lular iniciat per la caspasa-8, a través de l'alliberació de molècules proapoptòtiques mitocondrials.

La via d'apoptosi intrínseca està regulada pels mitocondris, que inicien el procés apoptòtic quan esdevé una situació d'estrès cel·lular (p.e. per privació de nutrients, disminució de la concentració d'ATP cel·lular, manca de factors de creixement, alteracions hormonals, dany a l'ADN, etc.), que condiciona el funcionament normal de les cèl·lules.

Els senyals intracel·lulars o extracel·lulars que indueixen l'apoptosi alteren l'equilibri de diferents proteïnes proapoptòtiques (per exemple, bax) i antiapoptòtiques (per exemple, bcl-2) en el mitocondri. La ràtio bax/bcl-2 regula la permeabilitat de la membrana mitocondrial externa. Quan l'equilibri entre les dues proteïnes es desplaça cap a bax, s'afavoreix el procés apoptòtic. Aleshores, es forma un porus de transició (*PTP*; *permeability transition pore*) que fa la membrana mitocondrial externa més permeable. En conseqüència, es perd el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mt}$), i es produeix l'alliberament al citosol cel·lular de diferents proteïnes apoptogèniques mitocondrials, com per exemple, citocrom c, *SMAC-Diablo* (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*, o la seva forma homòloga al ratolí, anomenada *DIABLO*) i el factor d'inducció de l'apoptosi (*AIF*; *apoptosis inducing factor*). El citocrom c interacciona i s'uneix amb la proteïna citosòlica APAF-1, que a la vegada interacciona amb la procaspasa-9 per formar el complex multiproteic conegut com apoptosoma. La formació de l'apoptosoma indueix l'activació per proteòlisi de la caspasa-9, que successivament activa la

caspara-3 efectora. La caspara-3 efectora indueix l'activació irreversible d'una cascada de reaccions catalitzades per caspases, que dirigeixen l'activació d'altres caspases per proteòlisi, per finalment activar la proteïna ADNasa activada per caspara (*CAD; caspase activated DNAase*), encarregada de la degradació de l'ADNn, que finalment conduirà a la mort cel·lular.

Taula 11. Característiques de l'apoptosi cel·lular.

Característiques Morfològiques
<ul style="list-style-type: none"> • Contracció del citoplasma i condensació nuclear (a l'inici del procés apoptòtic). • Agregació de la cromatina a la membrana nuclear. • Permeabilització de la membrana externa mitocondrial per formació del porus de transició (<i>PTP; permeability transition pore</i>), que implica la participació de proteïnes de la família Bcl-2. • Fragmentació de l'ADNn i fragmentació cel·lular en petites vesícules o 'cossos apoptòtics' (al final del procés apoptòtic).
Característiques Bioquímiques
<ul style="list-style-type: none"> • Regulació molt estricta. Implica l'acció enzimàtica de caspases específiques (cisteïna-proteases citosòliques) i d'altres proteïnes i molècules citosòliques i mitocondrials. • Procés actiu, dependent de l'ATP. • Els fragments d'ADNn tenen una longitud mono- i oligonucleosomal (de 180pb o múltiples). • Alliberament al citosol de citocrom c i el factor inductor de l'apoptosi (<i>AIF; apoptosis inducing factor</i>) pels mitocondris. • Activació d'una cascada de reaccions catalitzades per les caspases. • Canvis en l'assimetria de la membrana plasmàtica (translocació de la fosfatidilserina des de la cara citosòlica a la cara extracel·lular de la membrana).
Significat fisiològic
<ul style="list-style-type: none"> • Afecta a cèl·lules individuals. • S'indueix per un estímul fisiològic (estrés cel·lular, receptors cel·lulars, radiació UV, tòxics, etc.). • Eliminació de les cèl·lules apoptòtiques per fagocitosi. • No produeix resposta inflamatòria.

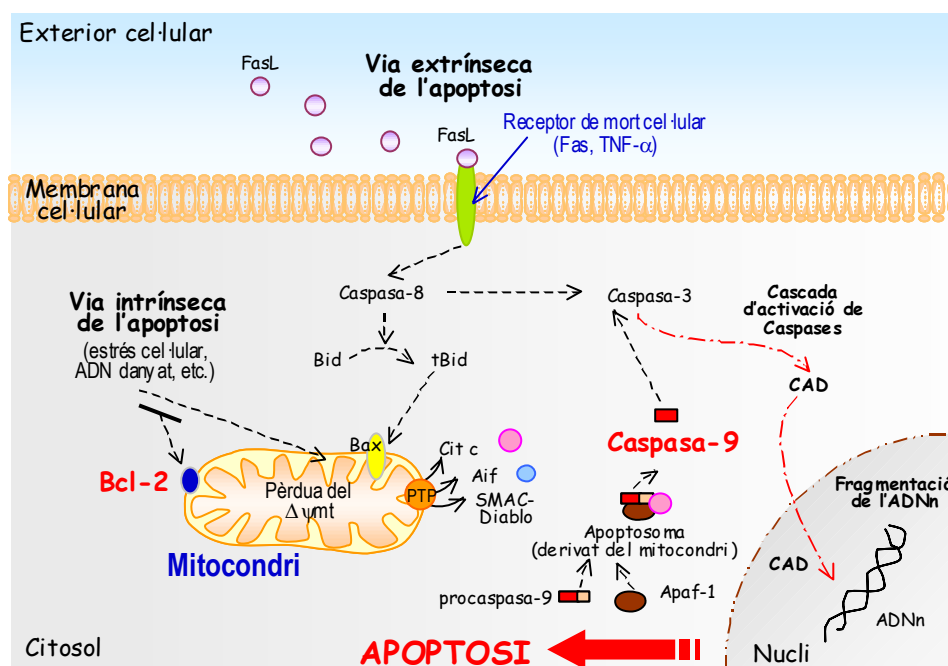


Figura 17. Procés d'apoptosi cel·lular. Descripció de la seqüència de reaccions que se succeeixen durant l'activació del programa de mort cel·lular programada a través de la via extrínseca, mediada per receptors cel·lulars, i a través de la via intrínseca, mediada per senyals intracel·lulars que desencadenen la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mt}$). Les caspases i els mitocondris tenen una participació clau durant l'execució del programa apoptòtic.

1.3.4. Les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) com a model d'estudi de la funció mitocondrial

Idealment, l'estudi de la funció mitocondrial es realitza en teixit muscular esquelètic, per ser aquest un teixit diana de les alteracions mitocondrials. El múscul és un teixit amb un elevat requeriment energètic, per aquest motiu presenta gran abundància de mitocondris al seu citoplasma cel·lular. És per tant, un teixit amb una enorme dependència de la fosforilació oxidativa per obtenir energia (ATP). Els miòcits són cèl·lules postmitòtiques i, en conseqüència, amb poca possibilitat d'eliminar els mitocondris afectats. Per aquest motiu, l'acumulació d'alteracions mitocondrials fa del teixit muscular un model d'estudi de gran sensibilitat als defectes funcionals d'aquests orgànuls cel·lulars generadors d'energia. En canvi, és necessari recórrer a la realització d'una biòpsia muscular per obtenir el teixit, fet que suposa una certa incomoditat pel pacient i fa que en ocasions no sigui possible portar-la a terme. Tot i que és menys sensible, és ben conegut que les alteracions de la funció de la CRM i de l'ADNmt de malalties mitocondrials clàssiques poden trobar-se no només al múscul esquelètic, sinó també en altres teixits, com en CMSP. Concretament, i a tall d'exemple, a la síndrome de Pearson, es

troben deleccions simples i duplicacions en l'ADNmt, juntament amb un dèficit de la capacitat oxidativa mitocondrial, tant en múscul esquelètic com en CMSP (Rotig A, J Clin Invest 1990). A la síndrome de Wolfram, es troben deleccions i una deficiència generalitzada de les activitats enzimàtiques dels complexos que conformen la cadena de transport electrònic (Rotig A, J Clin Invest 1993) (Barrientos A, Am J Hum Genet. 1996). A la síndrome de Leigh, es detecta un dèficit enzimàtic del complex II (Burgeois M, Brain Dev 1992) i a la síndrome caracteritzada per tubulopatia proximal, diabetes mellitus i ataxia cerebelosa es detecta un dèficit enzimàtic del complex III i duplicació parcial de l'ADNmt en ambdòs teixits (Rotig A, Am J Hum Genet 1992). Per aquesta raó, s'ha proposat desplaçar l'estudi de la funció mitocondrial de pacients VIH a les CMSP, ja que representen una font d'obtenció de mostres de més fàcil accessibilitat i suposa un procediment menys molest, doncs només es requereix una extracció sanguínia. A més, si es requereix un seguiment longitudinal dels pacients, amb obtenció de diverses mostres en diferents temps d'un mateix individu, les CMSP constitueixen pràcticament el teixit obligat d'estudi.

1.4. INTERACCIÓ: VIH-MITOCONDRI-ANTIRETROVIRALS

1.4.1. Fàrmacs antiretrovirals i mitocondri

Els fàrmacs ARVs emprats per tractar la infecció pel VIH han permès assolir un equilibri entre replicació viral i sistema immunitari, que es pot mantenir de forma crònica en els pacients infectats. Com a resultat, el tractament ARV ha disminuït dràsticament la morbiditat i la mortalitat associades al virus causant de la sida. Per contra, la necessitat d'una administració continuada i indefinida del tractament incrementa la possibilitat d'aparició d'efectes secundaris associats a la medicació. Generalment, els efectes secundaris més freqüents dels fàrmacs ARVs apareixen poc temps després d'iniciar el tractament, però alguns efectes tòxics més greus es manifesten mesos i inclús anys després de l'inici. És important tenir en compte que la intolerància i la toxicitat d'aquests fàrmacs pot comprometre seriosament l'adherència al tractament i afavorir l'aparició de resistències que portin al fracàs terapèutic.

La introducció de l'AZT a finals dels anys 80 com a teràpia ARV va obrir una porta a l'esperança en la lluita contra la infecció pel VIH, que durant aquella època estava causant estralls a nivell mundial.

L'administració de l'AZT en forma de monoteràpia es va prolongar fins a mitjans dels anys 90, doncs fins aleshores era l'únic fàrmac anti-VIH disponible. La seva utilització a curt termini es va associar amb l'aparició de diferents efectes secundaris, com cefalea severa, intolerància gastrointestinal (vòmits, nàusees, diarrees) i toxicitat a la medulla òssia, que es manifestava clínicament com anèmia intensa, leucopènia i neutropènia. Posteriorment, l'administració continuada de l'AZT va donar lloc a la descripció d'una forma adquirida de miopatia caracteritzada per una alteració mitocondrial detectable a nivell histològic i molecular, que obligava en molts casos a retirar el fàrmac. La miopatia tòxica simptomàtica que desenvolupava el 26% de pacients que rebien AZT causava debilitat, miàlgia i nivells elevats en sèrum de creatina quinasa (CK). A nivell histològic, es caracteritzava per la presència de fibres musculars roig-estructurades, indicatives de l'existència de mitocondris anòmals, que es correlacionaven positivament amb la severitat de la miopatia i la dosi administrada d'AZT (Dalakas MC, *N Engl J Med* 1990) (Grau JM, *Ann Intern Med.* 1989). A nivell molecular, la fisiopatologia de la miopatia causada per l'AZT es describia per una depleció del contingut d'ADN mitocondrial (ADNmt) en el múscul esquelètic, que es generava com a conseqüència de la inhibició de l'ADN polimerasa- γ (ADNpol- γ) (veure secció 1.3.2.3), l'únic enzim responsable de la replicació del genoma mitocondrial (Arnaudo E, *Lancet* 1991) (Gherardi RK, *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994) (Chariot P, *J Hepatol* 1999) (Casademont J, *Brain* 1996). Aquesta

depleció del genoma mitocondrial al múscul es podia detectar, amb menys intensitat, en pacients que no presentaven símptomes clínics o que presentaven un perfil histològic normal de les fibres musculars. Posteriorment, es va demostrar que la miopatia tòxica causada per l'AZT era dosi dependent i acumulativa (Casademont J, Brain 1996) (Grau JM, Ann Neurol 1993), i que revertia clínicament, histològicament i molecularment un cop retirat el fàrmac (Masanés F, J Neurol Sci 1998). Gràcies a aquestes investigacions les dosis terapèutiques de l'AZT es van ajustar fins a controlar la toxicitat més greu, i la teràpia ARV es va veure reforçada amb l'aparició d'altres anàlegs de nucleòsid que es van introduir com a monoteràpia seqüencial alternativa o com a teràpia amb dos ITIAN. Això va permetre disminuir les dosis diàries d'AZT fins que, a l'actualitat, és força infreqüent trobar casos clínicament rellevants de miopatia per AZT.

La introducció dels IP cap el 1996 com a component clau en la teràpia triple de gran activitat va venir acompanyada poc temps després d'un increment en la incidència d'efectes adversos que prèviament havien estat més marginals (com la hiperlactatèmia o l'acidosi làctica, la polineuropatia, la pancreatitis (Abouafia DM, J Clin Gastroenterol. 1997)) i també de nous efectes adversos fins aleshores desconeguts. Així doncs, cap el 1997 alguns dels pacients que rebien TARGA van començar a notar un increment anormal del greix abdominal. En un principi, es va associar a la millora de l'estat nutricional i de la qualitat de vida, com a conseqüència de la reducció de la virèmia. En qualsevol cas, cridava l'atenció que els pacients, malgrat augmentar el seu diàmetre abdominal, amb freqüència presentaven un aprimament de la cara i de les extremitats (Huff A, GMHC Treat Issues 1997-98) (Munk B, Posit Aware 1997) (Mishriki YY, Postgrad Med 1998). Alguns d'ells també manifestaven un augment de les mames i una acumulació de greix a la zona cervical, aquesta última coneguda com a gep de búfal o '*buffalo hump*' (Saint-Marc T, Lancet 1998) (De Luca A, Lancet 1998). Aquest mateix any, la FDA va alertar de la possible producció de diabetis per l'administració dels IP (Ault A, Lancet 1997).

En aquest context, la utilització dels IP es va associar amb l'aparició d'una redistribució del greix corporal (Carr A, Lancet 1998) (Wurtz R, Lancet 1998) (Ho TT, Lancet 1998), que venia acompanyada d'alteracions metabòliques que afectaven al perfil lipídic (hiperlipidèmia, hipercolesterolèmia) i glucídica (hiperglucèmia) (Sullivan AK, AIDS 1997) (Dube MP, AIDS Clin Care 1998) (Colvin R, Common Factor 1997) (Walli R, AIDS 1998). Poc després es va considerar que el conjunt d'aquests trastorns metabòlics associats a una redistribució anormal del greix corporal constituïen part d'una síndrome adquirida que es va anomenar lipodistròfia (LD) (veure secció 1.4.1.1) (Carr A, Clin Infect Dis 2000) (Reus S, An Med Interna 2000) (Carr A, AIDS 1998) (Carr A, Lancet 1998).

L'experiència terapèutica i les observacions clíniques van determinar poc temps després de l'aparició de la LD, que aquesta síndrome no es donava únicament com a conseqüència de l'administració dels IP, sinó també per l'administració d'altres ARVs com els ITIAN, ja que s'havien detectat casos de LD associada al TARGA en pacients que mai havien rebut IP (Lo JC, Lancet 1998) (Madge S, AIDS 1999) (Aldeen T, AIDS 1999) (Saint-Marc T, AIDS 1999) (Leitz G, AIDS 2000) (Polo R, J Acquir Immune Defic Syndr 2000) (Galli M, Defic Syndr 2002). Aquest fet va atribuir la LD a tots els fàrmacs ARVs de forma generalitzada i no només es va relacionar amb els IP.

Per aquest temps, la fisiopatologia de la LD es desconeixia per complet, però a principis de 1999 K. Brinkman i col·laboradors van suggerir per primer cop com a possible via patogènica la disfunció mitocondrial de les cèl·lules que havien incorporat el fàrmac. Es va establir doncs, la hipòtesi de la toxicitat mitocondrial dels fàrmacs ARVs (veure secció 1.4.1.1), els principis de la qual continuen vigents avui dia, i serveixen per explicar, al menys en part, molts dels efectes secundaris dels ITIAN. La primera dada experimental que recolza aquesta hipòtesi la va proporcionar un estudi realitzat al nostre laboratori (Miró Ò, AIDS 2000).

Igualment, s'han descrit altres efectes adversos associats a l'administració continuada del TARGA. Molts d'ells es presenten durant les primeres setmanes un cop iniciat el tractament i desapareixen poc després, però altres perduren i es compliquen amb el temps, la qual cosa obliga a la retirada del fàrmac. Entre alguns efectes adversos, cal destacar: al·lèrgies o hipersensibilitat als ITIAN, que poden causar exantema eritematós, alteracions dels marcadors hepàtics i inclús la mort en els casos més severos; malestar general; febre; trastorns gastrointestinals; anèmia; leucopènia; hiperpigmentació de la pell; hepatotoxicitat; hiperglicèmia per resistència a la insulina o diabetis mellitus, especialment associada a l'administració dels IP; problemes renals (còlics renals i nefrolitiasi) associats principalment a l'indinavir i tenofovir; disminució de la massa òssia (osteopènia i osteoporosi, usualment asimptomàtiques); miopatia, associada a l'AZT; hiperlactatèmia i acidosi làctica, especialment atribuïda a l'administració de d4T; pancreatitis, causada principalment per l'administració de ddl, i en menor mesura per d4T, ddC i 3TC; polineuropatia perifèrica, causada principalment pels ITIAN ddl, d4T i ddC; i alteracions del sistema nerviós central, especialment associat a l'efavirenz, que pot causar insomni, malsons, marejos, canvis d'humor, depressió, idees de suïcidi, etc.

La pancreatitis, la hiperlactatèmia i l'acidosi làctica es consideren tres dels efectes secundaris greus, que poden causar la mort del pacient. Tots tres, juntament amb la neuropatia perifèrica, la toxicitat hepàtica i la síndrome de la LD, són tributaris de ser causats per toxicitat mitocondrial associada al TARGA. La manifestació de qualsevol d'aquests efectes secundaris implica el canvi o la retirada immediata de la combinació ARV que l'ha causat.

La hiperlactatèmia i l'acidosi làctica són, juntament amb la LD, dues de les complicacions derivades del tractament ARV que actualment suscitin major interès, donat les greus conseqüències clíniques que pot desencadenar en els pacients. Concretament, s'associen a l'administració dels ITIAN, especialment al d4T i ddI. Es produeixen per un augment dels nivells d'àcid làctic en sang, generalment entre 2-5 mmols/L en el cas de la hiperlactatèmia i superiors a 5 mmols/L en el cas de l'acidosi làctica. Tot i que tenen una prevalència inferior a la d'altres efectes tòxics causats pels ARVs, resulten especialment greus perquè eventualment poden conduir a la mort del pacient afecte. La mortalitat dels pacients que presenten uns nivells d'àcid làctic > 10 mmols/L s'estima que pot arribar a ser d'un 80%, si no es tracta adequadament (Falco V, Expert Opin Pharmacother. 2003) (Falco V, Clin Infect Dis. 2002). La hiperlactatèmia es pot presentar com una complicació assintomàtica o simptomàtica. Aquesta última pot cursar amb náusees, vòmits, distensió i dolor abdominal, elevació dels enzims hepàtics, esteatosi hepàtica, fatiga, debilitat, pèrdua de pes, dispnea i miàlgia, i pot desenvolupar en acidosi làctica. L'acidosi làctica es pot manifestar directament, sense una fase d'hiperlactatèmia prèvia, amb uns símptomes clínics similars als descrits per la hiperlactatèmia, a més de cianosi, hipotensió, hiperventilació, arítmia, letàrgia, disfunció hepàtica i estupor o coma. La hiperlactatèmia es manifesta en un 15% dels pacients que reben ITIAN, mentre que l'acidosi làctica té una incidència molt inferior, d'aproximadament 4 de cada 1000 pacients en tractament amb ITIAN per any (John M, Antivir Ther 2001).

En termes generals, l'aparició dels efectes secundaris que genera el TARGA fa que un 70% dels pacients hagi de canviar el seu esquema de tractament als pocs mesos d'iniciar-lo. A més, depenent de la severitat dels efectes adversos, el seguiment correcte de la teràpia ARV per part del pacient es fa molt difícil. En aquests casos, la falta d'adherència al tractament promou l'aparició de resistència als fàrmacs i pot conduir al fracàs terapèutic, limitant d'aquesta forma les possibilitats de combinacions terapèutiques.

En qualsevol cas, malgrat els efectes adversos que el TARGA pot produir, l'equilibri es desplaça cap els beneficis que la teràpia contra el VIH pot aportar al pacient infectat. Els pacients en TARGA, mantenen una càrrega viral indetectable i uns nivells de cèl·lules CD4⁺ elevats, que en conjunt disminueixen les infeccions oportunistes i milloren la qualitat de vida. En general, els pacients es troben millor i poden realitzar una vida normal, però amb els inconvenients que suposa patir una malaltia crònica. En aquest sentit, convé individualitzar el tractament en cada cas i considerar les principals alternatives terapèutiques adequades per cada pacient.

1.4.1.1. Lipodistròfia i toxicitat mitocondrial

La síndrome de la lipodistròfia (LD) és un dels efectes adversos més importants associats al TARGA que desenvolupen molts pacients infectats pel VIH. Consisteix en una redistribució anormal del greix corporal, que s'acompanya de greus alteracions metabòliques. Bàsicament, es caracteritza per una disminució (lipoatròfia) del greix perifèric, especialment de les extremitats i la cara, que fa més evident la musculatura i les venes sferficials, i una acumulació (lipohipertròfia) del greix a nivell central o visceral, que és especialment evident a la cavitat abdominal, al pit i a l'àrea dorso-cervical (*buffalo hump*) (veure figura 18). La LD cursa igualment amb trastorns del metabolisme dels lípids i dels carbohidrats, que provoquen hiperlipidèmia i resistència a la insulina.

La LD es considera un efecte secundari molt greu que es desenvolupa, amb diferents graus de severitat, en més del 50% dels pacients infectats que reben ARVs a partir dels 6-12 primers mesos de rebre TARGA (Carr A, Lancet 2003). A més, els problemes estètics i psicològics que se sumen a l'alteració clínica, poden conduir al fracàs terapèutic per incompliment o interrupció del tractament. L'increment del risc cardiovascular i d'arteriosclerosi associat a la LD i, especialment vinculat a la utilització dels IP, representa un altre efecte clínic a llarg termini que cal considerar.

La LD és una síndrome amb una definició clínicament complexa, d'etiologia multifactorial, en la que tant els ITIAN com els IP tenen un paper important en el seu desenvolupament, especialment si es combinen entre ells. Generalment, l'aparició de lipoatròfia s'associa a la utilització dels ITIAN, mentre que els IP es relacionen més amb l'acumulació de greix, amb la qual cosa l'etiopatogènia d'una o altra es considera diferent (John M, Antivir Ther 2001) (Behrens GM, Drug Saf 2000). Altres factors, relacionats amb les característiques genètiques de cada individu, també podrien determinar certa predisposició al desenvolupament clínic de la malaltia, donat que molts individus que reben TARGA durant llargs períodes de temps no desenvolupen LD (Nolan D, AIDS 2003).



Figura 18. Alteracions morfològiques de la síndrome de la lipodistròfia. a) i b) lipotrófia facial; c) lipohipertròfia dorso-cervical o gep de búfal i d) lipohipertròfia abdominal. Les fotografies són cortesia del Dr. Esteban Martínez del Departament de Malalties Infeccioses de l'Hospital Clínic.

Des del moment de la descripció dels primers casos de redistribució anormal de greix corporal fins a l'actualitat, diferents factors han limitat l'obtenció de resultats homogenis i concloents sobre l'etiopatogènia de la LD associada al TARGA, en part per la dificultat en emetre un diagnòstic clar i objectiu de la síndrome. Aquests factors són, principalment:

- la manca d'una definició consensuada de la síndrome de LD associada al TARGA.
- l'àmplia variabilitat fenotípica que manifesten els pacients.
- la manca de tècniques diagnòstiques objectives de la LD.
- la gran heterogeneïtat de l'historial clínic i terapèutic dels grups d'estudi.
- la dificultat de realitzar estudis longitudinals clínics i bàsics a llarg termini.

Malgrat s'han proposat diversos mecanismes que podrien ajudar a entendre, en part, la causa d'aquests trastorns del teixit adipós, l'etiopatogènia exacta de la LD no es coneix actualment.

- Efecte tòxic dels ITIAN

La majoria dels efectes secundaris dels ITIAN es relacionen amb la **toxicitat mitocondrial** que produeixen aquests fàrmacs. En aquest sentit, s'especula que la disfunció mitocondrial presenta un paper destacat en el desenvolupament de la LD (Brinkman K, Lancet 1999). La hipòtesi de toxicitat mitocondrial postula que els ITIAN, a banda d'exercir la seva activitat terapèutica a nivell intracel·lular inhibint la TI del virus (veure secció 1.2.2.1), presenten gran afinitat per l'ADNpol- γ humana, l'únic enzim responsable de la replicació de l'ADNmt. D'aquesta forma, els ITIAN inhibeixen, per competició amb els nucleòsids naturals, l'enzim mitocondrial ADNpol- γ , aturant la replicació del genoma mitocondrial necessària per la biosíntesi de nous mitocondris. En conseqüència, a través d'aquest mecanisme els ITIAN produeixen depleció de l'ADNmt (veure figura 19). Donat que l'ADNmt només codifica 13 polipèptids, 2 ARNr i 22 ARNt que formen part del mitocondri, qualsevol alteració o depleció del genoma mitocondrial només pot afectar al funcionalisme mitocondrial (si la depleció supera el percentatge o llindar fenotípic necessari perquè s'expressi una disfunció d'aquest orgànu). En definitiva, l'activitat cel·lular, que depèn d'uns nivells adequats d'ATP, es podria veure negativament afectada. En aquesta situació, els mitocondris anòmals generats podrien eventualment comprometre la viabilitat cel·lular.

La sospita que es va suscitar inicialment sobre una disfunció mitocondrial com a responsable en la fisiopatologia d'aquests efectes secundaris al TARGA, també es va fonamentar en el fet que molts pacients infectats pel VIH amb LD associada als ARVs presentaven una gran similitud fenotípica amb els aspectes de la malaltia mitocondrial de Madelung (o lipomatosi simètrica múltiple). Aquesta alteració mitocondrial és poc freqüent i es caracteritza clínicament per la presència de dipòsits múltiples de greix subcutani localitzats a la zona dorso-cervical, a les espatlles i a la part superior de les extremitats. Normalment cursa amb polineuropatia perifèrica, hepatopatia i intolerància a la glucosa. A nivell bioquímic, es caracteritza per presentar alteracions en l'ADNmt, així com un dèficit en l'activitat enzimàtica de la citocrom c oxidasa (COX; o complex IV) de la CTE (Klopstock TP, Neurology 1994) (Berkovic SF, Ann Neurol 1991). En aquest sentit, en el procés de lipòlisi intervé la β -oxidació, a través de la qual els àcids grassos entren al metabolisme oxidatiu mitocondrial per generar energia. Una disfunció mitocondrial limitaria el procés d'oxidació dels àcids grassos, amb la qual cosa es produiria un acúmulo intracel·lular d'inclusions lipídiques, que amb freqüència es manifesten en els casos de toxicitat mitocondrial.

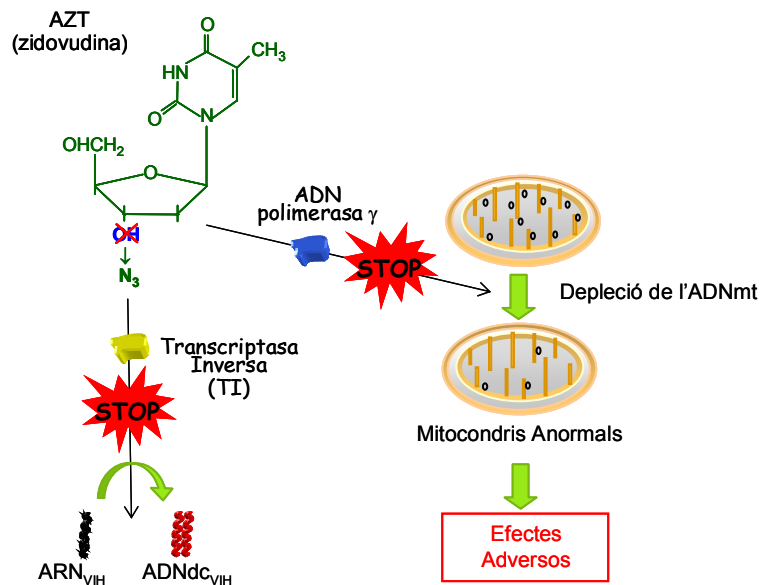


Figura 19. Toxicitat mitocondrial dels ITIAN. Els fàrmacs ITIAN han estat dissenyats per inhibir l'enzim TI del VIH i aturar la seva replicació, però produeixen un dany co-lateral, que es basa en la inhibició de l'enzim mitocondrial ADNpol- γ . La conseqüència directa d'aquest dany mitocondrial és la depleció de l'ADNmt que, en últim terme, pot produir disfunció dels mitocondris. A aquesta disfunció mitocondrial se l'ha atribuït un paper patogènic en el desenvolupament de la síndrome de la LD.

Per exemplificar la capacitat de lesió mitocondrial que tenen els ITIAN, només dir que alguns ITIAN dirigits específicament per tractar infeccions cròniques víriques diferents a la causada pel VIH, com la fialuridina, han hagut de ser retirats ràpidament pel fet de provocar greus alteracions metabòliques de probable origen mitocondrial (McKenzie R, N Engl J Med 1995).

La toxicitat mitocondrial es regeix per una sèrie de principis bàsics, que cal tenir en compte a l'hora de valorar-la:

1. La toxicitat mitocondrial *in vitro* depèn de la concentració del fàrmac ARV administrat. Per exemple, concentracions d'ITIAN elevades causen una depleció del genoma mitocondrial més severa en comparació amb concentracions d'ITIAN baixes. En aquest sentit, cal considerar que la dosi terapèutica efectiva d'alguns anàlegs de nucleòsid es manté molt pròxima al límit de tolerància respecte a la toxicitat mitocondrial.
2. La depleció de l'ADNmt és un efecte de la toxicitat mitocondrial dels ITIAN, que només s'observa després d'un període prolongat d'exposició continuada als ARVs.

Per aquest motiu, la toxicitat mitocondrial no s'observa durant els primers mesos de rebre TARGA. A més, l'exposició prolongada als ITIAN pot conduir a llarg termini a alteracions mitocondrials, malgrat les dosis administrades dels anàlegs de nucleòsids siguin relativament baixes.

3. La disfunció mitocondrial, que eventualment es pot produir per efecte de la toxicitat mitocondrial que produeixen els ITIAN, només s'observa si el percentatge de depleció de l'ADNmt supera un cert llindar, fins aleshores indeterminat.
4. La potència relativa dels diferents ITIAN per inhibir l'ADNpol- γ presenta *in vitro* una determinada jerarquia (de major a menor): ddC > ddl > d4T >>> AZT > 3TC > ABC = TDF (Lim SE, J Biol Chem 2001) (Kakuda TN, Clin Ther 2000). Estudis *in vitro* han identificat al menys quatre mecanismes diferents pels quals els ITIAN inhibeixen l'ADNpol- γ i generen toxicitat mitocondrial: i) inhibeixen directament l'ADNpol- γ sense incorporació dels ITIAN a la cadena que s'està polimeritzant ii) actuen com a terminadors de la cadena d'ADNmt que s'està formant iii) disminueixen la fidelitat de la síntesi d'ADNmt, induint errors durant la replicació iv) disminueixen la capacitat exonucleasa reparadora de l'ADNpol- γ , permetent la persistència dels ITIAN a l'ADNmt. Com a conseqüència final, la l'ADNpol- γ perd eficàcia replicativa i l'ADNmt s'altera i disminueix el seu contingut.
5. La toxicitat mitocondrial es pot expressar com un efecte additiu o sinèrgic entre dos o més ARVs administrats en combinació.
6. La toxicitat mitocondrial és teixit-específica. L'especificitat de teixit dels ARVs radica en el fet que la capacitat d'incorporació dels fàrmacs a l'interior de les cèl·lules i els mitocondris, així com l'activació dels profàrmacs per fosforilació a través de les quinases cel·lulars, depèn del tipus cel·lular. A més, el tipus de teixit que presenti una major dependència de la respiració mitocondrial i una menor taxa de renovació cel·lular, farà més evident l'efecte tòxic a nivell mitocondrial. En a quest cas, tenint en compte l'equilibri entre l'efecte tòxic del fàrmac (o fàrmacs) i la naturalesa del teixit, la toxicitat mitocondrial s'expressa clínicament en diferents teixits diana, principalment en múscul esquelètic, nervis perifèrics, greix subcutani, cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, fetge, ronyons, cor i sistema reproductor.
7. La toxicitat mitocondrial sol revertir un cop retirat el/s fàrmac/s o haver canviat la combinació TARGA a una altra potencialment menys citotòxica. Aquest efecte sol venir acompanyat de la millora clínica del pacient afecte.

Durant els últims anys, la toxicitat mitocondrial ha anat adquirint una gran importància entre els efectes secundaris dels ARVs, i d'alguna manera ha influït en el diseny de noves modalitats de TARGA. Tradicionalment s'ha considerat als ITIAN part essencial de qualsevol modalitat de TARGA. En canvi, en l'actualitat, degut fonamentalment a la toxicitat mitocondrial, s'estan considerant també opcions de TARGA que no contenen ITIAN.

- Efecte tòxic dels IP

L'efecte que els IP produeix en les cèl·lules està menys estudiat que els efectes dels ITIAN. La relació d'aquesta família de fàrmacs ARVs amb la LD es basa fonamentalment en la hipòtesi de que els IP no actuen específicament inhibint la proteasa del VIH, sinó que també poden inhibir altres proteïnes de la cèl·lula hoste implicades en el metabolisme dels lípids i dels carbohidrats, així com en la biogènesi mitocondrial, la qual cosa contribuiria al desenvolupament de la LD (Carr A, Lancet 1998) (Martinez E, Lancet 1998) (Stricker RB, Lancet 1998). La capacitat que tenen els IP d'actuar de forma inespecífica sobre algunes proteïnes cel·lulars, es dona gràcies a l'alt grau d'homologia en la seqüència d'aminoàcids que aquestes últimes presenten amb la proteasa del virus. Així, A. Carr i col·laboradors han suggerit que els IP indueixen apoptosi al teixit adipós subcutani i hiperlipidèmia per unió a dues proteïnes, altament homòlogues al centre actiu de la proteasa, implicades en la regulació del metabolisme lipídic: la proteïna citoplasmàtica de tipus 1 d'unió a l'àcid retinoic (*CRABP-1*; o *cytoplasmic retinoic acid binding protein type 1*) i la proteïna associada al receptor de la lipoproteïna de baixa densitat (*LRP*; o *LDL-receptor-related protein*) (Carr A, Lancet 1998).

Respecte a la **CRABP-1**, cal ressenyar que es tracta d'una proteïna ubiqua que uneix l'àcid retinoic intracel·lular per ser degradat a àcid cis-9-retinoic pel citocrom P450 3A. L'àcid cis-9-retinoic és el lligand del receptor RXR, el qual forma un heterodímer al nucli dels adipòcits amb el factor de transcripció *PPAR- γ* (*peroxisome proliferator activated receptor γ*). En condicions normals, l'estimulació de l'heterodímer *PPAR- γ -RXR* promou la diferenciació i proliferació adipocitària i inhibeix l'apoptosi dels teixit adipós. En presència dels IP, la producció d'àcid cis-9-retinoic disminueix, per inhibició directa de *CRABP-1* o bé per la capacitat que tenen els IP d'inhibir el citocrom P450 3A. El decrement de l'àcid cis-9-retinoic disminueix l'estimulació de *PPAR- γ -RXR*, la qual cosa condueix a l'augment de l'apoptosi dels adipòcits perifèrics i a una disminució de la diferenciació adipocitària, fets que podrien contribuir al desenvolupament de la lipoatròfia perifèrica (Dowell P, J Biol Chem 2000). El conjunt d'aquests efectes provoca un desequilibri entre lipogènesi i lipòlisi (disminució de la lipogènesi i increment de lipòlisi) que desencadena hiperlipidèmia, increment dels dipòsits de greix central, acumulació de greix als pits (afavorit per la presència d'estrògens) i resistència a la insulina.

D'altra banda, estudis pioners de P Domingo i col·laboradors (Domingo P, AIDS 1999) van poder constatar que el procés d'apoptosi cel·lular està present en el teixit adipós subcutani dels individus amb lipoatròfia associada als IP. Donat que els mitocondris estan directament implicats en el procés d'apoptosi cel·lular (Green DR, Science 1998) (Petit F, Trends Pharmacol Sci 2005), una disfunció d'aquests orgànuls cel·lulars suficientment important com per limitar la producció d'ATP necessària per mantenir la viabilitat de les cèl·lules del teixit adipós subcutani desencadenaria el procés de mort cel·lular programada a través de l'alliberació al citosol de substàncies mitocondrials, com cit c i *AIF* (factor inductor d'apoptosi). Aquest fenomen justificaria, al menys en part, el desenvolupament de lipoatròfia en els pacients que reben IP com a part de la combinació TARGA.

No obstant, existeix certa controvèrsia respecte a l'efecte proapoptòtic que produeixen els IP, doncs diferents autors afirmen que els IP presenten activitat antiapoptòtica, principalment per la inhibició dels receptors dels lligands mediadors de l'apoptosi Fas i $\text{TNF-}\alpha$ en les cèl·lules T activades. Així el mateix grup de P Domingo ha observat com la supressió del IP en una combinació TARGA no millora les dades histològiques d'apoptosi en el teixit adipós dels pacients amb LD (Domingo P, J Infect Dis. 2001). En conseqüència, actualment es creu que els IP protegeixen a les cèl·lules T activades de la pèrdua del $\Delta\psi_{\text{mt}}$, característica de l'inici de l'apoptosi (Matarrese P, J Immunol 2003) (Phenix BN, AIDS Res Hum Retrov 2000) (Phenix BN, Blood 2001) (Matarrese P, JAIDS 2002) (Chavan SJ, Clin. Immunol 1999) (Sloand EM, Blood 2000).

Referent a la **LRP**, aquesta proteïna és un receptor hepàtic important en el aclariment plasmàtic dels quilomicrons després de la ingesta. **LRP** també s'expressa a l'endoteli capilar amb la lipoproteïna lipasa (LPL). El complex **LRP-LPL** degrada els triglicèrids circulants en àcids grassos, que entraran a l'interior dels adipòcits per ser emmagatzemats. La inhibició de la **LRP** hepàtica i endotelial per unió amb els IP, condueix a un increment dels nivells de lípids en sang, doncs disminueix la captació d'àcids grassos pels adipòcits i la captació de quilomicrons al fetge.

El desenvolupament de dos efectes totalment diferents al teixit adipós, com la lipohipertròfia i la lipoatròfia, pot ser conseqüència de les diferències en la funció de les cèl·lules del teixit adipós central o subcutani, així com per la selectivitat de teixit dels anàlegs de nucleòsid. Per exemple, els adipòcits de la regió central tenen una activitat lipolítica superior a la dels adipòcits de la regió perifèrica, i per tant el teixit adipós central (incloent el greix dorso-cervical) és metabòlicament més actiu que el teixit adipós subcutani. Donat que la lipòlisi és un procés que requereix energia, la dependència dels mitocondris, per realitzar la fosforilació oxidativa i obtenir ATP, és superior en els adipòcits de la regió central. En situació de disfunció

mitocondrial, causada pels anàlegs de nucleòsid, l'aport energètic seria insuficient, la qual cosa estaria limitant la lipòlisi i, en conseqüència, desencadenaria una acumulació intracel·lular de lípids en els adipòcits centrals i dorso-cervicals similar a la lipomatosi simètrica múltiple. La resistència a la insulina i la hiperlipidèmia s'originarien com a conseqüència d'una situació de desequilibri entre lipogènesi i lipòlisi al teixit adipós. D'altra banda, s'especula que la lipoatròfia es pot desenvolupar per l'increment de l'apoptosi als adipòcits de la regió perifèrica (més que no pas de la necrosi, ja que la pèrdua de greix no és dolorosa ni inflamatòria). Els mitocondris estan íntimament implicats en el procés d'apoptosi cel·lular, i una disfunció mitocondrial causada pels fàrmacs ARVs podrien generar una pèrdua del $\Delta\psi_{mt}$, que estaria induïnt l'activació dels mecanismes apoptòtics. A més, l'apoptosi dels adipòcits també pot explicar la hiperlipidèmia, particularment la hipertrigliceridèmia, ja que el trencament d'aquestes cèl·lules pot resultar en l'alliberament dels lípids emmagatzemats (Kakuda TN, AIDS 1999).

El component metabòlic de la síndrome de la LD està fortament associat a la utilització dels IP, i pot precedir als canvis morfològics que caracteritzen aquesta síndrome associada al TARGA. S'han descrit tres possibles mecanismes addicionals que poden ajudar a elucidar la forma a través de la qual els IP poden induir resistència a la insulina i dislipèmia (Nolan D, Drugs 2003).

En primer lloc, es creu que els **IP inhibeixen la translocació al nucli del factor de transcripció SREBP** (*sterol regulatory element-binding protein*), implicat en promoure la lipogènesi i la diferenciació adipocitària. *SREBP* actua directament, o indirectament a través de l'activació del factor de transcripció PPAR- γ . Concretament, al teixit adipós *SREBP* incrementa la captació i la síntesi d'àcids grassos, inhibeix la lipòlisi, incrementa la diferenciació adipocitària i incrementa la captació i utilització de glucosa com a substrate energètic (a través del transportador de glucosa GLUT-4 sensible a la insulina). La presència dels IP als adipòcits anul·la la funció de *SREBP*, la qual cosa condueix a l'augment d'àcids grassos i de glucosa en sang, característics de la síndrome de la LD. La inhibició de *SREBP*, probablement contribueixi al desenvolupament de la lipoatròfia.

En segon lloc, s'ha suggerit que els **IP interaccionen directament amb GLUT-4** a la superfície cel·lular dels adipòcits i dels miòcits del múscul esquelètic, inhibint de forma reversible la captació de glucosa en aquests teixits i generant resistència a la insulina.

En tercer lloc, s'especula que els **IP actuen inhibint el proteasoma implicat en la degradació de SREBP**, factor de transcripció també present al fetge. En conseqüència es genera un increment en la producció hepàtica de triglicèrids, que dona lloc a un increment en la producció de les lipoproteïnes *VLDL* (lipoproteïna de molt baixa densitat; o *very low density lipoprotein*) i apolipoproteïna B, que transportaran els triglicèrids cap als adipòcits per ser

emmagatzemats. En presència dels IP l'eficiència de captació de triglicèrids per part dels adipòcits disminueix i el nivell de triglicèrids en sang augmenta, alterant el perfil lipídic normal.

La resistència a la insulina i la hiperlipidèmia serien doncs, conseqüència d'alteracions en la funció dels adipòcits (Large V, Diabetes Metab 1998).

Els efectes mitocondrials de les altres famílies d'ARVs han estat menys estudiats. Sembla ser que tot i que els ITINAN no tenen efectes tòxics envers l'ADNmt, podrien interferir amb les vies mitocondrials de l'apoptosi i generar de forma secundària efectes tòxics sobre els mitocondris. Estudis recents obtinguts *in vitro* mostren que EFV és un ITINAN inductor de la via mitocondrial de l'apoptosi dependent de les caspases (Pilon AA, Antimicrob Agents Chemother 2002), i altera la proliferació d'una línia cel·lular de limfòcits T en individus sans. Respecte als IF, actualment no hi ha cap estudi que aporti dades sobre l'acció a nivell mitocondrial d'aquests fàrmacs.

Molts estudis sobre els efectes que produeixen els fàrmacs ARVs a nivell cel·lular s'han realitzat *in vitro*, i els resultats obtinguts no han estat homogenis ni concloents (Brinkman K, Lancet 1999) (Pedrol E, J Neurol Sci 1996) (Honkoop P, Hepatology 1997). Presenten l'inconvenient d'analitzar els efectes dels fàrmacs ARVs en monoteràpia, sense tenir en compte els possibles efectes a llarg termini, per la qual cosa les conclusions que se'n deriven no es poden extrapolar a la situació *in vivo*, on les pautes ARVs són més complexes i heterogènies. En el moment d'iniciar els estudis d'aquesta Tesi, ara fa ja 4-5 anys, existien molt pocs estudis en humans, on la realitat de les combinacions ARVs permetés una aproximació més exacta al coneixement dels seus efectes sobre els mitocondris. En aquest sentit, el nostre grup va ser pioner en contrastar la hipòtesi de l'afectació mitocondrial en pacients afectats de LD. Així, vàrem estudiat el teixit adipós, el múscul esquelètic i les CMSP d'una pacient infectada pel VIH que va desenvolupar LD com efecte secundari del TARGA. Els resultats obtinguts demostraren que existeix una disfunció mitocondrial generalitzada de la CTE (en múscul i CMSP), així com delecions múltiples al genoma mitocondrial (en múscul i teixit adipós) (Miró O, AIDS 2000). Igualment, un segon estudi realitzat pel nostre grup en 7 pacients infectats pel VIH amb LD demostrà alteracions mitocondrials al múscul esquelètic, basades en alteracions a nivell histològic suggestives de disfunció mitocondrial, disminució de la respiració mitocondrial i de l'activitat enzimàtica dels C III i C IV de la CTE i presència de delecions múltiples al genoma mitocondrial del múscul esquelètic i del teixit adipós (Gómez-Zaera M, AIDS 2001). Els resultats observats, juntament amb els arguments prèviament comentats, van suggerir fortament que els pacients amb LD associada al TARGA presenten una alteració mitocondrial extensa que podia jugar un paper central en la seva fisiopatologia. De fet, aquests estudis van ser els que vàren donar lloc a la hipòtesi que constituí la base de la present Tesi.

1.4.2. VIH i mitocondri

En el moment d'endegar la present Tesi, poc o res es sabia respecte als efectes del VIH envers el mitocondri. Durant els darrers anys, la pròpia infecció pel VIH *per se* s'ha revelat com a causant d'efectes tòxics sobre el mitocondri. Recentment han aparegut diversos estudis amb resultats molt consistents que involucren el propi VIH en els trastorns a nivell mitocondrial, i tot i que actualment no es disposa encara de molta informació, els pocs estudis que investiguen el tema apunten en aquesta direcció.

El primer estudi que aportà dades indirectes sobre l'existència de dany mitocondrial associat a la infecció pel VIH va ser presentat el 2002 per H. Côté i col·laboradors (Côté HC, N Engl J Med 2002). Van constatar que el contingut d'ADNmt en CMSP de pacients infectats pel VIH que mai havien rebut ARVs es trobava molt disminuït en comparació amb el contingut d'ADNmt d'una població control formada per individus sans no infectats pel virus. Posteriorment, altres grups han pogut confirmar l'existència de diferències a nivell mitocondrial en els mateixos grups d'estudi, tant en CMSP (Miura T, J Med Virol 2003) (Chiappini F, Lab Invest 2004) (Polo R, J Acquir Immune Defic Syndr 2003) (Gourlain K, HIV Med 2003) (Cherry CL, J Acquir Immune Defic Syndr 2002) com en teixit adipós subcutani (Cherry CL, J Acquir Immune Defic Syndr 2002).

En l'actualitat, s'especula que les alteracions mitocondrials associades a la infecció pel VIH poden estar relacionades amb l'activació de mecanismes apoptòtics cel·lulars induïts per les partícules víriques, o per antígens del propi VIH. En aquest sentit, és ben conegut que diferents proteïnes virals són capaces d'activar l'apoptosi (Ferri KF, Ann N Y Acad Sci 2000). A continuació es descriuen algunes d'aquestes proteïnes virals i altres factors associats a la infecció per VIH que poden induir el procés de mort cel·lular programada:

- Vpr exerceix efectes proapoptòtics, almenys en part, mitjançant la seva unió al translocador de nucleòtids d'adenina (translocador d'ATP/ADP), induint la permeabilització de la membrana mitocondrial interna i l'alliberació de citocrom c al citosol, que és un activador de la via de les caspases (Muthumani K, J Biol Chem 2002) (Jacotot E, J Exp Med 2000). El translocador d'ATP/ADP és una proteïna localitzada a la membrana mitocondrial interna que també interacciona amb la proteïna Bax, activadora de l'apoptosi.
- la proteasa del VIH indueix l'apoptosi mitjançant la degradació proteolítica de la proteïna mitocondrial antiapoptòtica Bcl-2 (Strack PR, Proc Natl Acad Sci 1996). Igualment, la proteasa vírica promou l'apoptosi cel·lular a través de l'activació de la caspasa 8, la qual cosa implica l'alliberació al citosol de proteïnes apoptogèniques

mitocondrials. A més, l'expressió de la proteasa es correlaciona positivament amb la presència d'apoptosi *in vivo* i *in vitro* (Nie Z, Cell Death Differ 2002)

- Tat redueix l'expressió de l'isoenzim mitocondrial superòxid dismutasa 2, que és un inhibidor endògen de la permeabilitat de la membrana mitocondrial (Westendorp MO, EMBO J 1995) (Williams MD, J Biol Chem 1998) (Creaven M, Biochemistry 1999), i indueix la pèrdua del $\Delta\psi_{mt}$ (Macho A, Oncogene 1999). A més, Tat té capacitat per incrementar l'expressió i l'activitat de la caspasa-8 (Bartz SR, J Virol 1999), així com l'expressió del lligand Fas a les cèl·lules T, induint l'apoptosi (Li-Weber M, Eur J Immunol 2000). Igualment, s'ha demostrat la capacitat de Tat per induir l'apoptosi en les cèl·lules T no infectades. Aleshores, Tat s'uneix als microtúbuls del citoesquelet de la cèl·lula hoste, alterant la seva estabilitat, la qual cosa desencadena l'apoptosi per la via mitocondrial (Chen D, EMBO J 2002) (Li CJ, Science 1995).
- Env desplaça l'equilibri entre Bax (proapoptòtica) i Bcl-2 (antiapoptòtica) cap a la primera i condueix a l'activació de la via mitocondrial de l'apoptosi independent de caspases (Torre D, Clin Infect Dis 2005).
- Nef pot activar la producció del lligand Fas en cèl·lules T infectades i induir l'apoptosi (Zauli G, Blood 1999). En les cèl·lules no infectades, Nef indueix la mort cel·lular programada, independentment del lligand Fas, a través de la seva unió a receptors de superfície cel·lular (Otake K, J Immunol 1994).
- Gp120 indueix l'apoptosi mediada per la via mitocondrial, mitjançant la despolarització de la membrana mitocondrial i l'alliberació de citocrom c al citosol, un cop inicia el contacte amb el co-receptor de la cèl·lula hoste (Roggero R, J Virol 2001).
- L'òxid nítric (NO) té efectes antivirals, i la seva concentració cel·lular es veu incrementada en presència del VIH. Per contra, el NO i el peroxinitrit (ONOO⁻), contribueixen a l'augment del dany oxidatiu de les cèl·lules i a la inhibició directa de la respiració mitocondrial, la qual cosa podria magnificar aquesta disfunció mitocondrial (Torre D, Lancet Infect Dis 2002).
- La infecció per VIH produeix augment dels nivells de TNF- α , i aquest és un clar inductor de l'apoptosi. TNF- α és una citoquina, produïda durant la majoria de reaccions immunològiques i inflamatòries, que es genera als limfòcits T com a resposta contra el VIH, però que també promou la replicació del VIH a les cèl·lules T a través de l'activació del factor de transcripció NF-KB (N Israel, The Journal of Immunology 1989). L'increment en la producció de TNF- α relacionat amb un estat patogènic, s'associa a

desgast muscular i caquèxia. De fet, molts pacients amb sida desenvolupen un quadre de debilitat i desgast muscular conegut com a *wasting syndrome* (Grunfeld C, N Engl J Med 1992), diferent al produït per la miopatia que poden causar els fàrmacs ARVs (Miro O, J Neurol Sci. 1997), que es relaciona amb nivells elevats de TNF- α (Wig N, AIDS Patient Care STDS 2005). A més, el TNF- α i el seu receptor també s'expressen i sintetitzen al teixit adipós, considerat actualment un òrgan amb activitat endocrina (Fain JN, Endocrinology 2004). Alguns dels efectes potencials que el TNF- α pot induir sobre els adipòcits són la inducció de l'apoptosi (Prins JB, Diabetes 1997), el bloqueig de la diferenciació adipocitària (Xing H, Endocrinology 1997) i la inducció de la lipòlisi (Green A, Endocrinology 1994), la qual cosa pot contribuir a la pèrdua de greix corporal i a l'increment d'àcids grassos al plasma. Igualment, s'ha descrit la seva capacitat per inhibir la transcripció de gens implicats en processos d'adipogènesi i lipogènesi, així com de gens implicats en la captació de glucosa (Ruan H, Diabetes 2002). D'altra banda, els nivells augmentats de TNF- α , també s'han relacionat amb la obesitat i la resistència a la insulina (Recasens M, Rev Med Univ Navarra 2004).

A més, l'apoptosi que es produeix durant la infecció del VIH, i que afecta a les cèl·lules CD4⁺ infectades i a les no infectades pel virus (Luciani F, Cell Death Differ 2004), contribueix a la leucopènia que manifesten els pacients infectats. De fet, diferents estudis realitzats *in vitro* han demostrat que les cèl·lules T dels pacients infectats pel VIH són més susceptibles a l'apoptosi que les dels individus no infectats, tant si es tracta de cèl·lules en estat activat o en estat latent (Meyaard L, Science 1992) (Gougeon M.L, Science 1993) (Finkel T.H, Curr Opin Immunol 1994) (Muro-Cacho C.A, J Immunol 1995) (Patki AH, Clin Diagn Lab Immunol 1997). No obstant, caldria estudiar més en profunditat els efectes mitocondrials de la infecció pel VIH, doncs la mera troballa d'un únic paràmetre mitocondrial alterat (com per exemple, l'ADNmt) no necessàriament significa que hi hagi disfunció mitocondrial (Casademont J, N Engl J Med. 2002).

En general, el benefici que aporten els ARVs al pacient infectat pel VIH és indiscutible, doncs disminueix dràsticament la càrrega viral. Segons aquest fet, s'especula que el tractament ARV contribuiria a la disminució de l'efecte tòxic mitocondrial que produeix el propi VIH (possiblement mediat per mecanismes apoptòtics). Per contra, els ARVs aportarien un efecte tòxic addicional sobre aquests òrgans, tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.4.1 inclòs en aquesta secció. D'acord amb aquest argument, l'efecte tòxic mitocondrial resultant que es manifestaria en els pacients infectats pel VIH que reben TARGA vindria determinat pels ARVs que prenen i per l'estat virològic que presenten. En aquest context però, resulta difícil

diferenciar els efectes que en la pràctica clínica s'observen en els pacients amb TARGA deguts al tractament ARV dels que puguin estar condicionats pel VIH. Tot i així, cada cop pren major cos la idea de que els fàrmacs ARVs tenen uns efectes tòxics sobre els mitocondris dels pacients infectats pel VIH que es veuen magnificats perquè la pròpia presència del virus fa que aquests mitocondris ja estiguin danyats quan el pacient inicia TARGA. D'aquesta manera, els pacients infectats pel VIH presentarien, degut a la pròpia infecció, major susceptibilitat pel desenvolupament de toxicitat mitocondrial associada als ARVs que la població no infectada pel virus.