

**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

Tesi presentada per **Sònia López Moreno** per aspirar al grau de
Doctora en Bioquímica.

**‘Efectes de la infecció pel VIH i dels fàrmacs antiretrovirals
envers el mitocondri: les cèl·lules mononuclears de sang
perifèrica com a model d’estudi’**

Directors de la Tesi:

Dr. Jordi Casademont i Pou

Departament de Medicina Interna
Hospital Clínic de Barcelona

Dr. Òscar Miró i Andreu

Departament de Medicina Interna
Hospital Clínic de Barcelona

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Barcelona, 1 de Desembre de 2005

AGRAÏMENTS

Després de 5 anys al laboratori de Medicina Interna, no puc dir una altra cosa més que ha estat una experiència realment molt positiva. El pas per l'Hospital Clínic m'ha permès conèixer gent amb diverses inquietuts, que de ben segur no m'han deixat indiferent. A cada una d'aquestes persones vull agrair el recolzament científic i personal que m'han brindat al llarg d'aquests anys.

Als Drs. Òscar Miró, Jordi Casademont i Francesc Cardellach agraeixo moltíssim l'haver-me donat l'oportunitat de formar part d'un grup d'investigació punter en l'estudi del funcionalisme mitocondrial. Sens dubte han estat un referent clau en la meua carrera investigadora i m'han ajudat a créixer com a professional. M'han donat l'oportunitat de poder-me dedicar al coneixement de dos temes tan apassionants com són el VIH i els mitocondris i m'han permès conèixer de prop la metodologia de treball d'altres laboratoris, que ens han ajudat a implementar noves tècniques de gran utilitat pels nostres estudis, així com assistir a cursos, i congressos internacionals de gran prestigi.

Agraeixo especialment l'esforç de tots els membres del jurat pel temps dedicat a llegir la meua Tesi i per la bona predisposició demostrada a l'hora de formar part del jurat. Especialment al Professor Andrea Cossarizza de la 'Università di Modena' (Itàlia), que ha fet doble esforç per venir des de tan lluny.

Vull agrair a tots els professionals que m'han ajudat a portar a terme aquest projecte, ja sigui amb la selecció i l'enviament de mostres o amb el suport tècnic que ens han facilitat. Al Professor Pierre Rustin i al Dr. Dominique Chretien del 'Hôpital Necker de Enfants Malades' de París, a la Dra. Virginia Nunes, al Benja i a la Montse de l'IRO (Institut de Recerca Oncològica), al Dr. Francesc Villarroya i a la Marisa Rodríguez del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la UB, al Dr. Pere Domingo de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, al Dr. Enric Pedrol de l'Hospital de Granollers, al Dr. Esteban Martínez, al Dr. Joaquim Fernández-Solà i al Dr. Josep M^a Grau de l'Hospital Clínic, al Dr. Francesc Vidal de l'Hospital Joan XXIII i a la Dra. Eugènia Negredo de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Agraeixo enormement l'esforç de totes les persones que s'han prestat voluntàriament als nostres estudis.



A les 'noies del lab', perquè han estat la meua família al laboratori més saturat de l'IDIBAPS, però també el més divertit de tot l'Hospital. Em considero molt afortunada per haver coincidit amb un grup de persones que es desviuen per ajudar-te en els moments difícils i que demostren les ganes per compartir els moments d'alegria. Hem sapigut comprendre'ns, respectar-nos, compartir i ajudar-nos entre totes, i això no sempre passa a tot arreu. A cada una de vosaltres us agraeixo les bones estones que hem passat juntes, tant a dintre com a fora del lab. A l'Ana Beato, a l'Eva, a la Marta (ja saps...d'aquí a res...Doctora!! Ànim!!), a l'Ester ('La

Lozano'), a l'Ester ('La Tobías'), a la Mònica, a la Merche, a la M^a Pau i a la Dori, per la vostra confiança, pels bons moments compartits, i pels que sens dubte compartirem. A les meves companyes de grup...perquè són un tresor!!: a l'Ana, pura inonència, sensibilitat, rectitud i eficiència...una bomba plena de sorpreses i a la Glòria, perquè és la meva gran companya de feina, de viatges, d'hotel, la meva confident...perquè és la meva amiga. Et desitjo el millor, perquè t'ho mereixes. Al Jota, a la Mila, a la Picón, a la Carme i al Pepe, pels bons moments que hem passat tots plegats. I com no...a les veïnes/veí de laboratori, la María, la Mireia, la Asun, la Glòria i el Jordi, amb la vostra simpatia i amabilitat hem amenitzat moltes estones al llarg d'aquests anys. Al proper trasllat us trobarem a faltar...!!

Treballar amb tots vosaltres ha estat un luxe.



Sens dubte la meva família també ha significat moltíssim en aquesta aventura:

A mis padres, que me lo han dado todo en la vida haciéndome siempre muy consciente de que las cosas se consiguen con trabajo, esfuerzo y constancia.

A mi hermano, a mis cuñadas y cuñado, a mis sobrinos y a mis suegros por preocuparse siempre de mi.

A mis primas, que son como hermanas, por estar siempre ahí.

A toda mi familia que siempre han estado pendientes de mi.

A mi amor, por ser mi mayor apoyo y mi consejero, por ayudarme en todo momento y por quererme tanto.

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral, realitzada al Laboratori de Funcionalisme Mitocondrial del Grup de Recerca Muscular, ubicat a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), es va iniciar el 2001 amb el suport econòmic de la 'Fundación para la investigación y la prevención del sida en España' (FIPSE), i sota la direcció dels Drs. Jordi Casademont i Òscar Miró.

Aquesta Tesi ha permès relacionar dos temes aparentment molt distants com són la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) i el funcionalisme mitocondrial. Sota el títol 'EFECTES DE LA INFECCIÓ PEL VIH I DELS FÀRMACS ANTIRETROVIRALS ENVERS EL MITOCONDRI: LES CÈL·LULES MONONUCLEARS DE SANG PERIFÈRICA COM A MODEL D'ESTUDI' es recullen diversos treballs d'investigació que aporten informació sobre la relació altament complexa entre el VIH, els antiretrovirals i el mitocondri.

ÍNDEX

Abreviatures	5
1. INTRODUCCIÓ	9
1.1. EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (VIH)	11
1.1.1. Inicis de la sida i descobriment del VIH	11
1.1.1.1. <i>Origen del VIH</i>	13
1.1.2. Característiques principals i estructura del VIH.....	14
1.1.3. Patogènia de la infecció pel VIH.....	17
1.1.3.1. <i>El cicle vital del VIH</i>	19
1.1.3.2. <i>Tropisme viral</i>	22
1.1.3.3. <i>Història natural de la infecció pel VIH</i>	23
1.1.4. Dades epidemiològiques de l'any 2004	26
1.2. LA TERÀPIA ANTIRETROVIRAL	29
1.2.1. Història de la teràpia antiretroviral contra la infecció pel VIH	29
1.2.2. Classes de fàrmacs antiretrovirals disponibles el 2005.....	31
1.2.2.1. <i>Inhibidors de la transcriptasa inversa (ITI)</i>	32
1.2.2.2. <i>Inhibidors de la proteasa (IP)</i>	35
1.2.2.3. <i>Inhibidors de la fusió (IF)</i>	36
1.3. EL MITOCONDRI	38
1.3.1. Origen dels mitocondris	38
1.3.2. Característiques principals i estructura mitocondrial	39
1.3.2.1. <i>El sistema OXPHOS</i>	40
1.3.2.2. <i>Espècies reactives d'oxigen (ROS, reactive oxygen species)</i>	48
1.3.2.3. <i>Genoma mitocondrial</i>	50
1.3.2.4. <i>Malalties mitocondrials</i>	56

1.3.3. Mitochondri i apoptosi	59
1.3.4. Les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) com a model d'estudi de la funció mitocondrial	62
1.4. INTERACCIÓ: VIH-MITOCONDRI-ANTIRETROVIRALS	64
1.4.1. Fàrmacs antiretrovirals i mitocondri	64
1.4.1.1. <i>Lipodistròfia i toxicitat mitocondrial</i>	68
1.4.2. VIH i mitocondri	77
2. HIPÒTESIS	81
3. OBJECTIUS	85
4. MATERIALS I MÈTODES	89
4.1. PACIENTS	91
4.2. METODOLOGIA DE LABORATORI	93
4.2.1. Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP)	93
4.2.2. Determinació de la quantitat de proteïna cel·lular	94
4.2.3. Extracció d'ADN total de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	94
4.2.4. Estudis mitocondrials	96
4.2.4.1. <i>Activitat oxidativa mitocondrial</i>	97
4.2.4.2. <i>Activitat enzimàtica dels complexos de la CTE mitocondrial</i>	99
4.2.4.3. <i>Contingut mitocondrial</i>	100
4.2.4.4. <i>Dany oxidatiu mitocondrial</i>	101
4.2.4.5. <i>Quantificació del contingut d'ADNmt</i>	102
4.2.4.6. <i>Quantificació específica de subunitats proteiques mitocondrials</i>	105
4.2.4.7. <i>Determinació del grau d'apoptosis</i>	106
5. RESULTATS	109
5.1. RESULTATS EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH AFECTES DE LIPODISTRÒFIA	113

5.1.1. Participació mitocondrial en el desenvolupament de la síndrome de lipodistròfia com a efecte secundari associat al tractament antiretroviral en pacients infectats pel VIH.....	113
▪ Participación mitocondrial en la lipodistrofia asociada al tratamiento antirretroviral de gran actividad de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana -----	115
▪ <i>Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy</i> -----	121
▪ <i>Mitochondrial studies in HAART-related lipodystrophy: from experimental hypothesis to clinical findings</i> -----	131
5.2. RESULTATS EN PACIENTS ASSIMPTOMÀTICS INFECTATS PEL VIH	147
5.2.1. Efecte dels antiretrovirals sobre els mitocondris de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	147
▪ <i>Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients</i>	149
▪ <i>Longitudinal study on mitochondrial effects of didanosine-tenofovir combination</i> -----	163
▪ <i>Upregulatory mechanisms compensate for mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine</i> -----	175
5.2.2. Efecte de la infecció pel VIH sobre els mitocondris de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	185
▪ <i>Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals --</i>	187
▪ <i>HIV infection, antiretrovirals and apoptosis: studies on skeletal muscle--</i>	199
6. DISCUSSIÓ GLOBAL.....	207
7. CONCLUSIONS FINALS	223
8. BIBLIOGRAFIA.....	227
9. ANNEX	261

- *Reversible mitochondrial respiratory chain impairment during symptomatic hyperlactatemia associated with antiretroviral therapy*----- 265
- *Effect of smoking cessation on mitochondrial respiratory chain function*- 273
- *Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain* ----- 281
- *Análisis ex vivo de la función mitocondrial en pacientes intoxicados por monóxido de carbono atendidos en urgencias* ----- 289
- *Enzymatic diagnosis of oxidative phosphorylation defects on muscle biopsy: better on tissue homogenate or on a mitochondria-enriched suspension?* - 297
- *Mitochondrial effects of a 24-week course of pegylated-interferon plus ribavirin in asymptomatic HCV/HIV co-infected patients on long-term treatment with didanosine, stavudine or both* ----- 305
- *Lopinavir/ritonavir plus nevirapine as a nucleoside-sparing approach in antiretroviral-experienced patients (neka study)*----- 317
- *Mitochondrial respiratory chain in brain homogenates: activities in different brain areas in patients with alzheimer's disease* ----- 325
- *Non-invasive diagnosis of mitochondrial dysfunction in HAART-related hyperlactatemia*----- 335
- *In vivo effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrially-driven apoptosis*----- 339

ABREVIATURES

ABC: abacavir.

ADN: àcid desoxiribonucleic.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADNn: ADN nuclear.

ADNpol- γ : ADN polimerasa- γ .

ADP: adenosina difosfat.

AIF: factor d'inducció de l'apoptosi; o *apoptosis inducing factor*.

ARN: àcid ribonucleic.

ARNm: ARN missatger.

ARNr: ARN ribosòmic.

ARNt: ARN de transferència.

ARV/s: antiretroviral/s.

ATP/ADP Trans: ATP/ADP translocasa.

ATP: adenosina trifosfat.

ATPasa: ATP sintasa o complex V (C V).

AZT: zidovudina.

Bucle D: bucle de desplaçament.

C I: complex I o NADH-CoQ reductasa.

C II: complex II o succinat-CoQ reductasa.

C III: complex III o CoQH₂-cit c reductasa.

C IV: complex IV o citocrom c oxidasa.

C V: complex V o ATP sintasa.

CAD: ADNasa activada per caspasa; o *caspase activated DNAase*.

Cadena H: cadena pesada o *heavy*.

Cadena L: cadena lleugera o *light*.

CD: cèl·lules dendrítiques; o cèl·lules de Lagerhans.

Cit b: citocrom b.

Cit c: citocrom c.

CMSP: cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.

CN: cianur.

CO: monòxid de carboni.

CoQ: coenzim Q (oxidat) o ubiquinona (oxidada).

CoQH•: radical semiquinona.

CoQH₂: coenzim Q (reduït) o ubiquinol (reduït).

CRABP-1: proteïna citoplasmàtica de tipus 1 d'unió a l'àcid retinoic; o *cytoplasmic retinoic acid binding protein type 1*.

CS: citrat sintasa.

CTE/CRM: cadena de transport electrònic o cadena respiratòria mitocondrial.

Cu: coure.

d4T: estavudina.

ddC: zalcitabina.

ddl: didanosina.

ddNTPs: dideoxinucleòsids trifosfat (o dideoxinucleòtids).

DHAP: dihidroxiacetona fosfat.

DLV: delavirdina.

e-: electrons.

EFV: efavirenz.

ELISA: *enzyme linked immunosorbed assay*.

F₀: subunitat F₀ de l'ATPasa o complex V.

F₁: subunitat F₁ de l'ATPasa o complex V.

FAD: flavina adenina dinucleòtid (oxidada).

FADH₂: flavina adenina dinucleòtid (reduïda).

FDA: *food and drug administration*.

Fe-S: centre ferro-sulfurat.

FMN: flavina mononucleòtid.

FTC: emtricitabina.

G3P: glicerol-3-fosfat.

GDHct: glicerol-3-fosfat deshidrogenasa citosòlica.

GDHmt: glicerol-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial.

Gp: complexos glucoproteics.

H⁺: protó.

H₂O: aigua.

H₂O₂: peròxid d'hidrogen.

HTLV-1: virus de la leucèmia humana de cèl·lules T tipus 1.

HTLV-2: virus de la leucèmia humana de cèl·lules T tipus 2.

IDV: indinavir.

IF: inhibidors de la fusió.

IP: inhibidors de la proteasa.

ITI: inhibidors de la transcriptasa inversa.

ITIAN: inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsid (o nucleòtid).

ITINAN: inhibidors de la transcriptasa inversa no-anàlegs de nucleòsid.

Kb: kilobases.

KSS: síndrome de Kearns Sayre.

LD: lipodistròfia.

LDH: lactat deshidrogenasa.

LDL: lipoproteïna de baixa densitat; o *low density lipoprotein*.

Limfòcits NK: limfòcits *natural killers*.

LPL: lipoproteïna lipasa.

LRP: proteïna associada al receptor de la lipoproteïna de baixa densitat; o *LDL-receptor-related protein*.

LTNP: pacients infectats pel VIH no progressadors; o *long-term non-progressors*.

LTR: *long terminal repeat*.

MIP-1 α : (quimioquina) proteïna inflammatòria dels macròfags 1 α ; o *macrophage inflammatory protein-1 α* .

MIP-1 β : (quimioquina) proteïna inflammatòria dels macròfags 1 β ; o *macrophage inflammatory protein-1 β* .

M-tròpiques: soques víriques monocitotròpiques.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleòtid (oxidada).

NADH: nicotinamida adenina dinucleòtid (reduïda).

NDH: NADH deshidrogenasa.

NF-KB: factor nuclear KB; o *nuclear factor KB*.

NFV: nelfinavir.

NO: òxid nítric.

NVP: nevirapina.

O₂⁻: ions superòxid.

OH⁻: anió hidroxil.

O_H: origen de replicació de la cadena H.

O_L: origen de replicació de la cadena L.

ONOO⁻: peroxinitrit.

ONUSIDA: organització de les nacions unides sobre el VIH/sida.

pb: parells de bases.

PCR: reacció en cadena de la polimerasa; o *polymerase chain reaction*.

PDH: piruvat deshidrogenasa.

PEO: oftalmoplejia externa progressiva.

Pi Trans: fosfat inorgànic translocasa.

Pi: fosfat inorgànic.

PPAR- γ : *peroxisome proliferator activated receptor γ* .

PTP: porus de transició; o *permeability transition pore*.

RANTES: (quimioquina) *regulated upon activation normal T expressed and secreted*.

R-OOH: hidrperòxids.

ROS: espècies reactives d'oxigen; o *reactive oxygen species*.

RRF: fibres roges-desestructurades; o *ragged-red fibers*.

RTV: ritonavir.

SDF-1: (quimioquina) factor tipus 1 derivat de l'estroma; o *stroma derived factor type 1*.

SDH: succinat deshidrogenasa.

sida: síndrome de la immunodeficiència adquirida.

sistema OXPHOS: sistema de fosforilació oxidativa.

SMAC-Diablo: *second mitochondria-derived activator of caspases*, o la seva forma homòloga al ratolí, anomenada Diablo.

SNC: sistema nerviós central.

SQV: saquinavir.

SREBP: *sterol regulatory element-binding protein*.

T-20: enfuvirtide.

TAR: element de resposta a la transactivació; o *transactivation response element*.

TARGA: teràpia antiretroviral de gran activitat.

TDF: tenofovir disoproxil fumarat.

TI: transcriptasa inversa.

TNF- α : factor de necrosi tumoral α ; o *tumor necrosis factor α* .

T-tròpiques: soques víriques limfotròpiques.

TUNEL: *deoxyribonucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-biotin nick-end labeling*.

VIH-1: virus de la immunodeficiència humana tipus 1.

VIH-2: virus de la immunodeficiència humana tipus 2.

VIS: virus de la immunodeficiència dels simis.

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat; o *very low density lipoprotein*.

$\Delta\Psi_{mt}$: potencial de membrana mitocondrial.

Δp : força prò-motriu.

λ : longitud d'ona.

3TC: lamivudina.