



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**Facultad de Medicina y Odontología**

**PAPEL CENTRAL DE LA MITOCONDRIA EN LA  
HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR EFAVIRENZ**

**Tesis doctoral**

**LEYSA JACKELINE GÓMEZ SUCERQUIA**

**UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA**

**Directores:**

**Juan Vicente Esplugues Mota**

**Nadezda Apostolova**

**Valencia, 2013**



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

Dr. **JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA**, Catedrático de Universidad en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia y

Dra. **NADEZDA APOSTOLOVA**, Investigadora postdoctoral en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia

certifican:

Que el trabajo titulado “Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz”, presentado por la Licenciada en Biología **Dña. Leysa Jackeline Gómez Sucerquia**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral. Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 8 de Mayo de 2013

Fdo. Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

Fdo. Dra. Nadezda Apostolova



Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de los siguientes proyectos:

“Toxicidad mitocondrial por antirretrovirales: caracterización de un nuevo mecanismo agudo de acción” (Ref.: PI081325), IP: Juan Vicente Esplugues Mota, Entidad financiadora: Ministerio de ciencia e innovación. 2009 - 2011.

“Caracterización de nuevos mecanismos celulares de hepatotoxicidad por antirretrovirales” (Ref.: PI11/00237), IP: Juan Vicente Esplugues Mota, Entidad financiadora: Ministerio de economía y competitividad. 2012 - 2014.

“Influencia de la autofagia y estrés reticular en la hepatotoxicidad inducida por antirretrovirales” (Ref.: UV-INV-PRECOMP12-80613), IP: Nadezda Apostolova, Entidad financiadora: Universidad de Valencia. 2012 - 2013.



***A mi familia***





## AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral es una gran aventura que implica mucho esfuerzo, tiempo y dedicación, trae consigo muchos momentos difíciles pero también muchas satisfacciones. Afortunadamente siempre hay personas que directa o indirectamente, contribuyen a lo largo de los años a que esta aventura llegue a buen puerto. Hoy cuando ya está casi terminada la tesis y me siento a escribir los agradecimientos, me doy cuenta de que en mi caso fueron muchas las personas que aportaron su granito de arena; a todos ellos muchas gracias!, sin ustedes esto no sería posible.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Juan Vicente Esplugues y a la Dra. Nadezda Apostolova por la dirección de esta tesis. Juan Vicente, muchas gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por confiar en mí a la hora de emprender este proyecto y por todo el apoyo y comprensión durante todos estos años. A Nade quiero agradecerle todo el tiempo y trabajo invertido en la planeación, realización y finalización de esta tesis, también por aportar todos sus conocimientos, intuición y experiencia y por procurar que hagamos siempre el mejor trabajo posible.

Mil gracias a todos mis compañeros de laboratorio que estuvieron conmigo codo a codo viviendo, sufriendo, pero sobre todo, disfrutando la ciencia: a Ana que desde que llegué al labo me acogió, me dio su apoyo en todo lo que necesité, que compartió conmigo tantos momentos buenos y malos y que me enseñó a sortear las dificultades. A Dolo, mi compañera de preguntas de la ESO, que me enseñó tantas y tantas cosas y que me mostró que se puede ser una excelente científica sin perder ni una pizca de calidez humana. A Annia, mi chica superpoderosa, que además de ser mi compañera de laboratorio se me metió en corazón y se convirtió en una gran amiga, siempre dispuesta a escucharme y darme animo en los momentos más difíciles de este proceso, gracias por tratar de hacer de mi una mejor persona. A Miri que es una

trabajadora incansable, siempre dispuesta a ayudar y a Irene, por darle vida y alegría al laboratorio, a ambas gracias por su compañía porque ya que pasamos tanto tiempo en el labo, siempre se agradece hacerlo en buena compañía. A Dani por hacer divertido el trabajo de laboratorio y por hacer mi vida en Valencia mucho más fácil y divertida. A Haryes, por toda su ayuda dentro del labo y los momentos de dispersión fuera del el. A Carmen por su dulzura y a Samu por su alegría, a Wil porque es una excelente persona, por enseñarme a tomarme las cosas con filosofía. A Natàlia, Clara, Maricel, Begoña y Reme, que aunque su estancia en el labo fue corta o no coincidimos mucho tiempo, cada una puso su toque de alegría, haciendo el día a día mucho mejor. A Amy, mi compañera del mundo celular y potenciadora del poder latino.

También quiero agradecer a los “mayores” que con su amplia experiencia y visión de la ciencia, siempre tienen buenos aportes que hacerte, a Loles, Sara, Ángeles, María Ángeles, Carlos y Elsa muchas gracias! y claro, también a Víctor que siempre tiene una sonrisa y un buen consejo.

A Brian y Amparo gracias por tanta paciencia en resolvernros tantos asuntos administrativos y a todos los miembros del departamento.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Juan Esplugues Requena Q.E.P.D., fundador de este grupo de investigación y de la fundación Juan Esplugues, de la que fui becaria durante mis primeros meses de tesis, gracias por apoyarme con la primera beca que tuve para emprender este proyecto.

No puedo dejar de agradecer a mis amigos, a los que no tienen nada que ver con mi tesis, pero que sin embargo han aguantado mis múltiples conversaciones sobre ella y sin quejarse ni una sola vez!

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi familia, a quienes dedico mi tesis: a mi mamá y a Caro que siempre me han apoyado, que hicieron todo lo posible para que yo pudiera iniciar esta aventura, que

siguieron esta tesis paso a paso y la vivieron conmigo y que siempre confiaron en que todo iba llegar a feliz término y a Tobias: Vielen Dank für deine Geduld in den vielen Jahren meiner Doktorarbeit, vielen Dank für deine Unterstützung und für die Kraft die du mir gegeben hast jedes mal wenn ich das Handtuch werfen wollte. Ich Danke dir, dass du an mich geglaubt hast mehr als ich selber geglaubt habe und dass du mein Leben im Gleichgewicht hältst, denn Wissenschaft kann nicht alles sein!



# **ABREVIATURAS**

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
3MA	3-metiladenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
Apaf-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ASK1	Quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis
ATF6	Factor activador de la transcripción 6
ATP	Adenosin trifosfato
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
BCA	Ácido bicinconínico
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina (o GRP78)
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
c[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentración de calcio citosólico
C(I-V)	Complejo I al V
CAD	DNasa activada por caspasas
Casp(-1-14)	Caspasas -1 a -14
CCCP	Carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone
CHOP	Proteína homóloga de C/EBP (o GADD153)
COX	Citocromo c oxidasa o Complejo IV
CTE	Cadena transportadora de electrones
CYP	Citocromo P450
CyPA	Ciclofilina A
cyt c	Citocromo c

d4T	Estavudina
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EFV	Efavirenz
eIF2 $\alpha$	Factor 2 de la iniciación de la traducción en eucariotas
EndoG	Endonucleasa G
ERAD	Sistema de degradación asociada con RE - <i>ER Associated Degradation</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERSE	Elemento de respuesta al estrés de RE
FasL	Ligando FAS
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonylcianida-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
GADD153	Gen 153 inducible por detención del crecimiento y daño del ADN (o CHOP)
GPX	Glutación peroxidasas
GRP78	Proteína regulada por glucosa de 78kDa (o BiP)
GSH	Glutación reducido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HBSS	<i>Hank´s Balanced Salt Solution</i>
HO•	Radical hidroxilo
Hoechst 33342	BisBenzimide H33342 trihydrochloride
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HUVEC	Células endoteliales humanas de cordón umbilical
IAP	Inhibidores endógenos de caspasas
ICAD	Inhibidor de DNasa activada por caspasas

Icorr	Índice de correlación
IF	Inhibidores de la fusión
II	Inhibidores de la integrasa
IP	Inhibidores de la proteasa
IP	Ioduro de propidio
IRE1	Enzima que requiere inositol 1
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
JNK	Quinasa c-Jun amino-terminal
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma
mARN	ARN mensajero
MCP	Muerte celular programada
MEM	Medio mínimo esencial
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MnSOD	Manganeso Superóxido dismutasa
mt[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentración de calcio mitocondrial
mtADN	ADN mitocondrial
mTOR	Proteína blanco de la rapamicina en mamíferos
nADN	ADN nuclear
NAO	10-N-nonyl naranja de acridina
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Anión superóxido
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PARP	Poli (ADP ribosa) polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína isomerasa disulfuro



PE	Fosfatidiletanolamina
p-eIF2 $\alpha$	eIF2 $\alpha$ fosforilado en la serina 51
PERK	Quinasa del RE similar a la proteína quinasa de RNA
PI3P	Fosfatidilinositol trifosfato
PNP	p-nitrofenilfosfato
Pol- $\gamma$	ADN polimerasa $\gamma$
PT	Poros de transición mitocondrial
RE	Retículo endoplasmático
RO•	Radical alcoxilo
ROO•	Radical peroxilo
Rot	Rotenona
RT-PCR	PCR con retrotranscripción
RTV	Ritonavir
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
siCHOP	CHOP silenciado
siControl	Control de silenciamiento
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Smac/Diablo	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI
SQV	Saquinavir
STS	Staurosporina
sXBP-1	XBP-1 maduro
TARc	Terapia Antirretroviral Combinada
TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
TBS-T	Tampón tris salino con Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TG	Tapsigargina
TLR	Receptores tipo Toll
TMRM	Tetrametilrodamina

TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor del factor de necrosis tumoral 1
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
UPR	Respuesta a proteínas sin plegar - <i>unfolded protein response</i>
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB	Western blot
XBP-1	Proteína-1 ligadora de la caja X

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>	
I.1.	Representación esquemática del ciclo de vida del VIH	4
I.2.	Representación esquemática de la estructura de la mitocondria con sus principales componentes	20
I.3.	Representación esquemática de la señalización de la muerte celular por apoptosis	28
I.4.	Representación de los tres tipos de autofagia	33
I.5.	Factores desencadenantes del proceso de autofagia y sus consecuencias	35
I.6.	Representación del proceso de autofagia	38
I.7.	Representación esquemática de la UPR desencadenada por la presencia de estrés de RE	45
I.8.	Implicación del estrés de RE y de la UPR en el proceso de muerte celular por apoptosis	49
IV.1.	Efecto del tratamiento de EFV sobre la proliferación de células Hep3B	94
IV.2.	Efecto del tratamiento de EFV sobre la viabilidad celular de las líneas celulares Hep3B, HeLa y HUVEC	95
IV.3.	Análisis del ciclo celular por citometría estática	97
IV.4.	Activación de la apoptosis en células Hep3B después de 24 h de tratamiento con EFV.	99
IV.5.	Análisis por Western blot de proteínas mitocondriales proapoptóticas	100
IV.6.	Análisis de la activación de las caspasas 3 y 9	101
IV.7.	Efecto de EFV en la producción de superóxido mitocondrial.	104

IV.8.	Efecto de EFV en los niveles intracelulares de GSH	105
IV.9.	Efecto de EFV en el potencial de membrana mitocondrial	106
IV.10.	Efecto del tratamiento con EFV sobre el potencial de membrana y la producción de superóxido mitocondrial en hepatocitos primarios humanos	107
IV.11.	Efecto de la remoción de EFV sobre la función mitocondrial de células Hep3B	108
IV.12.	Masa mitocondrial en células tratadas con EFV	110
IV.13.	Efecto del antioxidante Trolox sobre células Hep3B tratadas con EFV	111
IV.14.	Efecto del tratamiento de EFV sobre la expresión de proteínas mitocondriales	113
IV.15.	Cuantificación del ratio relativo de mtDNA/nDNA por PCR cuantitativa genómica	114
IV.16.	Determinación de la masa mitocondrial a través de la expresión de la proteína mtdsRED	115
IV.17.	Análisis de la morfología mitocondrial	116
IV.18.	Alteraciones mitocondriales en hepatocitos primarios	117
IV.19.	Expresión de proteínas marcadoras de autofagia	119
IV.20.	Análisis de la expresión de LC3 por microscopía de fluorescencia	121
IV.21.	Evaluación de la formación de autofagolisosomas por microscopía confocal	122
IV.22.	Evaluación de la degradación mitocondrial autofágica por microscopía confocal	124
IV.23.	Análisis del flujo autofágico	125
IV.24.	Expresión de LC3 en hepatocitos primarios	127

IV.25.	Relación de la autofagia con la supervivencia de células Hep3B	128
IV.26.	Papel de la autofagia sobre la apoptosis inducida por EFV	129
IV.27.	Relación de la autofagia con la supervivencia de hepatocitos primarios	130
IV.28.	Expresión diferencial de 8 grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés y toxicidad a 8 h de tratamiento	137
IV.29.	Expresión diferencial de 8 grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés y toxicidad a 24 h de tratamiento	138
IV.30.	Validación de la micromatriz por RT-PCR en tiempo real en células Hep3B	139
IV.31.	Validación de la micromatriz a nivel de proteína en células Hep3B	140
IV.32.	Validación de la micromatriz por RT-PCR en tiempo real en hepatocitos primarios	141
IV.33.	Validación de la micromatriz a nivel de expresión de proteínas en hepatocitos primarios	142
IV.34.	Análisis por WB de la expresión de los marcadores de estrés de RE a 8 h de tratamiento	144
IV.35.	Análisis por WB de la expresión de los marcadores de estrés de RE a 24 h de tratamiento	145
IV.36.	Análisis por PCR de la expresión de los marcadores de estrés de RE	147
IV.37.	Análisis por medio de microscopía de fluorescencia de la concentración de calcio citosólico	149
IV.38.	Análisis de la señal del RE	150
IV.39.	Análisis de la activación de la casp-7	151
IV.40.	Silenciamiento de CHOP	153

<b>IV.41.</b>	<b>Reservorios de calcio intracelular</b>	<b>155</b>
<b>IV.42.</b>	<b>Determinación de fenotipo Hep3B Rho<sup>0</sup></b>	<b>157</b>
<b>IV.43.</b>	<b>Marcadores de estrés de RE en células Rho<sup>0</sup></b>	<b>158</b>
<b>IV.44.</b>	<b>Análisis cuantitativo de la intensidad de la señal del RE en células Rho<sup>0</sup></b>	<b>159</b>
<b>V.1.</b>	<b>Representación esquemática del efecto mitotóxico inducido por EFV en células hepáticas</b>	<b>180</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
I.1. Familias de fármacos antirretrovirales utilizadas para tratar la infección por VIH	<b>7</b>
I.2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH	<b>10</b>
I.3. Principales efectos adversos asociados al uso de los fármacos antirretrovirales	<b>12</b>
III.1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los análisis por WB	<b>69</b>
III.2. Cebadores empleados en las reacciones de PCR	<b>83</b>
III.3. Genes contenidos en la micromatriz de mARN RT2Profiler™ PCR Array: Human Stress and ToxicityFinder™	<b>85</b>
III.4. Cebadores y condiciones de la PCR, empleados en la validación por RT-PCR de la micromatriz	<b>88</b>
IV.1. Expresión de los genes de la micromatriz “RT2 Human Stress and Toxicity Pathway Finder™”	<b>133</b>





# RESUMEN



La toxicidad hepática y los desordenes metabólicos son los principales efectos adversos asociados al tratamiento farmacológico de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El Efavirenz (EFV) es el miembro de la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN) más ampliamente utilizado en el tratamiento del VIH. Su uso ha sido asociado con el desarrollo de diversos efectos adversos, entre ellos la hepatotoxicidad, pero los mecanismos celulares y moleculares responsables de su aparición aún no han sido caracterizados, aunque algunos trabajos recientes vinculan su toxicidad con disfunción mitocondrial.

En esta tesis, describimos un mecanismo agudo de citotoxicidad por EFV empleando un modelo in vitro de células hepáticas humanas expuestas a concentraciones del fármaco clínicamente relevantes (entre 5 y 50  $\mu\text{M}$ ).

El tratamiento con EFV afectó directamente la función mitocondrial de manera reversible, incluyendo disminución del potencial de membrana y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) de origen mitocondrial, seguido por una reducción en el contenido de glutatión. Además el tratamiento con EFV redujo la viabilidad y la proliferación celular y activó los programas de muerte celular, observándose la producción de apoptosis con la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . La disfunción mitocondrial en las células tratadas con EFV fue acompañada con un incremento en la masa mitocondrial y defectos en la morfología de estas organelas. También se pudo detectar la presencia de la degradación autofágica, específicamente la mitofagia, con la particularidad de que concentraciones moderadas de EFV inducen degradación mitofágica asociada con la supervivencia celular, mientras que concentraciones elevadas inducen un bloqueo en el flujo autofágico, causando estrés autofágico, fenómeno que puede explicar el incremento en la masa mitocondrial. Los efectos deletéreos de EFV fueron parcialmente revertidos por el tratamiento con el antioxidante Trolox, lo que sugiere que la generación de ERO está involucrada por lo menos parcialmente en su toxicidad. Al analizar el efecto del EFV sobre una micromatriz de genes relacionados con estrés y toxicidad, encontramos que EFV modifica

principalmente la expresión de genes relacionados con i) estrés metabólico, ii) estrés oxidativo e iii) inflamación. El tratamiento con EFV también indujo estrés de retículo endoplasmático (RE), que fue acompañado por la respuesta a proteínas no plegadas; esto se pudo ver por el incremento en los principales marcadores de este tipo de estrés como CHOP, GRP78, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y el procesamiento de XBP1; además, el tratamiento con EFV también incrementó el contenido de calcio citosólico. La respuesta al estrés de RE generada por el EFV fue notablemente atenuada en células Rho<sup>0</sup>, que carecen de mitocondrias funcionales, lo que vincula directamente a la mitocondria con este tipo de respuesta. Un hecho destacable acerca del efecto del EFV sobre el RE y su relación con la mitocondria, es que aunque induce estrés de RE, lo hace por un mecanismo diferente al observado con un inductor típico de este tipo de estrés como es la taspigargina.

# ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. GENERALIDADES DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....</b>	<b>3</b>
1.1. Ciclo de vida e infección por el virus de inmunodeficiencia humana ....	3
<b>2. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL .....</b>	<b>5</b>
2.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos / nucleótidos (ITIAN).....	6
2.2. Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITINAN).....	8
2.3. Inhibidores de la proteasa (IP).....	8
2.4. Inhibidor de la integrasa (II) .....	9
2.5. Inhibidor de la fusión (IF).....	9
2.6. Inhibidor del correceptor CCR5.....	9
2.7. Pauta antirretroviral .....	9
<b>3. EFECTOS ADVERSOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL .....</b>	<b>11</b>
3.1. Hepatotoxicidad asociada a la terapia antirretroviral .....	14
3.2. Toxicidad mitocondrial .....	15
<b>4. EFAVIRENZ (EFV).....</b>	<b>16</b>
<b>5. MITOCONDRIA .....</b>	<b>18</b>
5.1. Estructura mitocondrial.....	18
5.2. Función mitocondrial.....	19
<b>6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....</b>	<b>21</b>
6.1. Estrés oxidativo .....	22
<b>7. MUERTE CELULAR.....</b>	<b>24</b>
7.1. Apoptosis.....	25
7.1.1. Clasificación de la apoptosis .....	26
7.1.1.1 Vía intrínseca .....	27

7.1.1.2 Vía extrínseca .....	29
7.1.1.3 Convergencia de las vías intrínseca y extrínseca y fase de ejecución .....	30
7.2. Autofagia.....	32
7.2.1 Autofagia y enfermedad hepática .....	35
7.2.2. Proceso de autofagia .....	36
7.3. Necrosis .....	40
<b>8. ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO .....</b>	<b>41</b>
8.1. Retículo endoplasmático .....	41
8.2. Respuesta a proteínas no plegadas (UPR) .....	42
8.3. Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis.....	46
8.4. Estrés de retículo endoplasmático en el hígado.....	48
 <b>II. OBJETIVOS .....</b>	 <b>51</b>
 <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	 <b>55</b>
 <b>1. REACTIVOS .....</b>	 <b>57</b>
1.1. Obtención de efavirenz .....	57
1.2. Reactivos químicos generales.....	57
1.3. Reactivos para el cultivo celular .....	58
 <b>2. CULTIVO CELULAR.....</b>	 <b>58</b>
2.1. Líneas celulares.....	58
2.2. Cultivos primarios .....	59
2.3. Mantenimiento de los cultivos celulares .....	59
2.4. Experimentos de transfección .....	60
2.4.1. Sobreexpresión de proteínas .....	60
2.4.2. Silenciamiento de CHOP .....	61
2.5. Generación y mantenimiento de células Rho <sup>0</sup> .....	61



<b>3. TRATAMIENTOS.....</b>	<b>62</b>
<b>4. PROLIFERACIÓN CELULAR.....</b>	<b>62</b>
<b>5. VIABILIDAD CELULAR.....</b>	<b>63</b>
<b>6. EXPRESIÓN PROTEICA.....</b>	<b>63</b>
6.1. Obtención de las muestras .....	63
6.1.1. Obtención de extractos proteicos totales.....	64
6.1.2. Extractos proteicos totales protegiendo las fosforilaciones.....	64
6.1.3. Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en mitocondrias.	65
6.2. Cuantificación de proteínas.....	65
6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western blot (WB) .....	66
6.3.1. Geles de poliacrilamida.....	66
6.3.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	67
6.3.3. Detección por quimioluminiscencia .....	68
6.3.4. Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa.....	68
<b>7. DETECCIÓN DE GLUTATIÓN (GSH) .....</b>	<b>70</b>
<b>8. DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL POR FLUORIMETRÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>9. DETECCIÓN DE CALCIO MITOCONDRIAL.....</b>	<b>70</b>
<b>10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CITOMETRÍA ESTÁTICA.....</b>	<b>71</b>
10.1. Apoptosis .....	72
10.1.1. Análisis bivariado de Anexina V/IP.....	72
10.1.2. Evaluación de los núcleos durante la apoptosis.....	72
10.1.3. Detección de las caspasas 3, 8 y 9 .....	73
10.2. Análisis del ciclo celular.....	73
10.3. Detección del ion superóxido mitocondrial.....	73
10.4. Detección del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	74

10.5. Determinación de la masa mitocondrial .....	74
10.5.1. 10-N-nonyl naranja de acridina (NAO) .....	74
10.5.2. Proteína mtdsRed .....	75
10.6. Expresión y localización de LC3 .....	75
10.7. Contenido lisosomal.....	75
10.8. Contenido de calcio citosólico .....	76
10.9. Cinética del calcio del retículo endoplasmático.....	76
10.10. Señal de retículo endoplasmático .....	76
<b>11. MICROSCOPIA CONFOCAL .....</b>	<b>77</b>
11.1. Activación de la autofagia - colocación de lisosomas y LC3 .....	77
11.2. Degradación mitocondrial - colocación de lisosomas y mitocondrias .....	78
11.3. Señal del retículo endoplasmático.....	78
<b>12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....</b>	<b>78</b>
<b>13. ANÁLISIS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) ....</b>	<b>79</b>
13.1. Extracción de ácidos nucleicos .....	79
13.1.1. Extracción de ADN.....	79
13.1.2. Extracción de ARN.....	79
13.1.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos .....	80
13.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por retotranscripción (RT) .	80
13.3. PCR semicuantitativa .....	81
13.4. PCR cuantitativa en tiempo real .....	81
13.4.1. Determinación del número de copias de ADN mitochondrial .....	82
13.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real .....	82
13.5. Micromatriz de RT-PCR en tiempo real .....	83
<b>14. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>88</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>

<b>BLOQUE 1: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR AL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ.....</b>	<b>93</b>
1. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ REDUCE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD, Y ADEMÁS ALTERA EL CICLO CELULAR.....	93
1.1. Análisis de la proliferación celular .....	93
1.2. Análisis de la viabilidad celular .....	95
1.3. Análisis del ciclo celular .....	96
2. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ PRODUCE APOPTOSIS .....	96
3. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ COMPROMETE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	102
3.1. Determinación de los niveles mitocondriales de superóxido.....	102
3.2. Cuantificación de los niveles intracelulares de glutatión (GSH) ....	103
3.3. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).....	105
3.4. Evaluación de la producción de superóxido mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial en hepatocitos primarios humanos.....	106
3.5. Reversibilidad de la producción de superóxido mitocondrial y la reducción del potencial de membrana mitocondrial .....	108
4. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ INDUCE UN INCREMENTO EN LA MASA MITOCONDRIAL.....	109
4.1. Evaluación de la señal y la masa mitocondrial.....	109
4.2. Reversión del efecto de efavirenz sobre la proliferación y la masa mitocondrial .....	109
4.3. Evaluación del contenido proteico mitocondrial .....	112
4.4. Determinación de la cantidad de ADN mitocondrial .....	112
4.5. Cuantificación de la masa mitocondrial a través de la expresión de la proteína mtdsRED.....	114
4.6. Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión .....	115
<b>BLOQUE 2: AUTOFAGIA .....</b>	<b>118</b>
1. INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA.....	118

1.1. Determinación de los niveles de expresión de proteínas asociadas con la autofagia .....	118
1.2. Evaluación de la fluorescencia del LC3-GFP .....	120
1.3. Evaluación de la formación de autofagolisosomas .....	120
2. CONCENTRACIONES MODERADAS DE EFAVIRENZ INDUCEN DEGRADACIÓN MITOCONDRIAL POR AUTOFAGIA, MIENTRAS QUE ALTAS CONCENTRACIONES DE EFV INDUCEN ESTRÉS AUTOFÁGICO .....	123
2.1. Evaluación de la degradación mitocondrial por autofagia .....	123
2.2. Análisis del flujo autofágico por Western blot .....	125
3. LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR EFAVIRENZ PROMUEVE LA SUPERVIVENCIA CELULAR .....	126
<b>BLOQUE 3: PERFIL DE ESTRÉS Y TOXICIDAD. ....</b>	<b>131</b>
1. MICROMATRIZ DE RT-PCR EN TIEMPO REAL DE GENES IMPLICADOS EN ESTRÉS Y TOXICIDAD .....	131
1.1. Expresión de genes relacionados con estrés y toxicidad a 8 h de tratamiento con efavirenz.....	131
1.2. Expresión de genes relacionados con estrés y toxicidad a 24 h de tratamiento con efavirenz.....	135
2. VALIDACIÓN DE LA MICROMATRIZ .....	136
2.1. RT-PCR en tiempo real .....	136
2.2. Validación de la expresión de proteína .....	140
2.3. Hepatocitos primarios humanos.....	141
<b>BLOQUE 4: ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO .....</b>	<b>143</b>
1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE) .....	143
1.1. EFV aumenta la expresión de proteínas relacionadas con estrés de retículo endoplasmático .....	143
1.2. Evaluación de los niveles de mRNA de genes indicadores de estrés de retículo endoplasmático .....	146
1.3. Determinación de los niveles citosólicos de calcio.....	146

1.4. Evaluación de la morfología y el contenido del retículo endoplasmático .....	148
<b>2. DIFERENCIACIÓN DEL PERFIL DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE EFAVIRENZ vs TAPSIGARGINA .....</b>	<b>151</b>
2.1. Activación de la caspasa 7 .....	151
2.2. Silenciamiento de CHOP.....	152
2.3. Diferencias en la dinámica del calcio intracelular entre efavirenz y tapsigargina.....	152
2.3.1. Cinética del calcio citosólico .....	154
2.3.2. Determinación de los niveles de calcio mitocondrial .....	154
<b>3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUCIDO POR EFAVIRENZ.....</b>	<b>156</b>
3.1. Marcadores de estrés de retículo endoplasmático en células Rho <sup>0</sup> .	156
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>161</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>219</b>
<b>PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA DERIVADA DE ESTA TESIS .....</b>	<b>220</b>









# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. GENERALIDADES DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es causado por una infección crónica con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que se clasifica dentro de la familia *Retroviridae* y pertenece al género *Lentivirus* (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Se han identificado dos tipos de VIH genéticamente distintos: VIH-1 y VIH-2. El subtipo VIH-1 está más extendido y asociado con la mayoría de los casos de infección en el mundo, mientras que el subtipo VIH-2 se encuentra fundamentalmente en África occidental y es menos patogénico y transmisible (De Cock *et al.*, 1993). Según la OMS y ONUSIDA, a finales de 2011 había en el mundo unos 34,2 millones de personas infectadas por el VIH. Ese mismo año, contrajeron la infección aproximadamente 2,5 millones de personas, y alrededor de 1,7 millones murieron por causas relacionadas con el SIDA, entre ellos 230000 niños (OMS and UNISIDA, 2012).

### 1.1. Ciclo de vida e infección por el virus de inmunodeficiencia humana

Como todos los virus, el VIH no se puede replicar por sí mismo, debe hacerlo dentro de las células, utilizando para ello su maquinaria. Los retrovirus como el VIH tienen el material genético en forma de ácido ribonucleico (ARN) y una vez dentro de las células hospederas utilizan la enzima transcriptasa inversa para convertir su ARN en ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual puede ser incorporado en el genoma humano y así utilizar la maquinaria celular para su expresión (Smith and Daniel, 2006).

El ciclo de vida del VIH está compuesto por varios pasos (Fig. 1.1.). Empieza por la unión del virus a la membrana de la célula hospedera por medio de una interacción específica entre el virus y el receptor CD4 de la célula.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

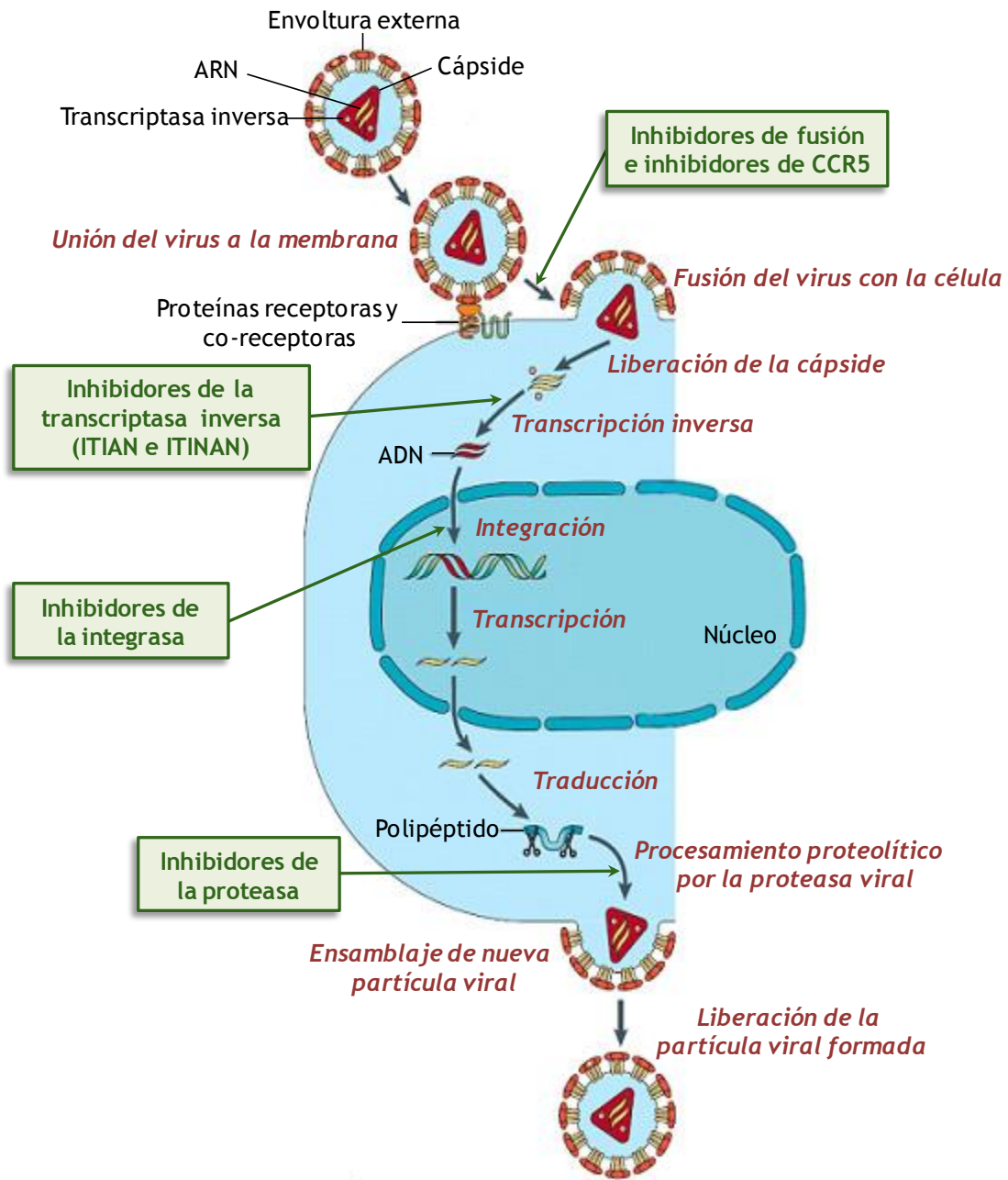


Fig. 1.1. Representación esquemática del ciclo de vida del VIH. El texto en negro muestra las estructuras del virus y de la célula involucradas en la replicación del virus. En rojo se pueden ver las diferentes etapas del ciclo replicativo, desde la unión del virus a la membrana hasta la liberación de nuevas partículas virales. Los cuadros verdes representan las diferentes familias de fármacos antirretrovirales y el punto del ciclo del virus en el cual actúan. Modificado de (De Clercq, 2002).

Después el virus se fusiona con la célula, lo que permite la entrada del contenido de la cápside viral en la célula hospedera. Tras la retrotranscripción del ARN viral en ADN por la transcriptasa inversa del VIH, el ADN del VIH se dirige al núcleo donde con ayuda de la integrasa vírica se integra al ADN celular y después de la transcripción y traducción, mediante la acción de la proteasa vírica se producen nuevas partículas virales (Smith and Daniel, 2006; Zheng *et al.*, 2005).

La transmisión del HIV se da a través de contacto sexual, por exposición parenteral a sangre o productos sanguíneos contaminados y por transmisión vertical de la madre al feto o al neonato durante el parto o a través de la leche materna (Anderson and May, 1988; Crandall, 2001).

Aunque el curso de la infección por VIH puede ser muy variable entre los diferentes pacientes, se caracteriza por presentar una breve fase aguda asociada con altos niveles de viremia que suele ser clínicamente asintomática; a esta le sigue una fase de latencia en la cual se produce un deterioro gradual del sistema inmune manifestado por la disminución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> llegando por último al desarrollo del SIDA. Esta última etapa se caracteriza por una disminución drástica en los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (a menos de 200 células/ $\mu$ L) y en consecuencia por un incremento de la carga viral, efectos acompañados por un aumento en la aparición de enfermedades oportunistas (Pantaleo *et al.*, 1993).

## 2. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

El primer fármaco antirretroviral empleado en la lucha contra el VIH fue Zidovudina (AZT), que fue sintetizado por Hortwitz en 1964 como un falso nucleósido para ser utilizado como antineoplásico. En 1985 se publicó que AZT tenía actividad *in vitro* frente al VIH (Mitsuya *et al.*, 1985) y en 1987 se aprobó su uso para el control de esta infección (Fischl *et al.*, 1987).

## Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

La introducción de los primeros compuestos de nuevas familias farmacológicas a mediados de los 90, marcó el inicio de un nuevo tipo de terapia, conocida como Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) o Terapia Antirretroviral Combinada (TARc), que consiste en la combinación de varios fármacos antirretrovirales. Cada uno de los fármacos antirretrovirales aprobados es capaz de reducir los valores de ARN viral en plasma y de recuperar el número de células CD4<sup>+</sup>, pero solo mediante la administración de la TARGA durante un largo período de tiempo, se consigue la supresión sostenida de la carga viral y una recuperación significativa del sistema inmune. Como resultado, se ha reducido significativamente la mortalidad y la morbilidad en los pacientes infectados por VIH (Mocroft *et al.*, 2003; Panos *et al.*, 2008).

Actualmente se emplean 26 fármacos antivirales en el tratamiento de la infección por VIH (Tabla I.1.), estos se clasifican en seis familias según el mecanismo por el cual interfieren en el ciclo replicativo del virus (Fig. I.1.): los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIAN), los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN), los inhibidores de la proteasa (IP), los inhibidores de la integrasa (II), los inhibidores de la fusión (IF) y los inhibidores del correceptor CCR5 (de Bethune, 2010).

### **2.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos / nucleótidos (ITIAN)**

Los ITIAN fueron los primeros fármacos anti-VIH aprobados y su efecto se basa en la inhibición de la actividad de la transcriptasa inversa del VIH (Balzarini, 1994). Son derivados de los nucleósidos adenosina, citosina, guanosina y timina y una vez dentro de la célula, son fosforilados para generar la forma 5'-trifosfato que es incorporada en el ADN celular como sustrato alternativo.

FAMILIA	ABREVIATURA	FÁRMACO
ITIAN	AZT	Zidovudina
	ddl	Didanosina
	ddC	Zalcitabina
	d4T	Estavudina
	3TC	Lamivudina
	ABC	Abacavir
	FTC	Emtricitabina
	TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
ITINAN	NVP	Nevirapina
	DLV	Delavirdina
	EFV	Efavirenz
	ETR	Etravirina
	RPV	Rilpivirina
IP	SQV	Saquinavir
	RTV	Ritonavir
	IDV	Indinavir
	APV	Amprenavir
	NFV	Nelfinavir
	LPV	Lopinavir
	fAPV	Fosamprenavir
	ATV	Atazanavir
	TPV	Tripanavir
	DRV	Darunavir
II	RGV	Raltegravir
IF	ENF	Enfuvirtida
Inhibidor CCR5	MRC	Maraviroc

Tabla I.1. Familias de fármacos antirretrovirales utilizadas para tratar la infección por VIH.

### **Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

Su incorporación conduce a la terminación de la cadena de ADN ya que estas moléculas carecen del extremo 3'OH y evitan la incorporación de más nucleótidos (De Clercq, 2002; Hao *et al.*, 1990).

## **2.2. Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)**

Los ITINAN son agentes que inhiben la transcriptasa inversa del VIH uniéndose de manera no competitiva a un “bolsillo” hidrofóbico de la enzima, cerca de su sitio catalítico y produciendo cambios conformacionales que afectan su actividad (De Clercq, 2009). Los ITINAN se caracterizan por tener una larga vida media en plasma, lo cual posibilita la administración en una única dosis diaria. Debido a que se metabolizan a través de la ruta del citocromo P450 y al hecho de que existe cierta variabilidad en los isoenzimas implicados para cada compuesto, sus niveles plasmáticos pueden variar y pueden también existir interacciones con otros fármacos cuyo metabolismo dependa de la misma ruta. Estos compuestos también se caracterizan por tener una barrera baja al desarrollo de resistencias (Blas-Garcia *et al.*, 2011).

## **2.3. Inhibidores de la proteasa (IP)**

Los IP interfieren con el último paso del ciclo de replicación viral bloqueando la acción de la proteasa vírica y de esta manera impidiendo la formación de las partículas infecciosas del virus. Los IP se parecen a los sustratos de la proteasa del VIH, una enzima esencial para su ciclo de vida que se encarga de cortar las nuevas poliproteínas sintetizadas para generar proteínas maduras y funcionales (Wensing *et al.*, 2010).



## **2.4. Inhibidor de la integrasa (II)**

Esta familia de fármacos inhibe la actividad catalítica de la integrasa del VIH evitando así la inserción del genoma del VIH al genoma de la célula hospedera, un paso esencial en el ciclo de replicación del VIH. Actualmente, sólo se ha aprobado la comercialización del raltegravir, aunque se están realizando estudios con otros fármacos similares (Korolev *et al.*, 2011; Pandey, 2011).

## **2.5. Inhibidor de la fusión (IF)**

La enfuvirtida es el único IF disponible para el tratamiento de la infección por VIH. Este fármaco actúa impidiendo la entrada del virus a la célula hospedera uniéndose a la proteína gp41 que se encuentra en la cubierta del virus, evitando así la fusión del virus con la membrana de la célula (Matthews *et al.*, 2004).

## **2.6. Inhibidor del correceptor CCR5**

El maraviroc es el único inhibidor del correceptor CCR5 disponible. Actúa al inicio del ciclo del virus, evitando la entrada del VIH en la célula hospedera mediante el bloqueo de la actividad de correceptor CCR5 que facilita la entrada de algunas cepas de VIH (Ghebremedhin, 2012).

## **2.7. Pauta antirretroviral**

El uso de la terapia TARGA ha sido ampliamente aceptado desde 1996 teniendo los siguientes objetivos: (i) la obtención de sinergismos entre los diferentes compuestos que actúan en diferentes blancos; (ii) la disminución de la dosis de los fármacos empleados para reducir sus efectos tóxicos y (iii) disminuir el desarrollo de resistencias (De Clercq, 2009).

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

Recomendaciones	Pauta: Un fármaco de la columna A + uno de la columna B + uno de la columna C		
	A	B	C
<b>Pautas preferentes</b>	Tenofovir Abacavir	Emtricitabina Lamivudina	Efavirenz Nevirapina  Atazanavir Darunavir Fosamprenavir Lopinavir Saquinavir  Raltegravir
<b>Pautas alternativas</b>	Zidovudina Didanosina	Emtricitabina Lamivudina	Atazanavir Fosamprenavir  Maraviroc

Tabla I.2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH, según GESIDA en 2012. Las combinaciones de ITIAN de elección en los regímenes triples de inicio son TDF+FTC (o 3TC) y ABC+3TC (o FTC); en la columna C se incluyen fármacos de las tres familias, aunque se recomienda el uso preferente de ITINAN o IP.

A pesar de que algunos fármacos antirretrovirales son menos utilizados debido a su limitada eficacia, sus incómodas pautas de administración y/o a la aparición de efectos adversos, la gran variedad de compuestos disponibles genera numerosas opciones para elaborar la combinación más adecuada en función de los requerimientos de cada individuo. Existen diferentes estrategias de TARGA que son actualizadas frecuentemente y que pueden

variar en función del estado de la infección y las características de los pacientes. Según las pautas actuales (Tabla 1.2.), los tratamientos administrados al iniciar la terapia están compuestos por dos ITIAN más un ITINAN o un IP (Clumeck *et al.*, 2008; Gesida, 2012).

La TARGA no erradica el HIV, así que para controlar la infección el tratamiento debe continuar durante toda la vida del paciente. La exposición prolongada a estos fármacos ha generado la aparición a largo plazo de efectos adversos, que pueden afectar la salud de los pacientes y en muchas ocasiones requieren la interrupción de la pauta terapéutica establecida. Debido a las características especiales de esta enfermedad, el desarrollo de los fármacos antirretrovirales fue particularmente rápido y enfocado esencialmente en la eficacia clínica, que es la reducción de la mortalidad. Sin embargo, como la enfermedad ha sido controlada, en los últimos años ha ido en aumento el énfasis en los efectos adversos asociados a la terapia (Blas-Garcia *et al.*, 2010; Blas-Garcia *et al.*, 2011).

### 3. EFECTOS ADVERSOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Los efectos adversos asociados a la TARGA a corto plazo son muy generales como náuseas, fatiga, mareos o alteraciones del sueño. Muchos de estos efectos desaparecen en algunas semanas y la mayoría de los pacientes los superan. Si los síntomas persisten a largo plazo, pueden tener un gran impacto en la adherencia al tratamiento (Bailey and Fisher, 2008). Entre los efectos adversos más comunes producidos por el uso de TARGA a largo plazo, se incluyen: síndrome metabólico, lipodistrofia, hiperlipidemia, resistencia a insulina y toxicidades a nivel hepático, cardíacas, de riñón, médula ósea, retina, oído y piel (Hofman and Nelson, 2006). Aunque algunos de estos efectos se han descrito de manera general para la TARGA, también hay ciertas toxicidades específicas de la familia farmacológica y otras específicas de cada compuesto en particular (Apostolova *et al.*, 2011; Blas-Garcia *et al.*, 2011;

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

Caron-Debarle *et al.*, 2010; Núñez, 2010). En la Tabla I.3., se recogen los principales efectos adversos asociados a cada compuesto.

Existen diversos factores que influyen en la presencia/ausencia de toxicidad asociada a los fármacos antirretrovirales como la adherencia a la terapia, enfermedades concurrentes, las interacciones entre fármacos así como la variación entre individuos entre la que se incluye la edad, el sexo, el estatus nutricional y especialmente la variación genética, responsable de gran parte de la variabilidad en la respuesta a la terapia (Evans and McLeod, 2003; Rodriguez-Novoa *et al.*, 2005).

<b>Fármaco antirretroviral</b>	<b>Efecto adverso severo</b>	<b>Efecto adverso común (&gt;5%)</b>
<b>ITIAN</b>		
ABC	Infarto de miocardio, pancreatitis, dilipidemia, reacciones de hipersensibilidad	-
ddl	Acidosis láctica, resistencia a la insulina, esteatohepatitis, pancreatitis, neuropatía periférica	Nauseas
3TC	Neuropatía periférica, pancreatitis, dislipidemia	-
d4T	Acidosis láctica, pancreatitis, esteatohepatitis, debilidad neuromuscular	Neuropatía periférica, lipoatrofia
TDF	Disminución en la tasa de filtración glomerular	-
AZT	Acidosis láctica, lipoatrofia, anemia, neutropenia, miopatía, hepatotoxicidad	Dolor de cabeza, astenia, nauseas, pigmentación de las uñas
ddC	Neuropatía periférica, hepatotoxicidad, pancreatitis	-

ITINAN		
EFV	Reacciones cutáneas, hepatotoxicidad, síndrome de Stevens-Johnson, malformación del sistema nervioso central (SNC) del feto	Incremento de los niveles plasmáticos de transaminasas, síntomas del SNC (insomnio, vértigo, sueños vivos y dolor de cabeza)
ETR	Reacciones cutáneas	Nauseas
NVP	Reacciones cutáneas, síndrome de Stevens-Johnson, reacciones de hipersensibilidad, hepatotoxicidad	Incremento de los niveles plasmáticos de transaminasas
DLV	Reacciones cutáneas	-
RPV	Reacciones cutáneas	-
IP		
RTV	Riesgo cardiovascular, hepatotoxicidad, resistencia a la insulina, dislipidemia	-
ATV	Bloqueo atrioventricular de primer grado, nefrolitiasis	Hiperbilirrubinemia indirecta
DRV	Síndrome de Stevens-Johnson, eritema multiforme, hepatotoxicidad	Reacciones cutáneas, nauseas, diarrea
fAPV	Dislipidemia	Reacciones cutáneas, nauseas, diarrea
IDV	Nefrolitiasis, riesgo cardiovascular, hiperbilirrubinemia	Piel seca, uñas encarnadas, hipertrigliceridemia, astenia, nauseas, diarrea
SQV	Riesgo cardiovascular	Dolor de cabeza, diarrea
TPV	Hemorragias cerebrales, riesgo cardiovascular, hepatotoxicidad	Nauseas, diarrea
NFV	Riesgo cardiovascular, dislipidemia	-

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

LPV	Riesgo cardiovascular, resistencia a la insulina, dislipidemia	-
APV	Riesgo cardiovascular, dislipidemia	-
<b>II</b>		
RGV	-	Dolor de cabeza, diarrea, fiebre
<b>IF</b>		
ENF	Hipersensibilidad	Infección local en el sitio de reacción, incremento del riesgo de neumonía bacteriana
<b>Inhibidor CCR5</b>		
MRC	Posible linfoma, hepatotoxicidad	Vértigo, reacciones cutáneas, hipotensión ortostática, infecciones en el tracto respiratorio superior

Tabla I.3. Principales efectos adversos asociados al uso de los fármacos antirretrovirales.

### **3.1. Hepatotoxicidad asociada a la terapia antirretroviral**

La hepatotoxicidad es uno de los efectos adversos más relevantes asociados al uso de la TARGA, conduciendo con frecuencia a la discontinuación de la terapia (Soriano *et al.*, 2008). Según estudios clínicos, es la segunda causa de muerte en pacientes tratados con antirretrovirales (Price and Thio, 2010; Weber *et al.*, 2006). Entre las causas que provocan dicha mortalidad, se encuentran la presencia de otras infecciones como hepatitis B (VHB) y/o C (VHC) y el propio tratamiento antirretroviral, así como la hepatotoxicidad provocada por otros fármacos, el alcohol o la enfermedad de hígado graso no alcohólica (Joshi *et al.*, 2011). El espectro clínico de la hepatotoxicidad

producida por TARGA es muy variado y abarca elevaciones de las enzimas hepáticas asintomáticas y transitorias, hepatitis, esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis e hipertensión portal y en raras ocasiones, hepatitis aguda fulminante (Domingo and Lozano, 2011; Pineda *et al.*, 2010). La toxicidad hepática causada por la TARGA puede ser provocada a través de diferentes mecanismos como son las reacciones de hipersensibilidad, la inhibición mitocondrial directa, alteraciones del metabolismo lipídico y glucídico, daño directo sobre otros componentes celulares y reconstitución inmune en presencia de coinfección con el virus de la hepatitis (Núñez, 2010).

### **3.2. Toxicidad mitocondrial**

La mitocondria es uno de los principales blancos de la citotoxicidad inducida por fármacos, la cual ocurre a través de una amplia variedad de mecanismos tales como la inhibición o desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, estrés oxidativo y/o apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Labbe *et al.*, 2008). Muchos efectos adversos importantes asociados a la TARGA son consecuencia de la toxicidad mitocondrial, pero ellos han sido principalmente atribuidos a los ITIAN y han sido explicados por la “hipótesis de la ADN polimerasa mitocondrial (ADN pol- $\gamma$ )” (Apostolova *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 2002).

La “hipótesis de la ADN pol- $\gamma$ ” postula que los ITIAN además de inhibir la transcriptasa inversa viral, también inhiben la ADN pol- $\gamma$ . Debido a que los ITIAN son análogos de los nucleósidos naturales que carecen de un grupo 3'-OH, su inserción en el ADN proviral durante la replicación mediada por la transcriptasa inversa provoca la terminación de la cadena de ADN viral. Los ITIAN pueden actuar también como sustratos de la ADN pol- $\gamma$ , interfiriendo en la síntesis de ADN (Chiao *et al.*, 2009). Aunque la inhibición de la transcriptasa inversa viral es mucho más eficiente, la inhibición de la ADN pol- $\gamma$  causada por los ITIAN es suficientemente significativa como para causar

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

la depleción del mtADN (Lewis *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2006). Puesto que el mtADN codifica varios polipéptidos involucrados en la cadena de transporte de electrones (CTE) y en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) la disminución de los niveles de mtADN y de los polipéptidos codificados por él, lleva en ultimas a la disfunción mitocondrial (Chiao *et al.*, 2009; Kohler and Lewis, 2007).

Los efectos de los ITINAN sobre la mitocondria son mucho menos documentados y aunque no inhiben la ADN pol- $\gamma$ , algunos elementos de la toxicidad atribuida a estos fármacos presentan rasgos similares a los vistos en algunas enfermedades caracterizadas por disfunción mitocondrial (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2008; Sato, 2007).

Habitualmente, la toxicidad mitocondrial afecta tejidos que tienen una alta demanda energética, y se manifiesta mayormente como miopatía, neuropatía periférica, hepatotoxicidad, hiperlactatemia y acidosis láctica. Pero estas no son sus únicas manifestaciones, también se han descrito otras alteraciones relacionadas con la disfunción mitocondrial tales como disturbios en el metabolismo lipídico (un síndrome llamado a menudo “Lipodistrofia relacionada con VIH”) y nefropatía, aunque la descripción de los mecanismos implicados y el grado en que las mitocondrias están involucradas en estos efectos varían mucho (Feeney and Mallon, 2010; Feeney and Mallon, 2011; Hammer *et al.*, 2008; Maagaard and Kvale, 2009; Petit *et al.*, 2005)

## **4. EFAVIRENZ (EFV)**

Uno de los elementos fundamentales de la terapia TARGA es el EFV ((S)-6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona), miembro de familia de los ITINAN. Su larga vida media (44 - 55h) permite un efecto de larga duración en la reducción del ARN viral con una dosis diaria, lo que le da una ventaja en cuanto a la eficacia (Smith *et al.*, 2001; Staszewski *et al.*, 1999). El EFV es metabolizado principalmente en el



hígado por la familia de enzimas metabolizadoras de fármacos citocromo P450 (CYP), especialmente la isoforma CYP2B6 aunque también están involucrados los CYP3A4 y CYP2A6 (Ward *et al.*, 2003).

Numerosos estudios tanto *in vitro* como clínicos han revelado que polimorfismos genéticos del CYP2B6 influyen marcadamente en la farmacocinética del EFV, llevando a grandes diferencias en las concentraciones plasmáticas del fármaco dependientes de la genética del individuo (Bumpus *et al.*, 2006; Desta *et al.*, 2007; King and Aberg, 2008).

Aunque el EFV generalmente se considera como un fármaco seguro, existe una creciente preocupación por la aparición de trastornos metabólicos y lipídicos, síntomas psiquiátricos y hepatotoxicidad en terapias que lo contienen (Gutierrez *et al.*, 2005; Loko *et al.*, 2011; Maggiolo, 2009; Tashima *et al.*, 2003). Cerca del 10% de los pacientes tratados con EFV presentan un incremento de las enzimas hepáticas que puede llevar a que el tratamiento sea discontinuado (Kappelhoff *et al.*, 2005). Aparte de la toxicidad hepática aguda, trabajos recientes apuntan a un daño hepático acumulable en el tiempo (Jones and Núñez, 2012). Los mecanismos responsables de estas manifestaciones no han sido determinados, pero hay nuevas evidencias que indican que EFV reduce la proliferación celular, induce apoptosis y disminuye el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) en varios tipos celulares (Karamchand *et al.*, 2008; Landriscina *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2002). En hepatocitos humanos se ha encontrado que su aplicación aguda induce alteraciones en varios parámetros de la función mitocondrial como la reducción de la respiración mitocondrial, pérdida del  $\Delta\psi_m$  generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y alteraciones metabólicas que llevan a la acumulación de lípidos (Blas-Garcia *et al.*, 2010).

## 5. MITOCONDRIA

### 5.1. Estructura mitocondrial

Las mitocondrias son organelas presentes en casi todas las células eucariotas (excepto en eritrocitos maduros), suelen describirse como cilindros alargados con un diámetro de 0,5 a 1  $\mu\text{M}$  y en términos generales pueden ocupar hasta el 25% del volumen de la célula (Lodish *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista estructural, la mitocondria está formada por dos membranas, una externa (MME) que cubre la mitocondria y una interna (MMI) que se pliega sobre si misma formando invaginaciones que reciben el nombre de crestas; la estructura y disposición de ambas membranas determina la existencia de dos compartimentos submitocondriales, el primero es un espacio intermembrana formado entre la MME y la MMI y el segundo es una matriz mitocondrial envuelta por la MMI (Fig. 1.2.).

La mitocondria es una organela semiautónoma, ya que para su biogénesis además de su propio genoma requiere también del genoma nuclear, de hecho la mayoría de los constituyentes necesarios para los sistemas metabólicos y la estructura molecular provienen de genes nucleares. Las mitocondrias humanas poseen su propio genoma (mtADN) constituido de una molécula de ADN circular de doble cadena compuesta de 16569 pares de bases (pb), predominantemente exones, que codifica para 22 ARN de transferencia, 2 ARN ribosómicos y 13 proteínas. La replicación del mtADN se produce por un mecanismo no ligado al ciclo celular. Cada mitocondria contiene 2-10 copias de mtADN y cada célula varios cientos o miles de mitocondrias, siendo su número determinado según los requerimientos energéticos de cada tipo celular; así las células con una alta demanda de energía como las del hígado, cerebro, músculo cardíaco y músculo esquelético tienen un alto contenido de mitocondrias (Amacher, 2005).

## 5.2. Función mitocondrial

La mitocondria es la principal organela productora de energía generando ATP de manera muy eficiente en presencia de oxígeno, por medio de un proceso denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS). Como se puede ver en la Fig. 1.2., este proceso se lleva a cabo por un conjunto de cinco grandes complejos (I-V) que se encuentran integrados en la MMI, de los cuales los complejos I-IV forman lo que se denomina cadena transportadora de electrones (CTE) (Smith *et al.*, 2012a). La actividad de estos complejos está modulada en función de los requerimientos energéticos de las células, a corto y a largo plazo (Rich and Marechal, 2010). El complejo I (CI), también llamado NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa, es el mayor complejo enzimático de la CTE, conformado por 46 subunidades, de las cuales 7 son codificadas por el genoma mitocondrial y 39 por el ADN nuclear (nADN) (Carroll *et al.*, 2003). El complejo II (CII) o succinato deshidrogenasa, compuesto por 4 subunidades, es el único complejo de la CTE que es codificado completamente por el nADN (Sue and Schon, 2000). El complejo III (CIII) o coenzima Q reductasa está conformado por 11 subunidades de las cuales 1 (citocromo *b*) es codificada por el mtADN (Zeviani and Di, 2004). El complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa (COX) está compuesto por trece subunidades, las 3 subunidades más grandes (COX I, COX II y COX III) son codificadas por el mtADN mientras que las otras 10, lo son por el nADN (Sue and Schon, 2000). El complejo V (CV) o ATP sintasa está compuesto por 14 subunidades, 2 de las cuales (ATPasa 6 y ATPasa 8) son codificadas por el mtADN y 12 por el nADN (Zeviani and Di, 2004).

El CI es el principal punto de entrada de electrones a la CTE, usando moléculas de NADH, generadas por reacciones catabólicas dentro de la matriz mitocondrial como una fuente de electrones y los transfiere a la ubiquinona en la membrana. Este flujo de electrones, provoca el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

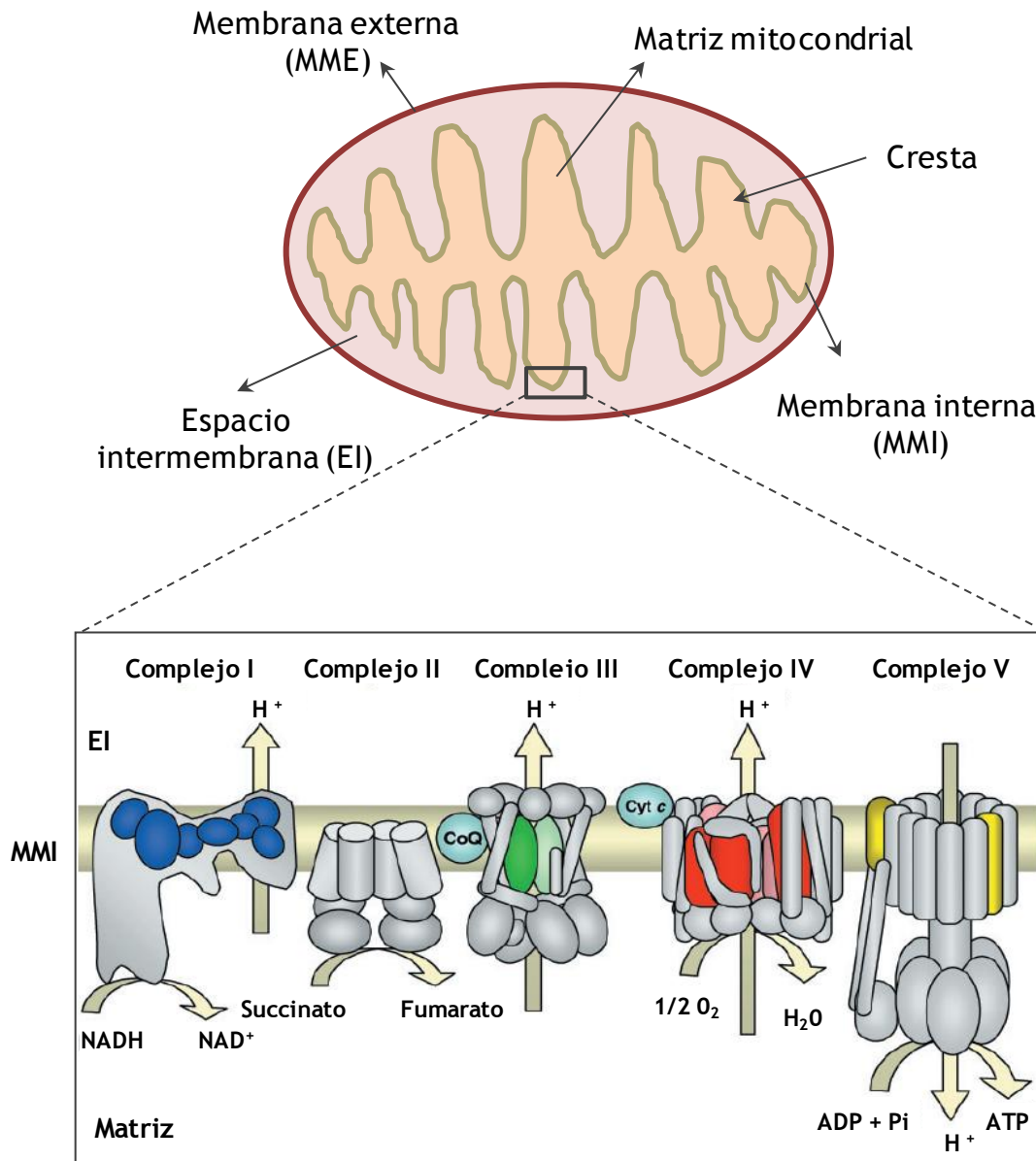


Fig. 1.2. Representación esquemática de la estructura de la mitocondria con sus principales componentes. En el recuadro se destaca la CTE donde se pueden ver los distintos complejos proteicos ubicados en la MMI y las reacciones asociadas a ella. Modificado de (Zeviani and Di, 2004).

El CII representa un punto de entrada alternativo de electrones a la CTE, el cual transfiere electrones del succinato a la ubiquinona conectando así directamente el ciclo de Krebs con la CTE. Esta transferencia de electrones no

está acoplada a traslocación de protones. El componente central del sistema OXPHOS, es el CIII, el cual transfiere electrones de la ubiquinona reducida al citocromo *c*, generando un nuevo flujo de protones hacia el espacio intermembrana. El CIV es el complejo terminal de la CTE, este cataliza la transferencia de electrones del

citocromo *c* al oxígeno molecular reduciendo este último a agua y también, traslocando protones hacia el espacio intermembrana. El gradiente de protones generado por el transporte de electrones de los complejos I, III y IV, es usado por la ATP sintasa para la formación de ATP a partir de ADP y Pi (Dudkina *et al.*, 2008; Poyton *et al.*, 2009).

Además de su función en la generación de energía, la mitocondria también participa en diversos procesos metabólicos, en la respuesta al estrés, en la muerte celular y es la principal fuente de EROS.

## 6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ERO son moléculas altamente reactivas que pueden ser radicales libres derivadas del  $O_2^-$  tales como anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) radical hidroxilo ( $HO\bullet$ ), radical peroxilo ( $ROO\bullet$ ) y radical alcoxilo ( $RO\bullet$ ) o especies no radicales derivadas del  $O_2^-$  como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Halliwell and Cross, 1994). En condiciones fisiológicas son necesarias bajas concentraciones de ERO para llevar a cabo algunas funciones fisiológicas como expresión de genes, crecimiento celular o defensa contra infecciones (Droge, 2002).

Las ERO pueden ser producidas como subproductos de la respiración celular, en diversos procesos metabólicos celulares, o en respuesta a diferentes estímulos como factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, radiación ionizante, rayos UV, oxidantes químicos, hiperoxia quimioterapéutica, toxinas y metales de transición (Cui *et al.*, 2012).

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Las ERO tienen un rol importante en la señalización celular, apoptosis, expresión génica y transporte de iones, sin embargo, cantidades excesivas, pueden tener efectos deletéreos en muchas moléculas incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Lü *et al.*, 2010). A nivel intracelular las ERO pueden ser producidas en la mitocondria, peroxisomas, por el citocromo P450, por la NADPH oxidasa o la 5-lipooxigenasa. La mitocondria es considerada la mayor fuente intracelular de ERO, dentro de ella, las ERO se originan principalmente como subproductos de la OXPHOS a nivel de los CI y CIII (Kang and Pervaiz, 2012). Se estima que el 1-5% de los electrones que pasan por la CTE pueden ser desviados para formar ERO (Novo and Parola, 2008). En el caso de la mitocondria, el principal radical producido es  $O_2\bullet^-$ , se genera en la MMI y es una especie altamente reactiva que no difunde fácilmente a través de la célula; la molécula más afectada por este radical es el mtADN. El segundo radical generado en la mitocondria es el  $H_2O_2$  que es el producto de la detoxificación del  $O_2\bullet^-$  por la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). El  $H_2O_2$  debido a su pequeño tamaño y su baja reactividad, comparado con otras ERO, puede difundir libremente a través de la célula y generar efectos tóxicos lejos de su sitio de producción (Kirkinezos and Moraes, 2001).

#### **6.1. Estrés oxidativo**

Bajo condiciones fisiológicas, se producen bajas cantidades de ERO como el resultado de un balance dinámico entre la tasa de su generación y su remoción. Este balance es controlado por antioxidantes enzimáticos como catalasas, tioredoxinas, superóxido dismutasas (SOD) y glutatión peroxidasas (GPX) y antioxidantes no enzimáticos como glutatión reducido (GSH), vitamina E,  $\beta$  carotenos, ácido ascórbico, ácido úrico, entre otros (Novo and Parola, 2008). Si se produce un desequilibrio entre la producción y remoción de ERO, se genera estrés oxidativo (Kirkinezos and Moraes, 2001). La respuesta celular antioxidante maximiza la capacidad de la mitocondria (y de otros

compartimentos celulares) para neutralizar las ERO, llevando así al restablecimiento de la homeostasis en respuesta a estrés oxidativo moderado. Sin embargo, si el estrés oxidativo persiste produciendo daño molecular de difícil recuperación como peroxidación lipídica, proteínas mal plegadas o mutaciones del mtADN, la mitocondria puede responder activando mecanismos de muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2012). La alteración de la integridad de la mitocondria se asocia con la disipación del  $\Delta\psi_m$ , llevando a la permeabilización de la MME y la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo c (cyt c), el segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI (Smac/Diablo) y el factor inductor de apoptosis (AIF), conduciendo la célula a la muerte por apoptosis (Novo and Parola, 2008).

La mitocondria representa no solo una fuente de ERO sino también un blanco para su acción. La producción de superóxido se incrementa en muchos escenarios patológicos y las mitocondrias son particularmente vulnerables al daño oxidativo. Esto se debe a que en su estructura poseen diversas moléculas, esenciales para su función, que son especialmente susceptibles de reaccionar con ERO derivadas del superóxido. Entre estas moléculas se encuentra el mtADN, los ácidos grasos insaturados y proteínas de la MMI y varios centros hierro-azufre. El daño oxidativo produce disfunción mitocondrial, situación que conlleva a la muerte celular, contribuyendo así a diversas patologías como sepsis, deterioro de órganos en trasplantes, isquemia/reperfusión, enfermedades neurodegenerativas, complicaciones diabéticas y también al proceso de envejecimiento (Murphy, 2009; Wallace *et al.*, 2010). Además el estrés oxidativo ha sido ampliamente asociado tanto a la infección por VIH, como a la toxicidad producida por el uso de la TARGA (Caron *et al.*, 2008; Kashou and Agarwal, 2011; Lewis *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2012b). En un estudio realizado en pacientes infectados con VIH y no infectados, se encontró que los pacientes infectados (tanto tratados como no tratados) presentan mayores niveles de estrés oxidativo que los pacientes no

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

infectados. Al comparar dentro del grupo de los pacientes infectados, los que estaban bajo tratamiento con TARGA y los que no tenían tratamiento, encontraron que los pacientes tratados mostraban niveles aún más altos de estrés oxidativo (Mandas *et al.*, 2009). En diversos estudios *in vitro*, se ha descrito también un incremento en los niveles de estrés oxidativo, causado por el tratamiento con diferentes fármacos antirretrovirales; por ejemplo, en células linfoides tratadas con AZT se produce una disminución de hasta el 60% de las concentraciones de GSH, también se presenta pérdida de la integridad del mtADN y disminución en la producción de energía (Yamaguchi *et al.*, 2002), RTV y LPV incrementan la producción de ERO en células endoteliales arteriales humanas (Lefevre *et al.*, 2010) y en cardiomiocitos (Deng *et al.*, 2010), y EFV induce un incremento de ERO en células hepáticas (Blas-Garcia *et al.*, 2010).

## **7. MUERTE CELULAR**

La muerte celular es un proceso fundamental para el desarrollo de los organismos, en la regulación de la homeostasis de sus tejidos a través de la eliminación de células redundantes o dañadas, así como en el proceso de modelar o eliminar estructuras (Degterev and Yuan, 2008). Aparte de su papel en procesos celulares fisiológicos, la muerte celular participa en una variedad de condiciones patológicas que incluyen desordenes neurodegenerativos, isquemia-reperfusión, enfermedades autoinmunes y cáncer (Logue *et al.*, 2005; Ortona *et al.*, 2008; Sun and Peng, 2009; Vila and Przedborski, 2003)

La muerte celular en organismos multicelulares puede ocurrir como consecuencia de un daño masivo (necrosis) o en una forma controlada, a través del compromiso de diversos programas bioquímicos (Muñoz-Pinedo, 2012). Tradicionalmente la muerte celular se ha clasificado en tres categorías de acuerdo con criterios morfológicos: apoptosis (Tipo I), autofagia (Tipo II) y necrosis (Tipo III), perteneciendo la apoptosis y la autofagia a la categoría de



muerte celular programada (MCP) y la necrosis a la muerte accidental (Galluzzi *et al.*, 2007; Muñoz-Pinedo, 2012).

### 7.1. Apoptosis

El termino apoptosis (del griego: caerse o desprenderse, refiriéndose a las hojas de los árboles) se usó por primera vez en 1972 para describir una forma de muerte celular con rasgos morfológicos específicos (Kerr *et al.*, 1972). Desde entonces, la apoptosis ha sido ampliamente estudiada y se ha convertido en la forma de muerte celular mejor caracterizada. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo de homeostasis para mantener la población de células en los tejidos (Elmore, 2007) también como un mecanismo de defensa como en reacciones inmunes o cuando las células están dañadas ya sea en enfermedades o por agentes nocivos (Norbury and Hickson, 2001). Normalmente se requieren varias horas desde el inicio del proceso de apoptosis hasta la fragmentación celular final, la duración del proceso depende del tipo celular, del estímulo y de la vía apoptótica de señalización (Ziegler and Groscurth, 2004).

Las células apoptóticas presentan una serie de alteraciones morfológicas que sirven como marcadores de este proceso. A nivel nuclear se presenta una condensación de la cromatina que muchas veces termina en la fragmentación nuclear, siendo este el rasgo morfológico más característico de la apoptosis (Elmore, 2007). La apoptosis también está asociada con el encogimiento de las células, así las células tienen un menor tamaño, el citoplasma se vuelve denso y las organelas quedan empaquetadas en un espacio reducido (Duprez *et al.*, 2009). En la membrana plasmática se presenta una exposición en el exterior de moléculas de fosfatidilserinas (Zamzami *et al.*, 1996) y se forman finalmente unas protuberancias que dan origen a los denominados “cuerpos apoptóticos”. Estas formaciones, compuestas por fragmentos de la célula

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

rodeados de membrana plasmática, son finalmente fagocitadas (Elmore, 2007).

Dos familias de proteínas conservadas evolutivamente están involucradas en la apoptosis, llamadas familia Bcl-2, las cuales controlan la integridad de la mitocondria (Youle and Strasser, 2008) y las cisteinil aspartato proteasas o caspasas, las cuales median la ejecución de la apoptosis (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Las caspasas degradan proteolíticamente muchas proteínas vitales para la célula, rompiendo la envoltura nuclear y el citoesqueleto y posteriormente llevan al ADN a la degradación (Lavrik *et al.*, 2005; Wong, 2011). Es importante destacar que no todas las caspasas de mamíferos participan en la apoptosis; algunas son activadas durante la inmunidad innata y su función es la regulación del procesamiento y maduración de las citocinas (Martinon and Tschopp, 2004). En mamíferos se conocen al menos 14 caspasas (casp-1 a casp-14) divididas en tres grupos funcionales, las caspasas iniciadoras de apoptosis (casp-2, -8, -9 y -10), las caspasas efectoras o ejecutoras (casp-3, -6 y -7) y las caspasas inflamatorias (casp-1, -4, -5, -11, -12 y -13). Generalmente estas enzimas se encuentran en la célula en una forma inactiva llamada procaspasa que debe ser activada generalmente por otras caspasas para llevar a cabo su función proteolítica. Esta cascada proteolítica en la que una caspasa activa otra, amplifica la señal apoptótica y lleva rápidamente a la muerte celular (Duprez *et al.*, 2009; Rastogi *et al.*, 2009).

#### **7.1.1. Clasificación de la apoptosis**

Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados, involucrando una cascada de eventos moleculares dependientes de energía (Elmore, 2007). El proceso de la apoptosis clásica consiste en dos fases, iniciación y ejecución. Dependiente del origen de la señal de muerte (fase de iniciación), la apoptosis se puede inducir por dos vías: la vía intrínseca, que es

activada por estímulos del interior de la célula y la vía extrínseca o vía de receptores de muerte, que responde principalmente a estímulos extracelulares (Russo *et al.*, 2006). Ambas vías finalmente se reúnen en una fase de ejecución común (Fig. 1.3.) (Wong, 2011).

#### **7.1.1.1 Vía intrínseca**

La vía intrínseca, también llamada vía mitocondrial, puede ser activada por algunos estímulos internos como daño genético irreparable, hipoxia, altas concentraciones de calcio citosólico por señales provenientes del retículo endoplasmático (RE), estrés de RE y estrés oxidativo entre otros (Wong, 2011). Independientemente del estímulo, esta vía es el resultado del incremento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas desde la mitocondria al citosol (Danial and Korsmeyer, 2004).

La vía intrínseca es regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 que está compuesta por dos grupos de proteínas: proapoptóticas (como Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim and Hrk) y antiapoptóticas (como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 and Mcl-1). Ambos grupos regulan la liberación de las moléculas proapoptóticas desde la mitocondria, promoviéndola o inhibiéndola respectivamente (Wong, 2011). Esta vía se inicia cuando los estímulos proapoptóticos internos activan los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, resultando en un desequilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. Como consecuencia, se pierde la integridad de la MMI debido a la oligomerización de las proteínas Bcl-2 proapoptóticas en ella o la formación de un complejo megaporo compuesto del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) y el transportador de nucleótidos de adenina (ANT). Esto resulta en la permeabilización de la MME por la formación del poro de transición mitocondrial (PT), la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la liberación al citosol de proteínas proapoptóticas como cyt c, AIF, Smac/DIABLO, la serina peptidasa mitocondrial HtrA2/OMI y la endonucleasa G (EndoG) (Kroemer *et al.*, 2007; Saelens *et al.*, 2004).

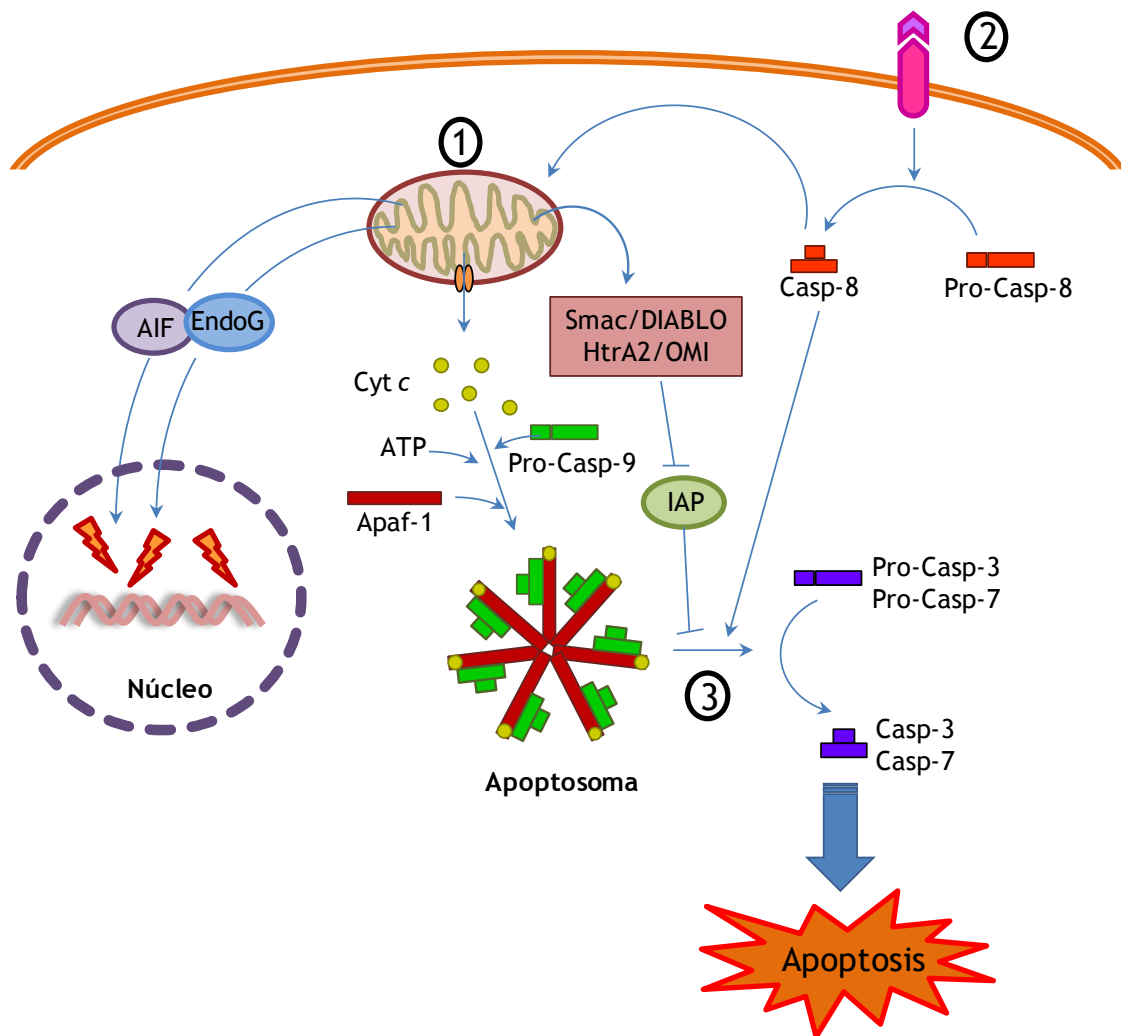


Fig. 1.3. Representación esquemática de la señalización de la muerte celular por apoptosis. (1) vía intrínseca mediada por la formación del apoptosoma, y la activación de la casp-9; (2) vía extrínseca asociada a receptores de muerte, que conlleva a la activación de la casp-8; (3) convergencia de ambas vías con la activación de las caspasas efectoras 3 y 7.

Una vez liberado al citosol, el cyt c se une al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) y a ellos se les unen varias moléculas de ATP; este complejo formado por cyt c, Apaf-1 y ATP oligomeriza e inicia el reclutamiento de múltiples moléculas de procaspasa-9 facilitando su autoactivación y formando un complejo llamado apoptosoma. Este complejo

es el responsable de la activación de las casp-3 y -7 (Kroemer *et al.*, 2007; Mohamad *et al.*, 2005).

El AIF liberado de la mitocondria al citosol, se trasloca al núcleo donde media la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN a gran escala a través de un proceso que podría involucrar la unión directa del AIF al ADN (Daugas *et al.*, 2000; Kroemer *et al.*, 2007). La EndoG también se trasloca al núcleo donde corta la cromatina nuclear produciendo fragmentos de ADN oligonucleosomales. AIF y EndoG funcionan de una manera independiente de caspasas (Elmore, 2007).

La liberación de Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 constituye un medio para amplificar la activación de la cascada de caspasas, ya que una vez en el citosol antagonizan con los inhibidores endógenos de caspasas (IAP) y los neutralizan (Kroemer *et al.*, 2007; Saelens *et al.*, 2004).

### 7.1.1.2 Vía extrínseca

La vía de señalización extrínseca que inicia la apoptosis, involucra interacciones entre receptores de muerte transmembrana con sus ligandos. Dichos receptores forman parte de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) como TNF-TNFR1, FasL-Fas y TRAIL-DR4 o -DR5 (Jin and El-Deiry, 2005) y juegan un papel crítico en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular hasta las vías de señalización intracelular (Elmore, 2007).

La activación de los receptores de muerte por la unión con sus ligandos, es seguida por la formación del llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que está compuesto por proteínas adaptadoras como la molécula FADD (dominio de muerte asociado a Fas) y algunas moléculas de casp-8. Con la formación del DISC, la casp-8 es activada y a su vez activa otras caspasas, ya sea directamente (las casp-3 y casp-7) ó indirectamente a través

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

de la interacción con proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, lo que lleva a la activación de la vía intrínseca y el despliegue de la cascada de caspasas (Rastogi *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2008).

#### **7.1.1.3 Convergencia de las vías intrínseca y extrínseca y fase de ejecución**

Las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, después de la fase de iniciación previamente descrita, convergen en la fase de ejecución. En esta fase se activan las caspasas de ejecución que inician la fase final de la apoptosis (Elmore, 2007). Las casp-3, -6 y -7 funcionan como caspasas efectoras o ejecutoras, cortando varios sustratos incluyendo citoqueratinas, la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), la proteína del citoesqueleto alfa fodrina, la proteína nuclear NuMa u otras, que finalmente causan los cambios bioquímicos y morfológicos propios de células apoptóticas (Slee *et al.*, 2001).

La casp-3 se considera la más importante de las caspasas ejecutoras y es activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (casp-8, -9, -10). Esta caspasa activa específicamente la endonucleasa CAD (DNasa activada por caspasas). En células proliferativas, CAD forma un complejo con su inhibidor ICAD pero en células apoptóticas, la casp-3 activada corta el ICAD para liberar CAD que degrada el ADN cromosomal dentro del núcleo y causa condensación de la cromatina (Elmore, 2007; Sakahira *et al.*, 1998).

La casp-3 también induce reorganización del citoesqueleto y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. Otro de los sustratos clave de la casp-3 es la gelsolina, una proteína de unión a actina que actúa típicamente como un núcleo para la polimerización de la actina y también une fosfatidilinositol bifosfato, ligando la organización de la actina con la transducción de señales. La casp-3 corta la gelsolina y los fragmentos generados a su vez cortan filamentos de actina. Esto resulta en la disrupción del citoesqueleto, el transporte celular, la división celular y la transducción de señales (Kothakota *et al.*, 1997; Spinardi and Witke, 2007).

La fagocitación de las células apoptóticas es el último componente de la apoptosis. La externalización de las fosfatidilserinas en la superficie de células apoptóticas y sus fragmentos es el rasgo más característico de esta fase pero no se conoce muy bien el mecanismo implicado en su traslocación. La aparición de fosfatidilserinas facilita el reconocimiento fagocítico no inflamatorio, permitiendo su pronta fagocitación y eliminación (Fadok *et al.*, 2001). Este proceso de fagocitación rápida y eficiente, sin liberación del contenido celular, resulta en una respuesta esencialmente no inflamatoria (Elmore, 2007).

La inducción de apoptosis ha sido ampliamente ligada a la hepatotoxicidad producida por xenobióticos (Labbe *et al.*, 2008; Malhi and Gores, 2008) entre los que se incluyen algunos componentes de la TARGA. En diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha mostrado que las principales familias de fármacos antirretrovirales (IP, ITIAN y ITINAN) incrementan los niveles de apoptosis en los tejidos y este incremento se ha asociado con un amplio rango de toxicidades inducidas por la utilización de la TARGA, entre ellas la hepatotoxicidad (Hooker and Cherry, 2009; Labbe *et al.*, 2008). Se ha descrito por ejemplo, que RTV y ATV inducen apoptosis en adipocitos humanos (Gibellini *et al.*, 2012) y en un estudio con células Jurkat T, se encontró que EFV también induce apoptosis (Pilon *et al.*, 2002). Además se ha descrito un incremento de la apoptosis en el hígado en presencia de coinfecciones con el VHC (Iser *et al.*, 2011). Incluso algunos autores han propuesto usar la cuantificación de la apoptosis como un método para monitorear pacientes bajo tratamiento con TARGA, en busca de evidencia temprana de toxicidad (Hooker *et al.*, 2009).

## 7.2. Autofagia

Autofagia (proveniente del griego, significa comerse a sí mismo) es un término general usado para identificar varios procesos intracelulares que convergen en una vía de degradación común mediada por lisosomas. A pesar de su resultado común, cada proceso exhibe rasgos específicos y es mediado por distintos mecanismos (Galluzzi *et al.*, 2008). En mamíferos se han descrito tres tipos de autofagia (Fig. 1.4.): i) autofagia mediada por chaperonas, en la cual proteínas que expresan la señal tipo KFERQ, son llevadas directamente al lisosoma mediante el complejo Hsc70, donde son degradadas mediante la interacción con la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP-2A), ii) microautofagia, en la cual la membrana lisosomal invagina porciones del citoplasma, que posteriormente son degradadas, iii) macroautofagia, denominada también simplemente autofagia (así se llamará en adelante en este trabajo), proceso que difiere de los otros tipos debido a que utiliza vacuolas especializadas para el transporte de los elementos que van a ser degradados hasta el lisosoma. De los tres tipos de autofagia, solo la macroautofagia ha sido asociada con muerte celular y es el proceso que será descrito en este trabajo (Debnath *et al.*, 2005; Wirawan *et al.*, 2012).

La autofagia es un mecanismo intracelular de degradación catabólica que en condiciones normales tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular ya que media la degradación de algunos componentes citoplásmicos como proteínas agregadas o mal plegadas y organelas dañadas. Bajo condiciones de falta de nutrientes, la autofagia promueve la supervivencia celular degradando contenidos intracelulares disponibles generando así energía y materia prima para la síntesis de nuevas proteínas (Degterev and Yuan, 2008). Las proteínas y organelas que van a ser degradadas son encapsuladas en vesículas cerradas de doble membrana denominadas autofagosomas cuyo contenido es degradado por enzimas



lisosomales al fusionarse con lisosomas (formando los autofagolisosomas) (Degterev and Yuan, 2008).

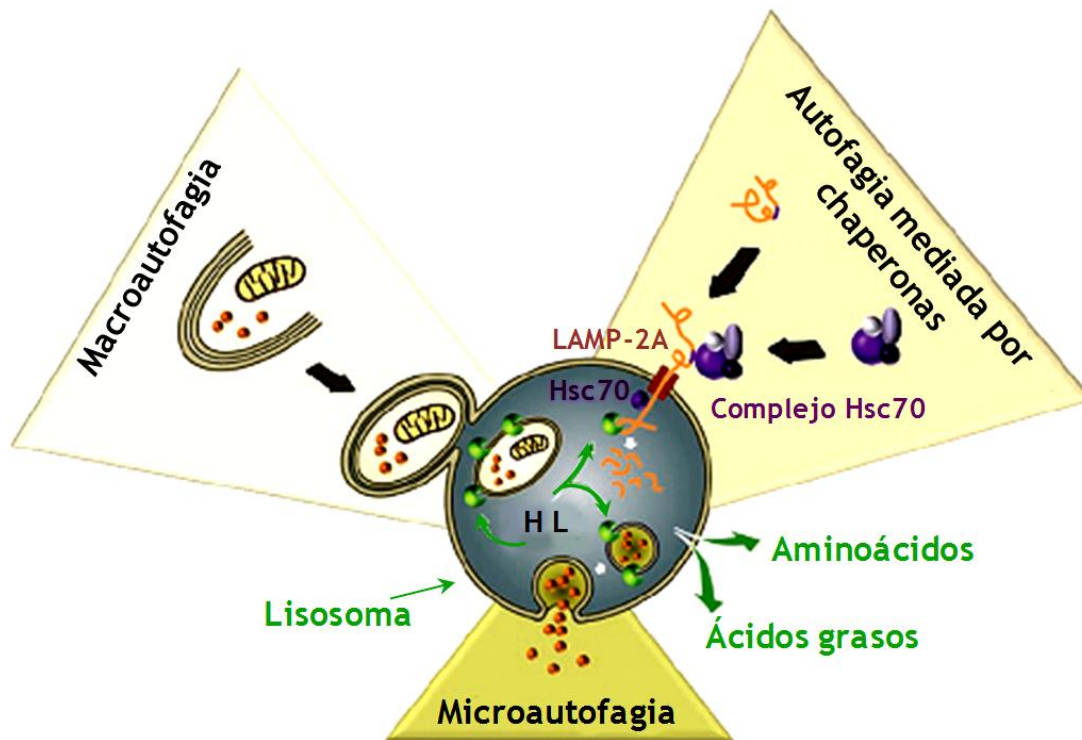


Fig. 1.4. Representación de los tres tipos de autofagia: Macroautofagia, se caracteriza por la formación de vacuolas de doble membrana que atrapan y conducen al lisosoma los elementos que serán degradados; microautofagia, donde el lisosoma invagina directamente porciones del citoplasma y autofagia mediada por chaperonas, en la cual las proteínas son llevadas directamente al lisosoma mediante el complejo Hsc70, este interactúa con la proteína LAMP-2A y las proteínas son degradadas en el lisosoma por hidrolasas lisosomales (HL). Modificado de (Wirawan *et al.*, 2012).

La autofagia está implicada en importantes funciones biológicas como la supervivencia celular, la muerte celular, el metabolismo, el desarrollo, el envejecimiento, infecciones e inmunidad. Alteraciones en su funcionamiento se han asociado con la etiología de muchas enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y musculares, desordenes

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

metabólicos, hepáticos y cardiovasculares, infecciones por microorganismos, diabetes y obesidad, ya que la eliminación de componentes celulares innecesarios o dañados y extraños como microorganismos, es crucial para la supervivencia y función celular. Recientemente, la implicación de la autofagia en el proceso de muerte celular y supervivencia, ha tomado gran importancia (Meijer and Codogno, 2009; Mizushima *et al.*, 2008; Shen and Codogno, 2011).

La autofagia es un mecanismo cito-protector que permite a la célula sobrevivir bajo condiciones desfavorables ya que ejerce un papel crucial en la reducción del estrés bioenergético en la célula, producción de ERO, inestabilidad genómica, acumulación y mal plegamiento de proteínas, daño de organelas o infección por microorganismos (Fig. 1.5.). Sin embargo, también se ha demostrado una estrecha conexión de la autofagia con varias vías de muerte celular y se ha revelado una contribución activa de la autofagia a la muerte celular. Cuando la autofagia tiene un rol funcional en el proceso de muerte celular, este proceso se denomina “muerte celular autofágica”. La interacción entre autofagia y muerte celular es compleja y diversa, y dependiendo del tipo celular y los estímulos ambientales, la muerte celular y la autofagia pueden tener mecanismos inhibitorios o aditivos (Wirawan *et al.*, 2012).

Aunque la mayor parte del citosol puede ser “secuestrado” aleatoriamente a través de la autofagia, en muchos casos la autofagia presenta especificidad de sustratos (He and Klionsky, 2009). Por ejemplo, los agregados de proteínas ubiquitinadas y organelas innecesarias o dañadas son elegidas selectivamente para la degradación por autofagia (He and Klionsky, 2009). Se han empleado diferentes términos para describir la selectividad de cada proceso de acuerdo con el elemento que va a ser sometido a autofagia, tal como la degradación autofágica de la mitocondria (mitofagia) (Kim *et al.*, 2007), ribosomas (ribofagia) (Kraft *et al.*, 2008), peroxisomas (pexofagia) (Dunn *et al.*, 2005) y retículo endoplasmático (REfagia o reticulofagia) (Bernales *et al.*, 2006; Klionsky *et al.*, 2007). Además se han identificado algunas proteínas que son

requeridas para la remoción selectiva de sustratos específicos, incluyendo los receptores de autofagia p62, Nbr1, Nix, NDP52, Smurf1/optineurina y c-Cbl (Deegan *et al.*, 2012).

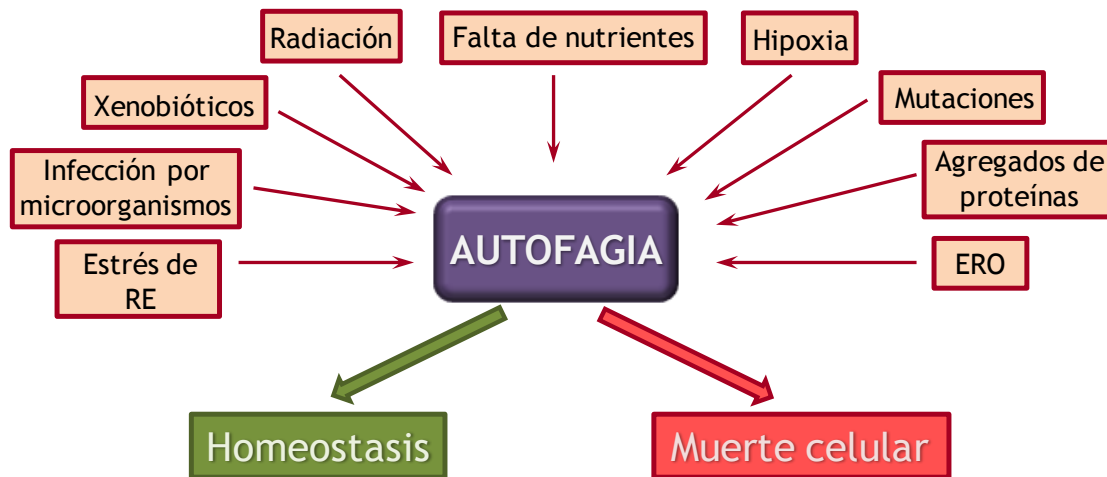


Fig. 1.5. Factores desencadenantes del proceso de autofagia y sus consecuencias. El objetivo de la autofagia es restablecer la homeostasis celular, pero si el estímulo es muy intenso o hay un bloqueo del flujo autofágico, también puede conducir a la muerte celular.

### 7.2.1 Autofagia y enfermedad hepática

La autofagia es un proceso fundamental en el hígado, donde cumple tres funciones principales: i) el mantenimiento del balance energético y de nutrientes para las funciones básicas celulares, ii) la remoción de proteínas mal plegadas resultantes de mutaciones genéticas o estímulos patofisiológicos y iii) la degradación de organelas tales como mitocondrias, RE y peroxisomas, tanto en condiciones normales como en patofisiológicas. Alteraciones en la función de la autofagia, puede tener un gran impacto en la fisiología del hígado y en la enfermedad hepática (Yin *et al.*, 2008).

### **Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

La autofagia ha sido asociada con un amplio rango de enfermedades humanas y entre ellas con diferentes tipos de patologías hepáticas tales como daño hepático por isquemia/reperfusión, infección por el virus de la hepatitis B o C, carcinoma hepatocelular, daño hepático agudo, deficiencia en la antitripsina alfa 1, enfermedad hepática por alcohol, enfermedad hepática no alcohólica y en menor medida en hepatotoxicidad inducida por xenobióticos (Rautou *et al.*, 2010).

En la mayoría de enfermedades hepáticas, la autofagia tiene un papel protector. Recientes estudios sugieren que la autofagia promueve la supervivencia celular en varias condiciones de daño hepático, incluyendo la toxicidad por xenobióticos (Rautou *et al.*, 2010), la hepatotoxicidad y esteatosis asociadas con la exposición aguda a etanol (Ding *et al.*, 2010) y confiere resistencia al daño producido por el estrés oxidativo generado por el uso de manadiona (Wang *et al.*, 2010); mientras que su inhibición se asocia con el desarrollo de patologías, como es el caso del uso de AZT y d4T que inhiben la autofagia en hepatocitos y esta inhibición se asocia con el incremento de lípidos intracelulares, la disminución de la proliferación y el incremento en la apoptosis (Stankov *et al.*, 2012).

#### **7.2.2. Proceso de autofagia**

La autofagia ocurre prácticamente en todas las células para llevar a cabo funciones homeostáticas tales como regulación de proteínas y organelas. Se induce de forma rápida cuando las células sufren demanda energética por ejemplo, durante diversas condiciones de falta de nutrientes; en el proceso de remodelaciones estructurales, por ejemplo durante las transiciones de desarrollo o para deshacerse de componentes citoplasmáticos dañados durante estrés oxidativo, infecciones, estrés de RE, hipoxia y daño mitocondrial, entre otros. El estatus nutricional, los factores hormonales y otros factores como temperatura, concentraciones de oxígeno y densidad

celular son importantes en el control de la autofagia (Kroemer *et al.*, 2010; Levine and Kroemer, 2008).

La maquinaria de la autofagia contiene más de 30 genes ATG (genes relacionados con autofagia), la mayoría de los cuales son altamente conservados de levaduras a mamíferos (Tang *et al.*, 2012). El proceso de autofagia se puede dividir en varios pasos, incluyendo inducción, nucleación, expansión y terminación del autofagosoma, fusión con el lisosoma, degradación y reciclaje (Fig. 1.6.) (Yang and Klionsky, 2010). La fuente de la membrana del autofagosoma es aún materia de debate, se han sugerido diversas fuentes de fosfolípidos desde la producción *de novo* hasta la utilización de membranas preexistentes tales como el RE, la membrana mitocondrial, la membrana plasmática, el núcleo, los endosomas y el complejo de Golgi (Mijaljica *et al.*, 2012).

- **Inducción**

Los niveles basales de autofagia en condiciones normales son muy bajos; por lo tanto es crucial para el organismo tener un mecanismo de inducción de autofagia para adaptarse al estrés y a la presencia de señales extracelulares (He and Klionsky, 2009). La vía clásica de señalización de la autofagia actúa a través de la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR). En condiciones normales, mTOR inhibe la autofagia por su asociación con el complejo ULK1/2 (compuesto por ULK1/2, Atg13 y FIP200), pero bajo condiciones de falta de nutrientes, esta actividad se inhibe por la acción de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), el mayor sensor bioenergético en la célula. La inhibición de mTOR lleva a su disociación del complejo ULK1/2 y a la desfosforilación parcial de Atg13 y ULK1/2; esto activa a ULK1/2 para fosforilar a FIP200 lo que induce la formación del autofagosoma (Ravikumar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

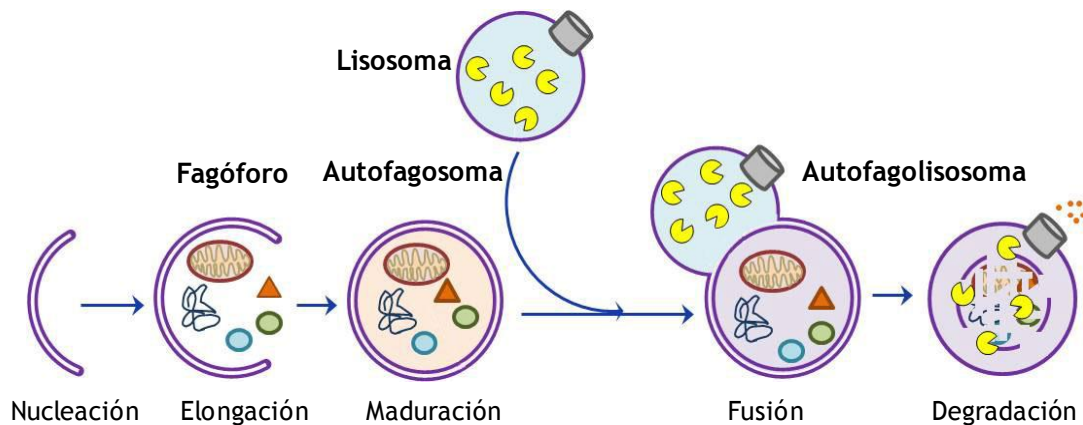


Fig. 1.6. Representación del proceso de autofagia. Se puede ver el proceso de formación del autofagosoma, que una vez maduro, se fusiona con el lisosoma dando lugar al autofagolisosoma y terminando en la degradación de componentes celulares. En la parte inferior se nombran las diferentes etapas del proceso: nucleación, elongación, maduración y degradación y en la parte superior de la figura se nombran las estructuras, correspondientes a esas etapas.

- **Nucleación**

El primer paso para la formación del autofagosoma es la nucleación y la formación del fagóforo, también llamado estructura preautofagosomal. La nucleación se inicia con el ensamblaje del complejo Beclina-1:PI3KC3 (fosfatidilinositol 3-quinasa clase III, también llamado hVps34) que contiene PI3KC3, Beclina-1 y hVps15. Este complejo es regulado positivamente por las proteínas BRAMA, Atg14L, UVRAG y Bif1, y negativamente por proteínas antiapoptóticas miembros de la familia Bcl-2 del RE. El complejo Beclina-1:PI3KC3 es reclutado por el complejo ULK1/2 al sitio de generación del autofagosoma y allí se activa para generar fosfatidilinositol trifosfato (PI3P), esencial para la formación del autofagosoma (Duprez *et al.*, 2009; Mehrpour *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

- **Expansión y terminación del autofagosoma**

Después de la formación de la membrana del fagóforo, se inicia su elongación. Para ello se requieren dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina: Atg12 y LC3. En el primer paso Atg12 es conjugada con Atg5 en una reacción que requiere Atg7 y Atg10. El conjugado Atg5:Atg12 es estabilizado por Atg16. El complejo resultante es importante en la estimulación y localización de la segunda reacción de conjugación. Durante la segunda reacción de conjugación, LC3 es cortada por Atg4 en su C terminal para formar LC3-I citosólico, el cual es conjugado covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-PE o más conocido como LC3-II en un proceso que requiere de la participación de Atg7 y Atg3. A diferencia del LC3, el LC3-II se une específicamente a las membranas autofágicas, hecho por el cual el LC3-II es generalmente usado como un marcador de la formación de autofagosomas (Duprez *et al.*, 2009; Mehrpour *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

- **Fusión con el lisosoma, degradación y reciclaje**

Una vez se ha expandido y cerrado la membrana del autofagosoma, este inicia su maduración por la fusión secuencial con endosomas y lisosomas para formar el autofagolisosoma. La fusión lleva a la degradación su membrana interna y su contenido por la acción de las hidrolasas contenidas en el lisosoma. Los aminoácidos y fosfolípidos producto de la degradación son liberados al citosol a través de permeasas localizadas en la membrana del autofagolisosoma para ser reciclados (Duprez *et al.*, 2009; Mehrpour *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012).

### 7.3. Necrosis

El término necrosis fue primero usado por morfólogos para referirse a una serie de cambios que acompañan la muerte celular accidental (Kumar V. *et al.*, 2012). La necrosis ha sido considerada tradicionalmente como una forma de muerte celular no regulada e independiente de energía y ha sido bien caracterizada en un amplio rango de estados patológicos. Fallos extensivos de las condiciones fisiológicas normales que son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular, tales como la regulación del transporte de iones, la producción de energía y el balance del pH, así como la exposición a ciertas condiciones como fuerza mecánica, calor o frío pueden conducir la célula a la necrosis (Jin and El-Deiry, 2005; Zong and Thompson, 2006).

La muerte celular por necrosis se caracteriza por un incremento en el volumen de la célula, hinchazón de organelas y ruptura de la membrana plasmática, lo cual resulta en una pérdida del contenido intracelular (Zong and Thompson, 2006). La necrosis es considerada perjudicial ya que a menudo es asociada con una pérdida patológica de células y debido a la habilidad de las células necróticas para promover la inflamación local, puede contribuir a la tumorigénesis (Vakkila and Lotze, 2004).

Aunque la necrosis ha sido tradicionalmente considerada como una muerte celular accidental que no está sujeta a regulaciones celulares, recientemente se ha establecido que al menos una parte de la muerte celular por necrosis puede ser ejecutada a través de un mecanismo regulado que contribuye al desarrollo y al mantenimiento de la homeostasis del organismo (Yuan and Kroemer, 2010; Zong and Thompson, 2006).

Términos tales como autolisis, oncosis (Majno and Joris, 1995), necrapoptosis (Lemasters, 1999), piroptosis (Cookson and Brennan, 2001) y necroptosis (Degterev *et al.*, 2005) se han usado para describir tipos de muerte celular no



apoptótica que presentan aspectos de muerte celular programada (Zong and Thompson, 2006).

Recientes avances han empezado a elucidar los mecanismos moleculares que inician y ejecutan este programa de muerte celular necrótico. La muerte celular por necrosis puede ser inducida por ejemplo por la activación de receptores de muerte tales como el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), el ligando FAS (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) (Vanlangenakker *et al.*, 2008; Yuan and Kroemer, 2010). En algunos tipos celulares, se ha descrito que TNFR1 y los receptores tipo Toll (TLR) también pueden iniciar el proceso de necrosis, en particular en presencia de inhibidores de caspasas (Vanlangenakker *et al.*, 2008).

## 8. ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

### 8.1. Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es una organela celular compuesta por una membrana simple de fosfolípidos que forma un continuo con la envoltura nuclear externa. Contiene láminas aplanadas con ribosomas (RE rugoso) y una compleja red de túbulos lisos (RE liso) que se extiende a través de la célula (Deegan *et al.*, 2012).

El RE es el principal sitio de síntesis, plegamiento y modificación de proteínas de la célula; cerca de un tercio de las nuevas proteínas sintetizadas pasan por el RE donde son modificadas y plegadas en su correcta estructura tridimensional para ser enviadas a otras organelas o a la superficie celular. (Zhang and Kaufman, 2008). El RE es también el principal centro de almacenamiento, señalización y regulación de calcio dentro de la célula. Además de las anteriormente mencionadas, el RE realiza otras funciones

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

como la detoxificación de xenobióticos, la biosíntesis de esteroides, colesterol y otros lípidos (Deegan *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2004).

El lumen del RE constituye un ambiente celular único, posee las concentraciones de calcio más altas de la célula debido al transporte activo de las  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas. Además debido a su papel en el plegamiento y transporte de proteínas en la vía secretora, es rico en chaperonas moleculares dependientes del calcio tales como la proteína regulada por glucosa de 78kDa (llamada GRP78, BiP o HSPA5), GRP94 (también conocida como HSP90B1) y calreticulina, la cual ayuda a estabilizar proteínas que no están completamente plegadas. Por otro lado, el lumen del RE también tiene un ambiente altamente oxidante, crucial para la formación de enlaces disulfuro mediados por la proteína isomerasa disulfuro (PDI) y para el correcto plegamiento y modificación de muchas proteínas destinadas a la secreción o al anclaje en la superficie celular (Kim *et al.*, 2008).

Gran variedad de alteraciones tales como hipoxia, carencia de nutrientes, desequilibrio redox, cambios en la homeostasis del calcio, incremento en la traducción de proteínas, infecciones por virus, sustancias químicas y mutaciones pueden generar un desequilibrio entre la capacidad de plegamiento del RE y la cantidad de proteínas a ser plegadas, resultando en la acumulación de proteínas sin plegar o mal plegadas y generando así estrés de RE. La pérdida de la homeostasis del RE activa la respuesta al estrés de RE, también conocido como respuesta a proteínas sin plegar (UPR por su nombre en inglés *unfolded protein response*) (Cnop *et al.*, 2012; Hussain and Ramaiah, 2007; Xu *et al.*, 2005).

## **8.2. Respuesta a proteínas no plegadas (UPR)**

El objetivo de la UPR es restaurar la homeostasis del RE por varias vías, incluyendo i) la disminución en la carga de proteínas en el lumen del RE bloqueando la síntesis de proteínas, ii) el incremento en la cantidad de

chaperonas del RE para aumentar la capacidad de plegamiento/reparación de proteínas, iii) la degradación de proteínas mal plegadas ya sea por medio del sistema de degradación asociada con RE (ERAD por su nombre en inglés *ER Associated Degradation*) o por autofagia y iv) cuando todos estos procesos no son suficientes para resolver el estrés de RE, iniciar el programa de muerte celular por apoptosis (Flamment *et al.*, 2010).

En mamíferos, la activación de la UPR es mediada por tres vías de señalización iniciadas por la activación de tres proteínas de membrana del RE (Fig. 1.8.): la quinasa del RE similar a la proteína quinasa de ARN (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la enzima que requiere inositol 1 (IRE1). Estas proteínas tienen un dominio en el lumen del RE que funciona como sensor del estrés y un dominio citosólico que activa las señales efectoras (Rasheva and Domingos, 2009). Bajo condiciones normales son mantenidas en un estado inactivo por la unión a GRP78, que es la principal chaperona de RE. En presencia de proteínas no plegadas en el lumen del RE, GRP78 se disocia de las proteínas transmembrana para interactuar preferiblemente con las proteínas no plegadas, liberando y activando así a PERK, ATF6 e IRE1 e iniciando la UPR (Colgan *et al.*, 2011; Flamment *et al.*, 2010; Kapoor and Sanyal, 2009).

- **PERK**

En mamíferos, la primera respuesta al estrés de RE es la atenuación transitoria de la traducción de nuevas proteínas, efecto mediado por la vía de señalización de PERK (Lai *et al.*, 2007). En condiciones de estrés de RE, GRP78 se disocia de PERK permitiendo su activación. PERK se oligomeriza y autofosforila, activando así su dominio quinasa citosólico. PERK activado fosforila la serina 51 e inactiva la subunidad  $\alpha$  del factor 2 de la iniciación de la traducción en eucariotas (eIF2 $\alpha$ ), llevando a la atenuación de la traducción y reduciendo la carga de proteínas en el RE (Kim *et al.*, 2008). Sin embargo,

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

el eIF2 $\alpha$  fosforilado (p-eIF2 $\alpha$ ), también inicia la traducción preferente de mRNA como la del factor ATF4, el cual promueve la supervivencia de la célula mediante la inducción de la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, el balance redox, plegamiento de proteínas y autofagia (Deegan *et al.*, 2012; Harding *et al.*, 2003). Sin embargo, no todos los genes inducidos por ATF4 promueven la supervivencia celular. ATF4 juega un papel clave en la inducción de la expresión de la proteína homóloga de C/EBP (CHOP, también llamado gen 153 inducible por detención del crecimiento y daño del ADN o GADD153) relacionada con la inducción de muerte celular por apoptosis (Deegan *et al.*, 2012; Kapoor and Sanyal, 2009).

- **ATF6**

ATF6 tiene 2 isoformas, ATF6 $\alpha$  y ATF6 $\beta$ , que tienen una función similar y se expresan en todas las células. Después de la disociación de GRP78, ATF6 se trasloca al complejo de Golgi donde la molécula, de 90kDa, es cortada por 2 proteasas, S1P y S2P, generando así su forma activa de 50kDa. La forma activa de ATF6 trasloca al núcleo donde induce la expresión de genes que contienen un elemento de respuesta al estrés de RE (ERSE) en su promotor entre los que se encuentran chaperonas de RE como GRP78, GRP94 y PDI, y los factores de transcripción CHOP y proteína-1 ligadora de la caja X (XBP-1) que tiene un papel muy importante en la señalización por IRE1 (Lai *et al.*, 2007; Szegezdi *et al.*, 2006).

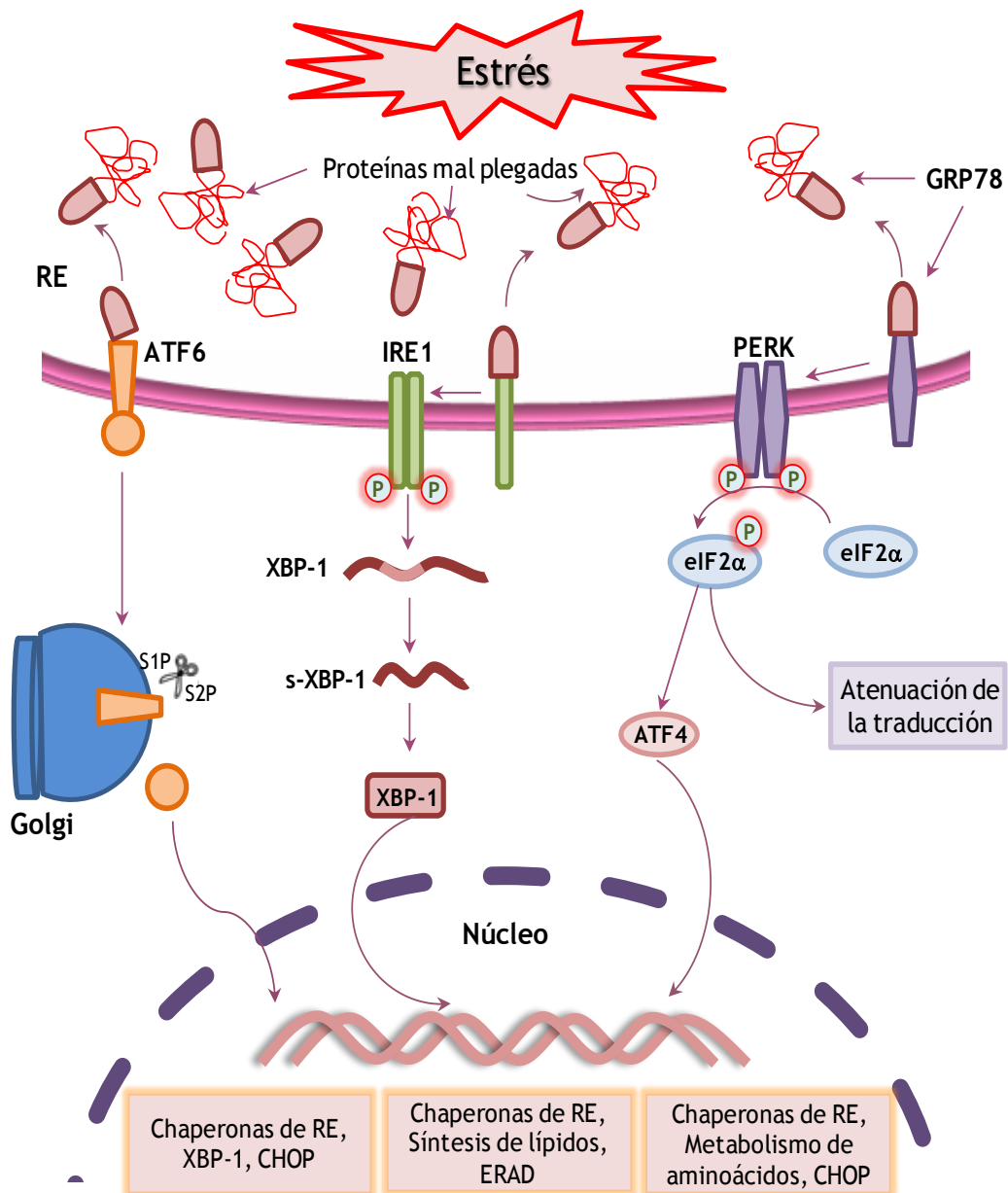


Fig. I.7. Representación esquemática de la UPR desencadenada por la presencia de estrés de RE. En la figura se pueden ver las tres vías de señalización activadas por PERK, ATF6 e IRE1 respectivamente. En condiciones basales estas tres proteínas están en forma inactiva por la interacción con GRP78 en el lumen del RE, mientras en presencia de estrés de RE, GRP78 interactúa preferiblemente con proteínas mal plegadas permitiendo así su activación. El objetivo final de la UPR es el restablecimiento de la homeostasis por medio de la atenuación de la traducción o por la transcripción selectiva de genes como

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

chaperonas, genes involucrados en el metabolismo, o en última instancia, genes relacionados con el proceso de muerte celular como es el caso de CHOP.

- **IRE1**

IRE1 tiene dos homólogos: IRE1 $\alpha$ , presente en todas las células e IRE1 $\beta$ , encontrado solo en el intestino (Kapoor and Sanyal, 2009). En respuesta a la disociación de GRP78, IRE1 se oligomeriza y autofosforila lo que lleva a su activación. Una vez activado actúa como una endonucleasa y elimina un intrón de 26 nucleótidos del pre-mARN del XBP-1 inducido previamente por la vía de ATF6, convirtiéndolo en un mARN maduro. El XBP-1 maduro (sXBP-1) codifica un factor de transcripción estable que se trasloca al núcleo y se une al promotor ERSE. Dentro de los genes activados por XBP-1 se encuentran proteínas involucradas en la síntesis de lípidos, en la biogénesis del RE y chaperonas del RE como GRP78 y P58<sup>IPK</sup> (Deegan *et al.*, 2012; Szegezdi *et al.*, 2006). Además de estos, también se activa la transcripción de genes que codifican componentes de ERAD; este proceso involucra el reconocimiento y traslocación de proteínas mal plegadas del RE al citosol donde son ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma (Deegan *et al.*, 2012; Flamment *et al.*, 2010; Meusser *et al.*, 2005).

### **8.3. Estrés de retículo endoplasmático y apoptosis**

Cuando el estrés de RE es de gran intensidad o larga duración y todos los esfuerzos de la UPR por restablecer la homeostasis fallan, se activan los programas de muerte celular como la apoptosis. Normalmente, mediante la apoptosis inducida por estrés de RE, se eliminan solo algunas células que no recuperan la homeostasis a pesar de la acción del UPR; sin embargo, el estrés de RE crónico puede inducir apoptosis en un gran número de células, efecto que ha sido asociado con varias enfermedades tales como procesos neurodegenerativos, enfermedades renales, cáncer, obesidad, diabetes,

arterosclerosis , y enfermedades hepáticas (Kaufman, 2002; Tabas and Ron, 2011). La apoptosis es un importante mecanismo para inducir muerte celular en el contexto de estrés de RE, pero el mecanismo molecular por el cual ocurre, no es completamente claro. Como se puede ver en la Fig. 1.8., varios puntos clave del estrés de RE y la UPR se han relacionado con la inducción de apoptosis:

- **Calcio del retículo endoplasmático**

En respuesta al estrés de RE, las proteínas proapoptóticas miembros de la familia Bcl-2, Bax y Bak, oligomerizan en la membrana de RE, resultando en la liberación del calcio del lumen del RE. Esto activa la calpaina que se encuentra en el citosol y esta a su vez, activa proteolíticamente la casp-12. Las caspasas que median la activación de la apoptosis inducida por el estrés del RE no están muy bien definidas, sin embargo se sabe que la casp-12, expresada en roedores, tiene un papel importante y además en diferentes estudios se ha observado que su activación lleva a su vez a la activación de la casp-9 y esta a su vez a la activación de las caspasas efectoras casp-3 y casp-7. Además de actuar como señalizador en activación de las caspasas, el calcio liberado al citosol es rápidamente tomado por la mitocondria donde puede llevar a la pérdida del  $\Delta\psi_m$  e iniciar la vía intrínseca de la apoptosis (Malhi and Kaufman, 2011; Rasheva and Domingos, 2009; Schroder and Kaufman, 2005).

- **Genes inducidos por CHOP**

CHOP puede inducir la expresión de la proteína proapoptótica Bim, así como del receptor de membrana celular de muerte TRAIL y puede inhibir la transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Malhi and Kaufman, 2011).

## Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

- **Activación por IRE1**

En respuesta al estrés de RE, IRE1 forma un complejo con TRAF2 y la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) y activa la quinasa c-Jun amino-terminal (JNK) que tiene varios efectos proapoptóticos, incluyendo la activación de la proteína proapoptótica Bim y la inactivación de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Malhi and Kaufman, 2011; Schroder and Kaufman, 2005).

### **8.4. Estrés de retículo endoplasmático en el hígado**

El hígado es uno de los principales órganos secretores del organismo. Dentro de sus múltiples funciones, se incluyen la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, la regulación de la homeostasis de la glucosa, el metabolismo lipídico y de xenobióticos. Los hepatocitos, al igual que otras células secretoras poseen una estructura de RE altamente activa y bien desarrollada que representa cerca de un 50% del contenido celular. Debido a la gran importancia de la función del RE en el metabolismo del hígado, el estrés de RE y la UPR se han relacionado con casi todas las formas de patologías hepáticas agudas y crónicas, con relevancia especial en esteatosis, esteatohepatitis, hiperhomocistinemia, hepatitis viral, daño por isquemia/reperfusión y toxicidad inducida por fármacos (Ji, 2008; Malhi and Kaufman, 2011).

El uso de algunos fármacos y el desarrollo de toxicidad hepática ha sido asociado a la presencia de estrés de RE, como es el caso de la toxicidad inducida por altas dosis de acetaminofén (Nagy *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2010) y metapirileno (Auman *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 2006). Algunos IP usados en el tratamiento de VIH como SQV, ATV y RTV, también inducen estrés de RE asociado con hepatotoxicidad (Flint *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).



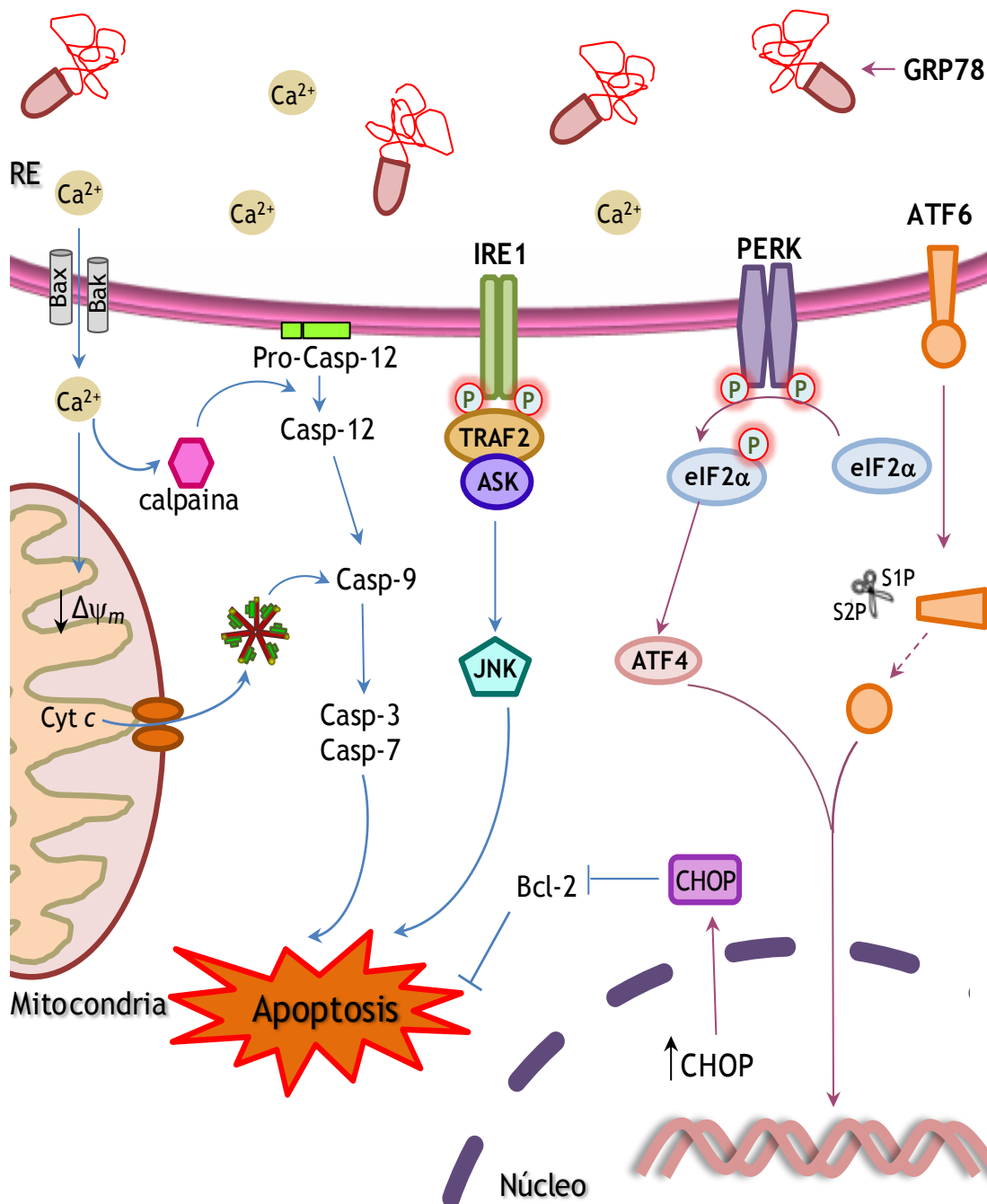


Fig. I.8. Implicación del estrés de RE y de la UPR en el proceso de muerte celular por apoptosis. En presencia de estrés de RE severo o prolongado, la célula puede iniciar el proceso de muerte celular apoptótica por varias vías. La cascada de reacciones iniciada por PERK y ATF6 conlleva al incremento en la traducción y transcripción de CHOP que inhibe la transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2. IRE1 forma un complejo con Bcl-2. IRE1 forma un complejo con TRAF2 y ASK1 activando así a JNK, un inductor de apoptosis. En respuesta al estrés de RE,

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

las proteínas BAX y BAK del RE polimerizan y permiten la liberación del calcio del RE que puede conllevar a apoptosis por dos vías i) mediante la activación de la calpaína citosólica que activa a su vez a la casp-12 e inicia la cascada de caspasas; ii) el calcio liberado es tomado por la mitocondria lo que hace que caiga el  $\Delta\Psi_m$  y se inicie la vía intrínseca de la apoptosis, con la liberación de las proteínas mitocondriales, la formación del apoptosoma y la activación de la cascada de caspasas.

La mayoría de los fármacos que inducen estrés de RE contribuyen al desarrollo de hígado graso (Ji, 2008). La esteatosis y la esteatohepatitis asociada a estrés de RE han sido unas de las consecuencias de respuesta al estrés de RE más ampliamente estudiadas. La relación entre estrés de RE e hígado graso es bilateral se ha visto que la esteatosis promueve el estrés de RE, y que el estrés de RE conlleva a la esteatosis. Las evidencias actuales apuntan fuertemente a un importante rol de la respuesta al estrés de RE en esteatohepatitis no alcohólica (Dara *et al.*, 2011).

## **II. OBJETIVOS**



El objetivo general de este trabajo fue evaluar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la toxicidad hepática inducida por el tratamiento con efavirenz.

Los objetivos específicos que nos planteamos fueron:

1. Evaluar el potencial citotóxico y específicamente mitotóxico de efavirenz y los mecanismos involucrados en ellos.
2. Determinar la capacidad de efavirenz para inducir autofagia, su relación con la mitocondria y las consecuencias para la célula hepática.
3. Analizar la influencia del efavirenz sobre el perfil de expresión de un grupo de genes relacionados con estrés y toxicidad.
4. Evaluar la capacidad de efavirenz para generar estrés de retículo endoplasmático, la respuesta celular a este estrés y la implicación de la mitocondria en dicha respuesta.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**





## **1. REACTIVOS**

### **1.1. Obtención de efavirenz**

En la fase inicial de este trabajo, el EFV (Sustiva™) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, EE.UU.) fue obtenido en su presentación comercial y procesado para aislar su principio activo en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica (Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia). La pureza (98 - 100%) y estabilidad de las soluciones fueron evaluadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Posteriormente, fue obtenido de la casa comercial Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido).

En ambos casos fue disuelto en metanol al 0,5% antes de proceder a su utilización, obteniendo una concentración de 3 mg/mL. La concentración de metanol usada no tiene un impacto significativo en los parámetros estudiados.

### **1.2. Reactivos químicos generales**

La mayoría de los reactivos usados en este trabajo son de grado de pureza analítico y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemicals (Stenheim, Alemania), Panreac Quimica S.A. (Barcelona, España), Merck (Darmstadt, Alemania), y Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

Las sondas fluorescentes utilizadas fueron bisBenzimide H33342 trihydrochloride (Hoechst 33342) y 10-N-nonyl naranja de acridina (NAO) ambas de Sigma-Aldrich Chemicals; Ioduro de propidio (IP) y anexina V-fluoresceína del kit “Annexin -V-FLUOS Staining kit” de Roche Diagnostics; *Red active caspase-9* (RED-LEHD-FMK), *Fluorescein active caspase-3* (*fluorescein isothiocyanate* (FITC)-DEVD-FMK), *Red active caspase 8* (RED-IETD-FMK) del kit CaspGLOW™ de Biovision Research Products (Mountain View, CA, EE.UU.); MitoSOX™, tetrametilrodamina (TMRM), monoclorobimano,

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Fluo-4 AM, Rhod-5N AM, LysoTracker Green, LysoTracker Red, ERTracker Red y ERTracker Blue White DPX de Molecular Probes (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.).

### **1.3. Reactivos para el cultivo celular**

Los medios y suplementos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco (Invitrogen Life Technologies) incluyendo medio mínimo esencial (MEM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), D-MEM/F12, William's E, OptiMEM, tampón fosfato salino (PBS), piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, tripsina-EDTA, L-glutamina, penicilina/estreptomicina y colagenasa. El medio EMG-2, el BulletKit y la Fungizona-anfotericina B, fueron suministrados por Clonetics (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.); el suero fetal bovino (FBS) fue obtenido de Lonza (Basilea, Suiza) y el *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) de Sigma-Aldrich Chemicals.

## **2. CULTIVO CELULAR**

### **2.1. Líneas celulares**

En este estudio se usaron 2 líneas celulares: la línea celular inmortal Hep3B (ATCC HB-8064), proveniente de hepatoblastoma humano y la línea celular HeLa (ATCC CCL-2), proveniente de carcinoma cervical humano.

El cultivo de la línea celular Hep3B se llevó a cabo en medio MEM suplementado con 1 mM de aminoácidos no esenciales, mientras las células HeLa se cultivaron en el medio DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L). Los medios de cultivo se suplementaron con 10% de FBS previamente inactivado por calor (30 minutos a 56 °C), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomicina. A los

cultivos se les reemplazó el medio cada 2-3 días. Las líneas celulares se subcultivaron una vez alcanzaban una densidad celular de 90-95%. Para realizar los experimentos se utilizaron cultivos celulares subconfluentes de pase inferior a 35.

### 2.2. Cultivos primarios

Se usaron células endoteliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) obtenidas de cordones umbilicales frescos del Hospital Clínico de Valencia. Las células se extrajeron por tratamiento con colagenasa y fueron cultivadas en medio EMG-2 suplementado con el BulletKit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con FBS 5%, penicilina (50 U/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y fungizona-anfotericina B (2,5 µg/mL).

También se emplearon hepatocitos primarios que se obtuvieron por medio de una doble digestión con colagenasa (Pichard *et al.*, 2006), a partir de biopsias de pacientes que fueron sometidos a la eliminación quirúrgica de tumores hepáticos en el Hospital La Fe (Valencia, España). Los experimentos fueron aprobados por el comité ético del hospital. Los hepatocitos primarios se cultivaron en un medio de cultivo que contenía los medios D-MEM/F12 y William's E en proporción 1:1, suplementado con 5% de FBS; 0,29 g/L de glutamina; 0,04 mg/L de dexametasona y 200 mg/L de glucagón. El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h.

### 2.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos se mantuvieron en un incubador (IGO 150, Jouan, Saint-Herblain Cedex, Francia) a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (AirLiquide Medicinal, Valencia, España).

## 2.4. Experimentos de transfección

### 2.4.1. Sobreexpresión de proteínas

Para la sobreexpresión de dos proteínas fluorescentes, mtdsRed y LC3-GFP, se usaron los procedimientos estándar.

- **MtdsRed**

MtdsRed es ampliamente usado como un marcador mitocondrial, no solo en condiciones basales, sino también en escenarios de cambios de la dinámica mitocondrial como autofagia y apoptosis (Bianchi *et al.*, 2006; Twig *et al.*, 2008). El mtdsRed fue comprado a Clontech (Takara Bio Group, Mountain View, CA, EE.UU.).

- **LC3-GFP**

El marcaje de LC3-GFP es la aproximación más comúnmente usada para monitorear la formación de autofagosomas (Mizushima *et al.*, 2010). El LC3-GFP fue un regalo de G. Herrero-Martín (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, España).

Para sobreexpresar establemente estas proteínas, se transfectaron células HeLa con los vectores con mtdsRed o LC3-GFP, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se seleccionaron clones estables con Geneticina (G418) 400 µg/ml por un procedimiento estándar. Después se usó la técnica FACS *Fluorescence-activated cell sorter* para obtener una población que expresaba cantidades similares de las proteínas fluorescentes.

La localización mitocondrial de mtdsRed fue confirmada por imágenes de doble marcaje fluorescente. Las células HeLa que expresaban establemente mtdsRed fueron transfectadas con cyt c-GFP y se evaluó la colocación de las dos señales por microscopía confocal. MtdsRed se mantuvo dentro de la mitocondria aún bajo la inducción de apoptosis, como se observó del hecho que después de la liberación de cyt c de la mitocondria al citosol, las dos señales fluorescentes no se solapaban más. Resultados similares sobre la localización subcelular de mtdsRed han sido anteriormente publicados (Roy *et al.*, 2009)

### 2.4.2. Silenciamiento de CHOP

CHOP fue silenciado transitoriamente por el ARN de interferencia usando GADD153 siRNA(h) de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). Los experimentos control se hicieron con el siRNA sin conjugar SignalSilence® (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.). La transfección se llevó a cabo con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las células Hep3B se plantaron en flask t-25 un día antes del experimento, a una densidad de aproximadamente el 90%. En medio OptiMEM sin suero, se formaron complejos ARN/lipofectamina, usando 250 pmol de siRNA y 20 µL de Lipofectamina 2000 por flask. Las transfecciones se realizaron en medio de cultivo completo sin antibióticos por 24 h reemplazándolo después con el medio completo que contenía antibióticos.

### 2.5. Generación y mantenimiento de células Rho<sup>0</sup>

Para generar el fenotipo celular Rho<sup>0</sup>, células Hep3B fueron tratadas con 100 ng/mL de bromuro de etidio (BrEt), un químico mutagénico, para reducir los niveles de ADN mitocondrial (mtADN) y el medio fue suplementado con uridina 50 µg/mL (Mansfield *et al.*, 2005). El tratamiento fue continuo durante 8 semanas, cambiando el medio de cultivo cada 2 días.

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

Para comprobar que las células después de 8 semanas de tratamiento con bromuro de etidio, tenían el fenotipo Rho<sup>0</sup>, se evaluó su proliferación y la expresión proteica mediante Western blot (WB).

- Proliferación: El fenotipo Rho<sup>0</sup>, se caracteriza por presentar una reducida capacidad para crecer en presencia de azúcares no fermentables como la galactosa. Para analizar esta insuficiencia respiratoria, las células Rho<sup>+</sup> y Rho<sup>0</sup> se cultivaron en medio de cultivo que contenía glucosa o galactosa, y su proliferación se siguió durante 4 días con citometría estática.
- Western blot: En células Rho<sup>+</sup> y Rho<sup>0</sup> se analizó la expresión de la proteína citocromo c oxidasa II (COX2), la cual es codificada por el mtADN. El procedimiento para el WB se explicará en la sección 0.

### **3. TRATAMIENTOS**

Los experimentos se realizaron usando un rango de concentraciones de EFV entre 5 y 50  $\mu\text{M}$ . En cada experimento se uso un control del vehículo (metanol) aplicando la misma concentración de metanol usado en los tratamientos y un control negativo, células incubadas con el medio en ausencia de tratamiento alguno.

### **4. PROLIFERACIÓN CELULAR**

Las células Hep3B se plantaron en placas de 6 pocillos. Después de una noche de estabilización del cultivo, se trataron con medio sin tratamiento, vehículo y 3 concentraciones de EFV (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Se dejaron proliferar y a las 24, 48 y 72 h de tratamiento, se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se contaron usando un hematocitómetro

(Bright Line Counting Improved Neubauer Chamber, Hausser Scientific, Horsham, PA, EE.UU.).

### 5. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó por medio del ensayo colorimétrico por MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]. En este ensayo se analiza la capacidad de las células para reducir el MTT (amarillo) a Formazan (de color azul), reducción que tiene lugar solo cuando las deshidrogenasas mitocondriales están activas y es considerado como un marcador de viabilidad celular, relacionado con la función mitocondrial (Gerlier and Thomasset, 1986; Mosmann, 1983).

Las células Hep3B, HeLa y HUVEC se plantaron en placas de 96 pocillos, se dejaron estabilizar durante una noche y se trataron con vehículo, EFV (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y con medio sin tratamiento durante 24 h. 4 h antes de terminar el tiempo de tratamiento, a cada pocillo se le agregó 20  $\mu\text{L}$  del reactivo MTT (Roche Diagnostics). Una vez finalizadas las 4 h, se disolvieron las células agregando 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de DMSO e incubando 5 minutos a 37 °C y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector espectrofotométrico de placas Multiskan (Thermo LabSystems, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). A los valores obtenidos, se les restó la absorbancia del fondo medida a 690 nm.

### 6. EXPRESIÓN PROTEICA

#### 6.1. Obtención de las muestras

Para analizar la expresión proteica, se plantaron las células en flasks t-25. Después del tratamiento, las células se recogieron sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas y se siguió este protocolo: Se retiró el medio de

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

cultivo, se hizo un lavado con 5 mL de PBS frío y se procedió a levantar las células en forma mecánica, utilizando para ello “scrappers”, en 1,5 mL de PBS frío. La suspensión celular se centrifugó en una microcentrífuga (5415-R, Eppendorf) a 4 °C, durante 5 minutos, a 500 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se usó según cada protocolo.

#### **6.1.1. Obtención de extractos proteicos totales**

Los extractos proteicos totales se obtuvieron, resuspendiendo los pellets en 50 a 100 µL de solución de lisis que contenía HEPES 20 mM pH 7,4; NaCl 400 mM; glicerol 20% (v/v); EDTA 0,1 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 µM y DTT 1 mM, suplementada con 2 inhibidores de proteasa (“Complete Mini” protease inhibitor cocktail 10X y “Pefabloc”, ambos de Roche Diagnostics) y con una mezcla de inhibidores de fosfatasa que contenía NaF 10 µM; NaVO<sub>3</sub> 10 mM; p-nitrofenilfosfato (PNPP) 10 mM y β-glicerofosfato 10 mM. A continuación las muestras se agitaron en un vortex durante 15 segundos y se incubaron en hielo 15 minutos. Después de la incubación, se agitaron nuevamente con vortex durante 30 segundos y se centrifugaron en una microcentrífuga a 16100 g durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, que es el extracto proteico, y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **6.1.2. Extractos proteicos totales protegiendo las fosforilaciones**

Este método de obtención de proteínas, se utilizó para el análisis de p-eIF2α. Los pellets celulares se resuspendieron en 75 µL de PhosphoSafe (Novagen, Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.), combinado con “Complete Mini” protease inhibitor cocktail 10X. A continuación, las muestras fueron agitadas en un vortex durante 15 segundos, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 4 °C, durante 5 minutos a 16000 g. Los



sobrenadantes, que son los extractos proteicos totales, fueron recogidos y almacenados a -20 °C hasta su uso.

### 6.1.3. Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en mitocondrias.

Los pellets celulares, se resuspendieron en 0,5 mL de tampón de fraccionamiento que contenía Tris-HCL 10 mM pH 7,5; sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM. Para lisar las células, la suspensión se pasó 15 veces por una aguja de 23 G, sobre hielo. Las células que no se rompieron, se recogieron por centrifugación a 500 g, 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 16100 g por 30 minutos a 4 °C, obteniéndose la fracción mitocondrial en forma de pellet que se resuspendió en 50 µL de tampón mitocondrial (Tris-acetato 10 mM pH 8,0; NP-40 0,5%; CaCl<sub>2</sub> 5 mM; DTT 1 mM y “Complete Mini” 10X).

## 6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales de los extractos obtenidos se determinó con el ensayo del ácido bicinonínico (BCA). Este ensayo está basado en la reacción de Biuret, la cual consiste en la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>, producida por la reacción del Cu<sup>2+</sup> con residuos oxidables de los aminoácidos como tirosina, cistina, triptófano o cisteína. Los iones Cu<sup>+</sup> producidos, se unen a dos moléculas de BCA, formando un complejo de color morado intenso que absorbe luz a 562 nm. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente (Smith P.K. *et al.*, 1985). Para relacionar la variación de la absorbancia con la cantidad de proteína, se hizo una curva estándar usando diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) preparadas en el mismo tampón que las muestras para minimizar la absorbancia residual. Para realizar el ensayo, se

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

usó el “BCA Protein Assay Kit” (Pierce Chemicals, Boulder, CO, EE.UU.). En una placa de 96 pocillos se agregaron 20 µL de muestra diluida (1:20) o estándar por pocillo; después se añadieron 200 µL del reactivo por pocillo. El reactivo se preparó siempre en el momento del ensayo, mezclando 50 partes del reactivo A (que contiene ácido bicinconínico, carbonato sódico, tartrato sódico y bicarbonato sódico en 0,1 M de NaOH) con 1 parte del reactivo B (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%) tal y como lo indica el fabricante. El ensayo se realizó siempre por duplicado. La placa fue incubada a 37 °C durante 30 minutos, con agitación constante y protegida de la luz.

La medición de la absorbancia a 570 nm se realizó con un lector espectrofotométrico de placas Multiskan (Thermo Labsystems).

### **6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western blot (WB)**

Ambos protocolos se realizaron siguiendo métodos estándar.

#### **6.3.1. Geles de poliacrilamida**

La SDS-PAGE se realizó utilizando el sistema “Mini-PROTEAN 3 Cell” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Los geles de poliacrilamida se prepararon usando una solución de acrilamida/bisacrilamida en proporción 37,5:1 (Sigma-Aldrich Chemicals). Los geles de resolución, con diferentes % de poliacrilamida (dependiente del tamaño de la proteína a analizar), se prepararon en Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y SDS 0,1%. Los geles de concentración se prepararon en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y SDS 0,1%. Para catalizar la reacción de polimerización, se usó persulfato de amonio (APS) (Bio-Rad) y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (Fluka, Sigma-Aldrich Chemicals). Antes de cargar los extractos proteicos, estos se prepararon con la misma cantidad de proteína, se les adicionó el tampón de carga Laemmli (Tris-HCl

0,5 mM pH 6,8; glicerol 25% v/v; SDS 10%;  $\beta$ - mercaptoetanol 0,5% v/v y azul de bromofenol 0,5%) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Paralelo a las muestras, siempre se aplicó un marcador de peso molecular para determinar el peso molecular de los polipéptidos en el gel (Precision Plus Protein Standard-Kaleidoscope, Bio-Rad). La electroforesis se realizó en un tampón de electroforesis (25 mM pH 8,3; glicina 192 mM y SDS 0,1%) a un voltaje de 100 - 150 V.

### 6.3.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Después de separar las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m (Hybond ECL nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), usando el “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). La transferencia se hizo durante 1 h, a 4 °C y a una corriente eléctrica constante de 0,4 amperios en un tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM y metanol 20%).

Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó con la solución Ponceau (Sigma-Aldrich Chemicals), que tiñe las proteínas reversiblemente y se utiliza como control de la cantidad de proteínas cargadas y de la calidad de la transferencia. La tinción Ponceau se eliminó con agua y se procedió a incubar la membrana con una solución bloqueadora (leche en polvo sin grasa al 5% preparada en el tampón tris salino con Tween 20 (TBS-T)) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante, o durante toda la noche a 4 °C. La composición del tampón TBS-T fue: Tris-HCl 20 mM pH 7,2; NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% v/v.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, la membrana se incubó durante 3 h a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario, que fue preparado en solución bloqueadora y suplementado con azida sódica 0,02% ( $\text{NaN}_3$ , Merck). Después de esto, se hicieron 4 lavados de la

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

membrana durante 10 minutos cada uno con TBS-T y en agitación fuerte para eliminar el anticuerpo excedente. A continuación, la membrana se incubó por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, preparado en solución bloqueadora, esto fue seguido por 4 lavados con TBS-T 10 minutos. Los anticuerpos usados se recogen en la Tabla III.1.

#### **6.3.3. Detección por quimioluminiscencia**

El revelado del inmunomarcaje se realizó utilizando los reactivos ECL (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) o, en determinados casos en los que se requería una mayor sensibilidad, SuperSignal West Femto (Pierce) siguiendo las sugerencias del fabricante. El tiempo de exposición varió de 15 segundos hasta 5 minutos, según la intensidad de la señal de cada proteína y el reactivo utilizado. La visualización del inmunomarcaje se realizó con una maquina de revelar automática Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Los análisis densitométricos de estos resultados se realizaron usando el software ImageQuant.

#### **6.3.4. Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa**

Con el fin de reutilizar la membrana de nitrocelulosa y analizar en ella otros anticuerpos, se procedió a la eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios, rompiendo su unión con la membrana. Dicho proceso se realizó sumergiendo la membrana en una solución de glicina 0,5 M pH 2,5 durante 10 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación constante. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-T a temperatura ambiente. A partir de este punto, el Western blot se continuó con el protocolo estándar, iniciando con el bloqueo de la membrana durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C, y siguiendo con la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios.

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>		
<b>PROTEÍNA</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Actina	1:500	Sigma-Aldrich
AIF	1:500	ψProSci
cyt c	1:1000	Zymed
Smac /DIABLO	1:500	Zymed
CI 17	1:1000	Invitrogen
CI 20	1:1000	Invitrogen
CI 39	1:1000	Invitrogen
CIV II (COX II)	1:1000	Invitrogen
CV $\alpha$	1:1000	Invitrogen
CV $\beta$	1:1000	Invitrogen
Porina	1:1000	Invitrogen
LC-3 I y II	1:1000	Sigma-Aldrich
Beclina	1:1000	Abcam
MT2A	1:1000	Sigma-Aldrich
HSPA6	1:1000	Sigma-Aldrich
CHOP	1:1000	Abcam
GRP78	1:1000	Abcam
p-eIF2 $\alpha$	1:1000	Abcam
Caspasa-7	1:1000	Sigma-Aldrich
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>		
Anticuerpo conjugado con HRP frente IgG de conejo	1:5000	Vector Laboratories
Anticuerpo conjugado con HRP frente IgG de ratón	1:2000	Dako

Tabla III.1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los análisis por WB

## **7. DETECCIÓN DE GLUTATIÓN (GSH)**

Para este experimento se usaron células Hep3B, plantadas en placas de 96 pocillos y tratadas durante 4 h. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, el medio se reemplazó por HBSS que contenía el fluorocromo monoclorobimano 0,04 mM, el cual atraviesa la membrana plasmática y forma un aducto con el GSH, en una reacción catalizada por la GSH S-transferasa (Sebastia *et al.*, 2003). La placa se incubó 30 minutos a 37 °C en oscuridad. La fluorescencia se detectó usando un lector de placa Fluoroskan (Thermo Labsystems, Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm.

## **8. DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL POR FLUORIMETRÍA**

Células Hep3B plantadas en placas de 96 pocillos, se trataron durante 24 h, 30 minutos antes de terminar el tiempo de tratamiento, se les agregó MitoSox™ 5 µM. La placa se incubó durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad, después de este tiempo se lavó con HBSS y la fluorescencia se midió en un lector de placa Fluoroskan (Thermo Labsystems, Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y de emisión de 530 nm.

## **9. DETECCIÓN DE CALCIO MITOCONDRIAL**

Las células Hep3B, plantadas en placas negras de 96 pocillos, se lavaron con HBSS libre de calcio y se incubaron con el fluorocromo Rhod-5N AM 5 µM (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, EE.UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, las células se lavaron con HBSS libre de calcio, se les agregaron los tratamientos y se incubaron 20 minutos. Se usaron 2 controles, taspigargina (TG) 4 µM y carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone (CCCP) 10 µM, un desacoplante del gradiente de protones de la membrana interna

mitocondrial. Una vez transcurridos los 20 minutos, se midió la fluorescencia en un lector de placa Fluoroskan (Thermo Labsystems, Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 575 nm.

## **10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CITOMETRÍA ESTÁTICA**

Para obtener imágenes individuales de células vivas y adheridas se empleó microscopía de fluorescencia con un microscopio invertido de fluorescencia IX81 (Olympus, Hamburgo, Alemania) y el software CellR v. 2.8. La señal fluorescente, fue cuantificada utilizando el software de citometría estática “ScanR” versión 2.03.2 (Olympus). Esta técnica permite analizar y cuantificar de manera automática numerosos parámetros celulares. A diferencia de la citometría de flujo, este procedimiento se realiza con células adheridas en placas, evitando así los numerosos artefactos que se pueden encontrar al analizar una suspensión de células adherentes (formación de agregados, daño celular producido por el agente enzimático o mecánico utilizado para separar las células de la superficie en que han sido cultivadas, etc.).

Todos los tratamientos, a menos que se indique lo contrario, se analizaron por duplicado en placas de 24 pocillos, se tomaron 16-20 imágenes de cada pocillo. Después del tratamiento y la incubación con los fluorocromos, las células se lavaron con HBSS y se procedió a su análisis. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 1  $\mu$ M.

Con esta técnica se obtienen no solo los resultados de los parámetros de fluorescencia, sino también el número de células totales contando los núcleos marcados con Hoechst 33342, lo que fue muy útil para evaluar la proliferación bajo diversas condiciones.

## **10.1. Apoptosis**

Las células Hep3B se trataron durante 24 h y como control positivo de apoptosis se usó staurosporina 1  $\mu\text{M}$  (STS), un inhibidor de quinasas.

### **10.1.1. Análisis bivariado de Anexina V/IP**

Una vez terminado el tratamiento, el medio se reemplazó con HBSS que contenía 1  $\mu\text{M}$  de Hoechst 33342 y anexina V-fluoresceína 0,5  $\mu\text{L}$  usado para detectar la exteriorización de fosfatidilserinas. La placa se incubó en oscuridad, a 37 °C y en agitación constante durante 30 minutos. 5 minutos antes de terminar el tiempo de incubación, a cada pocillo se le agregó 0,5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (IP) para marcar las células muertas o dañadas.

En un segundo experimento, para evaluar el papel de la autofagia sobre la apoptosis inducida por EFV, las células Hep3B, plantadas en placas de 48 pocillos, se trataron en presencia o ausencia de 3-metiladenina (3MA) 2,5  $\mu\text{M}$ , un inhibidor clase III PI3K usado a menudo como un supresor de la formación del autofagosoma, y se hizo un análisis bivariado Anexina V/IP como ya se ha descrito. Los filtros usados para este experimento fueron 495 nm de excitación y 519 nm de emisión para Anexina V y 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión para IP.

### **10.1.2. Evaluación de los núcleos durante la apoptosis**

Después de tratar las células Hep3B, sus núcleos se marcaron con el fluorocromo Hoechst 33342 y por citometría estática se evaluó el área y la intensidad media de fluorescencia del núcleo. Además se tomaron fotos de los núcleos a 40X para evaluar su morfología.



### **10.1.3. Detección de las caspasas 3, 8 y 9**

Después de 24 h de tratamiento, se agregó a cada pocillo 1  $\mu\text{L}$  de Hoechst 33342 y 1,5  $\mu\text{L}$  de los marcadores fluorescentes de caspasas permeables y no tóxicos: RED-LEHD-FMK para casp-9, fluorescein isothiocyanate (FITC)-DEVD-FMK para casp-3 y RED-IETD-FMK para casp-8. Las células se incubaron en la oscuridad por 30 minutos, a 37 °C y en agitación constante. Se utilizaron los filtros 495 nm de excitación y 519 nm de emisión para detectar la casp-3 y 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión para detectar las cap-8 y -9.

### **10.2. Análisis del ciclo celular**

Se emplearon células Hep3B tratadas durante 24 h, marcando posteriormente los núcleos con Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$ . Por citometría estática se hizo un análisis del ciclo celular, cuantificando el contenido de cromatina de las células en cada tratamiento.

### **10.3. Detección del ion superóxido mitocondrial**

Para la detección de la producción del ion superóxido mitocondrial, se trataron células Hep3B o hepatocitos primarios. Durante los últimos 30 minutos del tratamiento, se agregó al medio Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y MitoSOX<sup>TM</sup> 5  $\mu\text{M}$ . Este fluorocromo está especialmente diseñado para dirigirse directamente a la mitocondria (ya que es atraído por el  $\Delta\psi_m$  debido a su carga positiva), donde es oxidado únicamente por el superóxido y no por otras ERO. Como control positivo, se empleó un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, rotenona (Rot) 25  $\mu\text{M}$  que es considerado clásicamente como un generador de ERO. Para determinar la reversibilidad del efecto de EFV, las células Hep3B se trataron durante 1 h, después fue retirado el tratamiento y 30 minutos más tarde se agregaron los fluorocromos

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

que se incubaron durante 30 minutos más. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

#### **10.4. Detección del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

Se trataron células Hep3B, HeLa y hepatocitos primarios. 30 minutos antes de terminar el tratamiento, se agregó al medio Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y TMRM 5  $\mu\text{M}$ . Como control positivo se utilizó un desacoplador de la OXPHOS, carbonylcianida-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) 10  $\mu\text{M}$ . Para estudiar la reversibilidad del efecto de EFV, las células Hep3B se trataron durante 1 h, después fue retirado el tratamiento y 30 minutos más tarde se agregaron los fluorocromos, que se incubaron durante 30 minutos más. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

#### **10.5. Determinación de la masa mitocondrial**

##### **10.5.1. 10-N-nonyl naranja de acridina (NAO)**

En células Hep3B tratadas durante 3 periodos de tiempo: 1, 6 y 24 h y en hepatocitos primarios tratados durante 24 h, se visualizaron las mitocondrias y se cuantificó la masa mitocondrial. 30 minutos antes de terminar el tratamiento, se le agregó al medio Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y NAO 0,5  $\mu\text{M}$  y se incubó 30 minutos en la oscuridad. Esta sonda fluorescente se une específicamente a la cardiolipina presente en la membrana mitocondrial, independientemente del  $\Delta\psi_m$  (Wu *et al.*, 2007), pudiendo marcar de manera específica las mitocondrias de células vivas. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 495 nm de excitación y 519 nm de emisión.

Para evaluar si las ERO están involucradas con el efecto de EFV sobre la proliferación y la masa mitocondrial, se trataron células Hep3B con Trolox, un

análogo de la vitamina E. Las células se cultivaron con Trolox 0,5 mM durante 1 h y después fueron tratados durante 24 h. 30 minutos antes de terminar el tiempo de tratamiento, se les agregó Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y NAO 0,5  $\mu\text{M}$  y se incubó 30 minutos en la oscuridad.

### 10.5.2. Proteína mtdsRed

Otro método usado para determinar la masa mitocondrial, fue por medio del uso de células HeLa establemente transfectadas que expresan la proteína fluorescente (roja) mtdsRed, de localización mitocondrial y que fue diseñada específicamente para el marcaje fluorescente de estas organelas. Dichas células se trataron durante 4 periodos de tiempo: 1, 6, 24 y 48 h. 30 minutos antes de terminar su tratamiento, se les adicionó Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y se procedió a la evaluación. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

### 10.6. Expresión y localización de LC3

En este experimento se utilizaron células HeLa establemente transfectadas, que expresan la proteína LC3-GFP, comúnmente usada para monitorear la formación de autofagosomas (Mizushima *et al.*, 2010). Las células se trataron durante 24 y 48 h, 30 minutos antes de terminar su tratamiento se les adicionó Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y se procedió a la evaluación. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 495 nm de excitación y 519 nm de emisión.

### 10.7. Contenido lisosomal

Para este experimento se usaron células HeLa, tratadas durante 24 h. 30 minutos antes de finalizar el tratamiento se les agregó LysoTracker Green 0,1

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

$\mu\text{M}$  y Hoechst 33342  $1 \mu\text{M}$ , se incubaron 30 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , en oscuridad. Para su detección, se usaron los filtros  $495 \text{ nm}$  de excitación y  $519 \text{ nm}$  de emisión.

#### **10.8. Contenido de calcio citosólico**

En células Hep3B tratadas durante 24 h, se evaluó el contenido de calcio citosólico utilizando TG  $2 \mu\text{M}$  como control positivo. Después del tratamiento, el medio se reemplazó con HBSS libre de calcio que contenía Hoechst 33342  $1 \mu\text{M}$  y el indicador verde-fluorescente de calcio Fluo-4 AM  $2 \mu\text{M}$ , incubándose por 30 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en agitación constante. Los filtros utilizados para su detección fueron  $495 \text{ nm}$  de excitación y  $519 \text{ nm}$  de emisión.

#### **10.9. Cinética del calcio del retículo endoplasmático**

Para evaluar el flujo de calcio del RE, las células después de ser tratadas fueron expuestas a una alta concentración de TG (Costa *et al.*, 2010; Ferreiro *et al.*, 2008). Células Hep3B se trataron durante 24 h, utilizando como control positivo se usó TG  $2 \mu\text{M}$ . El medio se reemplazó por HBSS libre de calcio que contenía Hoechst 33342  $1 \mu\text{M}$  y Fluo-4 AM  $2 \mu\text{M}$ , la placa se incubó durante 30 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en agitación constante. En primer lugar se midieron los niveles basales de calcio citosólico, haciendo dos mediciones con un intervalo de un minuto. Después se añadió TG  $5 \mu\text{M}$  para estimular el flujo del calcio y a cada tratamiento se le hicieron 5 mediciones con una diferencia de un minuto entre ellas. Los filtros utilizados fueron  $495 \text{ nm}$  de excitación y  $519 \text{ nm}$  de emisión.

#### **10.10. Señal de retículo endoplasmático**

Células Hep3B fueron tratadas durante 24 h, usando como control positivo TG  $2 \mu\text{M}$ . 30 minutos antes de terminar el tratamiento, se agregaron al medio los fluorocromos Hoechst 33342  $2,5 \mu\text{M}$  y ERtracker Red  $2,5 \mu\text{M}$  (Molecular Probes,

Invitrogen), se incubaron y se procedió a su medición. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

## **11. MICROSCOPIA CONFOCAL**

Se utilizó un microscopio láser confocal LeicaTCS-SP2 con líneas de laser de argón y helio-neón, unido a un microscopio invertido Leica DMIRBE. Las imágenes fueron capturadas a un aumento de 63X con el objetivo de inmersión HCX PL APO 63.0x1.32 UV. Después de tratar las células, se marcaron con el fluorocromo correspondiente y se lavaron con HBSS antes de proceder a su análisis. Las imágenes se analizaron con el software LCS Lite y el solapamiento de las señales se cuantificó con el programa ImageJ. Para calcular el índice de correlación (Icorr), se usó la aplicación Colocalization Colormap.

### **11.1. Activación de la autofagia - colocalización de lisosomas y LC3**

En este experimento se usaron células HeLa que expresan LC3-GFP de forma estable que fueron tratadas durante 24 h. 30 minutos antes de terminar el tratamiento, se marcaron con el fluorocromo LysoTracker Red 0,1  $\mu\text{M}$  y se procedió a su procesamiento. La longitud de onda utilizada para la detección de LC3-GFP fue 488 nm de excitación y 502-539 nm de emisión y para LysoTracker Red fue 543 nm de excitación y 560-700 nm de emisión.

## **11.2. Degradación mitocondrial - colocalización de lisosomas y mitocondrias**

Células HeLa que expresan establemente la proteína mtdsRed, fueron tratadas durante 24 h. 30 minutos antes de terminar el tratamiento, se marcaron con el fluorocromo LysoTracker Green 0,1  $\mu$ M. La longitud de onda utilizada para la detección de LysoTracker Green fue 488 nm de excitación y 502-539 nm de emisión y para mtdsRed fue 543 nm de excitación y 560-700 nm de emisión.

## **11.3. Señal del retículo endoplasmático**

Se trataron células Hep3B durante 24 h, como control positivo se utilizó TG 2  $\mu$ M. 30 minutos antes de finalizar el tratamiento, las células se marcaron con la sonda fluorescente ERtracker Blue White DPX 2,5  $\mu$ M (Molecular Probes, Invitrogen). La detección de la fluorescencia se realizó a una excitación de 351nm y 364nm y una emisión de 500-586nm.

## **12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Células Hep3B, hepatocitos primarios o células HeLa, se plantaron en portaobjetos de cámara de 4 pocillos "Lab-Tek chamber slides" (Nalge Nunc International, Naperville, IL, EE.UU.). Las células fueron tratadas durante 24 h y fijadas con glutaraldehído 3,5% (1 h a 37 °C), después se realizó la post-fijación en Tretaxido de osmio ( $OsO_4$ ) (1 h a temperatura ambiente). A continuación se tiñeron con acetato de uranilo 2% (2 h, a 4 °C y en oscuridad) y finalmente enjuagadas en el tampón sodio fosfato 0,1 M, pH 7,2; deshidratadas en etanol e infiltradas durante la noche en araldita (Durcupan, Fluka Buchs, Suiza). Después de la polimeración, los cultivos fueron separados del portaobjetos y pegados a bloques de araldita. Con un ultramicrotomo Ultracut UC-6 (Leica, Heidelberg, Alemania), se hicieron cortes seriados semi-

finos (1,5  $\mu\text{m}$ ), estos se pusieron en portaobjetos, se tiñeron con azul de toluidina 1% y se pegaron con “Super Glue, Loctite” a bloques de araldita. Se desprendieron de los cubreobjetos por congelaciones (en nitrógeno líquido) y descongelaciones repetidas. Con el ultramicrotomo se prepararon nuevos cortes ultra finos (0,07  $\mu\text{m}$ ) y se tiñeron con citrato de plomo. Finalmente las fotomicrografías se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión (MET) (FEI Tecnai Spirit G2) usando una cámara digital (Morada, Soft Imaging System, Olympus).

### **13. ANÁLISIS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

#### **13.1. Extracción de ácidos nucleicos**

##### **13.1.1. Extracción de ADN**

El ADN total celular fue aislado usando el kit “QIAamp® DNA mini kit” (Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante; los pellets se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de PBS, se les agregó 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K y 200  $\mu\text{L}$  del tampón de lisis. Se incubaron 10 minutos a 50 °C, se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de etanol 96-100%, y se transfirieron a la columna que retiene el ADN. Se lavó la columna y al ADN se eluyó en 200  $\mu\text{L}$  del tampón de elusión.

##### **13.1.2. Extracción de ARN**

El ARN total celular se obtuvo usando el kit “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante; los pellets se resuspendieron en 350  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis, las células se lisaron pasándolas a través de una aguja de 20 G. A continuación, se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de etanol

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

70% y se transfirieron las muestras a una columna que retiene ARN y se trataron con DNase I. Tras lavar repetidamente la columna, el ARN se eluyó en 30 µL de agua “libre de RNasa”.

#### **13.1.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos**

El contenido de ácidos nucleicos (ADN ó ARN) obtenidos, se cuantificó por espectrofotometría, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). La cantidad de ADN y/o ARN y su integridad se comprobaron también por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y tampón TAE 1X. La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 V) y finalmente las bandas de ADN o ARN se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta. Para fotografiar los geles se utilizó la cámara automática Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japón).

#### **13.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por retotranscripción (RT)**

Este procedimiento permite obtener el ADNc, a partir de ARN mediante la acción de una retrotranscriptasa (una enzima de origen viral que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN). El ADNc se sintetizó usando 1 o 2 µg de ARN y la enzima Superscript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante: en un volumen final de 20 o 40 µL (dependiente de la cantidad de ARN) y en presencia de tampón (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM), DTT 10 mM, RNaseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) 40 o 80 U, cebador oligo-dT (Invitrogen) y mezcla de deoxinucleósido trifosfatos 0,5 mM (dNTP), (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, a una concentración de 0,5 mM cada uno en la mezcla) (Roche Diagnostics).



### 13.3. PCR semicuantitativa

La reacción de PCR para amplificar el ADNc de *hXBP1*, se llevó a cabo en un termociclador PCR System 2400, Perkin Elmer (Waltham, MA, EE.UU.). El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ L, los cuales contenían 1  $\mu$ L de ADNc, 0,1  $\mu$ l de Taq polimerasa “FastStart Taq DNA Polymerase” (Roche Diagnostics), 200  $\mu$ M de dNTPs y 1  $\mu$ M de cada cebador (Tabla III.2.) (IDT (Munich, Alemania)). La reacción se hizo con el siguiente perfil térmico: 5 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a 52 °C (hibridación) y 38 segundos a 72 °C (elongación). La ciclofilina A (*CyPA*) se usó como gen control y su reacción se hizo con el siguiente perfil térmico: 5 minutos a 95 °C, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a 60 °C (hibridación) y 40 segundos a 72 °C (elongación). El producto de la PCR se evaluó en geles de agarosa al 2% y se detectaron 2 fragmentos: XBP1 (595 pb) y s-XBP1 (569 pb).

Para normalizar los resultados, el valor de la cuantificación de cada muestra, fue dividido por el valor de *CyPA*.

### 13.4. PCR cuantitativa en tiempo real

Esta técnica es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que se utiliza para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN o ADNc, utilizando un fluoróforo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza tras cada ciclo de amplificación, en tiempo real. Se empleó un termociclador Carousel-based LightCycler® 2.0 Real Time PCR System (Roche Diagnostics), utilizando el kit Light Cycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics). Para la reacción se mezcló el reactivo FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>, el cual contiene todo lo necesario para la reacción (enzima, tampón de reacción y nucleótidos marcados con SYBR

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Green I) con los cebadores y el ADN o ADNc. En cada experimento se incluyó un control negativo al cual en vez de ADN o ADNc se adicionó agua y todas las reacciones se realizaron por duplicado.

La especificidad de las reacciones se confirmó analizando las curvas de fusión y por electroforesis en geles de agarosa. La cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva estándar construida a partir de diluciones de los productos de PCR purificados para cada par de cebadores. Todos los cebadores utilizados y sus características se recogen en la Tabla III.2.

#### **13.4.1. Determinación del número de copias de ADN mitochondrial**

Para determinar el número de copias de mtADN se amplificó el gen mitocondrial *NDR1* y se relativizó con respecto al nADN evaluando la secuencia de *CyPA*. Para esto se amplificó 1  $\mu\text{L}$  del ADN de las muestras, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  que contenía 0,5  $\mu\text{M}$  de una pareja de cebadores específicos complementarios a la secuencia de *NDR1* (mtF3212 y mtR3319) o 1  $\mu\text{M}$  de los cebadores de *CyPA* y 2  $\mu\text{L}$  de FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>. Los resultados se expresan como mtADN/nADN.

#### **13.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real**

Se amplificó 1  $\mu\text{L}$  del ADNc de las muestras en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  que contenía 1  $\mu\text{M}$  de cada par de cebadores específicos y 2  $\mu\text{L}$  de FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>. La *CYPA*, se usó como gen control.

Gen	Secuencia de los cebadores	Condiciones de la PCR		Tamaño fragmento (pb)
		T° hibridación	No. ciclos	
<b>PCR cuantitativa</b>				
NDR1 (mtADN)	s 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'	65 °C	40	108
	as 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTTA-3'			
GADD15 /CHOP	s 5'-AGAACCAGGAAACGGAAACAG A-3'	54 °C	35	67
	as 5'-TTCCTTCATGCGCTGCTTT-3'			
GRP78	s 5'-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3'	51 °C	35	398
	as 5'-GCATCTTGGTGGCTTTCCAGCCATTC-3'			
CyPA	s 5'-CGTCTCCTTTGAGCTGTTTG-3'	60 °C	35	415
	as 5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCT-3'			
hXBP1	Número de catálogo PPH02850A	55 °C	35	133
hATF4	Número de catálogo PPH02016A	55 °C	35	120
<b>PCR semicuantitativa</b>				
s-hXBP1	s 5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTG -3'	52 °C	35	XBP1 595
	as 5'-GTATCTCTAAGACTAGGGGCTTGGT-3'			s-XBP1 569
CyPA	s 5'-CGTCTCCTTTGAGCTGTTTG-3'	60 °C	25	415
	as 5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCT-3'			

Tabla III.2. Cebadores empleados en las reacciones de PCR.

### 13.5. Micromatriz de RT-PCR en tiempo real

Para analizar la expresión génica en distintos procesos relacionados con estrés y toxicidad celular, se realizó una micromatriz de PCR en tiempo real (RT2Profiler™ PCR Array: Human Stress and ToxicityFinder™ Ref. PAHS-003C,

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

SABiosciences, Qiagen, Frederick, MD, EE.UU.). Se evaluaron 84 genes (Tabla III.3.), divididos en 8 grupos implicados en: estrés metabólico, estrés oxidativo, choque térmico, proliferación y carcinogénesis, detención del crecimiento y senescencia, inflamación, necrosis/apoptosis (daño y reparación de ADN) y señalización de la apoptosis. También se evaluaron 5 genes control.

Se trataron células Hep3B durante 8 h con EFV 25  $\mu\text{M}$  o durante 24 h con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$ . La extracción de ARN se realizó según el protocolo descrito anteriormente (apartado 0). La síntesis del ADNc se realizó a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , usando el RT2 First Strand Kit (SABiosciences) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADNc se diluyó en agua libre de ARN hasta 111  $\mu\text{L}$ , y se mezcló con el RT2 SYBR green/ROX qPCR master mix (SABiosciences). A partir de la mezcla, se adicionaron alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (proveída por el fabricante) previamente cargada con los cebadores específicos del RT2 Profiler PCR Array (SABiosciences, número de catálogo PAHS-003 C). Las amplificaciones se realizaron en el sistema ABI 7900HT FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las condiciones para la amplificación fueron de 10 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

El análisis de los datos obtenidos en estos experimentos se realizó por el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , usando la herramienta de análisis online <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>, facilitada por el proveedor del kit (SABiosciences).

Refseq	Símbolo	Descripción
<b>Estrés metabólico</b>		
NM_000499	CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
NM_000773	CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
NM_000780	CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
NM_001979	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
NM_002021	FMO1	Flavin containing monooxygenase 1
NM_001461	FMO5	Flavin containing monooxygenase 5
NM_000849	GSTM3	Glutathione S-transferase mu 3 (brain)
NM_000941	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase
<b>Estrés oxidativo</b>		
NM_001752	CAT	Catalase
NM_001885	CRYAB	Crystallin, alpha B
NM_000581	GPX1	Glutathione peroxidase 1
NM_000637	GSR	Glutathione reductase
NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
NM_005953	MT2A	Metallothionein 2A
NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin 1
NM_005809	PRDX2	Peroxiredoxin 2
NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
NM_000454	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble
NM_000636	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
<b>Choque térmico</b>		
NM_001539	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
NM_007034	DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
NM_005526	HSF1	Heat shock transcription factor 1
NM_005345	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A
NM_005527	HSPA1L	Heat shock 70kDa protein 1-like
NM_021979	HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2
NM_002154	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4
NM_005347	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
NM_002155	HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')
NM_006597	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8
NM_001540	HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1
NM_001040141	HSP90AA2	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2
NM_007355	HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
NM_002156	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin 60)
NM_002157	HSPE1	Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)
NM_006644	HSPH1	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

<b>Proliferacion y Carcinogénesis</b>		
NM_005190	CCNC	<i>Cyclin C</i>
NM_053056	CCND1	<i>Cyclin D1</i>
NM_004060	CCNG1	<i>Cyclin G1</i>
NM_005225	E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
NM_001964	EGR1	<i>Early growth response 1</i>
NM_182649	PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
<b>Detención del crecimiento y senescencia</b>		
NM_000389	CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
NM_004083	DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
NM_001924	GADD45A	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
NM_004864	GDF15	<i>Growth differentiation factor 15</i>
NM_002178	IGFBP6	<i>Insulin-like growth factor binding protein 6</i>
NM_002392	MDM2	<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>
NM_000546	TP53	<i>Tumor protein p53</i>
<b>Inflamación</b>		
NM_002989	CCL21	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
NM_002983	CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
NM_002984	CCL4	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
NM_000758	CSF2	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>
NM_001565	CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
NM_001562	IL18	<i>Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i>
NM_000575	IL1A	<i>Interleukin 1, alpha</i>
NM_000576	IL1B	<i>Interleukin 1, beta</i>
NM_000600	IL6	<i>Interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>
NM_000595	LTA	<i>Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>
NM_002415	MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)</i>
NM_003998	NFKB1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NM_000625	NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>
NM_000602	SERPINE1	<i>Serpin peptidase inhibitor (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>
<b>Necrosis o apoptosis (Daño y reparación del ADN)</b>		
NM_000051	ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
NM_007194	CHEK2	<i>CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)</i>
NM_001923	DDB1	<i>Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa</i>
NM_001983	ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
NM_000122	ERCC3	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)</i>
NM_005053	RAD23A	<i>RAD23 homolog A (S. cerevisiae)</i>
NM_005732	RAD50	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae)</i>
NM_007120	UGT1A4	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A4</i>

NM_003362	<i>UNG</i>	<i>Uracil-DNA glycosylase</i>
NM_006297	<i>XRCC1</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>
NM_005431	<i>XRCC2</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2</i>
<b>Necrosis o apoptosis ( Señalización de apoptosis)</b>		
NM_001154	<i>ANXA5</i>	<i>Annexin A5</i>
NM_004324	<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>
NM_138578	<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2-like 1</i>
NM_033292	<i>CASP1</i>	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)</i>
NM_001230	<i>CASP10</i>	<i>Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
NM_001228	<i>CASP8</i>	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
NM_000639	<i>FASLG</i>	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
NM_020529	<i>NFKBIA</i>	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
NM_000594	<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>
NM_001065	<i>TNFRSF1A</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>
NM_003810	<i>TNFSF10</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>
<b>Genes control</b>		
NM_004048	<i>B2M</i>	<i>Beta-2-microglobulin</i>
NM_000194	<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
NM_012423	<i>RPL13A</i>	<i>Ribosomal protein L13a</i>
NM_002046	<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
NM_001101	<i>ACTB</i>	<i>Actin, beta</i>

Tabla III.3. Genes contenidos en la micromatriz de mRNA RT2Profiler™ PCR Array: Human Stress and ToxicityFinder™.

La micromatriz se validó para los genes de interés realizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y WB en células Hep3B y hepatocitos primarios. Para la validación por RT-PCR, se utilizó el mRNA obtenido de células tratadas en las mismas condiciones que para los experimentos de la micromatriz. El aislamiento de ARN y la síntesis de ADNc se efectuaron según los protocolos anteriormente descritos y las reacciones de PCR como se mencionó en el apartado 0. Para la amplificación, las muestras se sometieron a 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguidos de 35 ciclos bajo las condiciones adecuadas para cada par de cebadores específicos (Tabla III.4.) y 10 minutos de desnaturalización. *CYPB* se usó como gen control. La cuantificación de los

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

resultados se realizó según lo descrito en el apartado 0. Los cebadores específicos para los genes validados (*ATM*, *CXCL10*, *MT2A*, *HSPA6*, *SERPINE1*, *EGR1*) se obtuvieron de SABiosciences y sus características se muestran en la Tabla III.4. La validación por WB de las proteínas *MT2A* y *HSPA6* se realizó como se describe en el apartado 0 con extractos proteicos totales.

Gen	No. Catálogo	Posición de referencia	Condiciones de la PCR		Tamaño fragmento (pb)
			T° de hibridación	No. de ciclos	
<i>ATM</i> (NM_000051.3)	PPH00325B	10865	55	35	161
<i>CXCL10</i> (NM_001565.2)	PPH00765E	765	55	35	111
<i>MT2A</i> (NM_005953.3)	PPH01518B	352	55	35	83
<i>HSPA6</i> (NM_002155.3)	PPH01192E	2552	57	35	167
<i>SERPINE1</i> (NM_000602.2)	PPH00215E	2658	55	35	96
<i>EGR1</i> (NM_001964.2)	PPH00139A	1049	55	35	178

Tabla III.4. Cebadores y condiciones de la PCR, empleados en la validación por RT-PCR de la micromatriz.

#### 14. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El número de réplicas utilizado en cada parámetro se indica en los pies de figura.



Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad (GraphPad Software V3.02, La Jolla, Ca, EE.UU.). Los análisis estadísticos se realizaron con el test de la T de Student o con un análisis de la varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (test de Newman-Keuls), en cada pie de figura se indica al tipo de análisis realizado. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos si  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) o  $P < 0,001$  (\*\*\*). En muchos casos los datos se representan como porcentaje del control, siendo considerado el control negativo (el valor obtenido en las células sin tratamiento) como 100%.



## **IV. RESULTADOS**



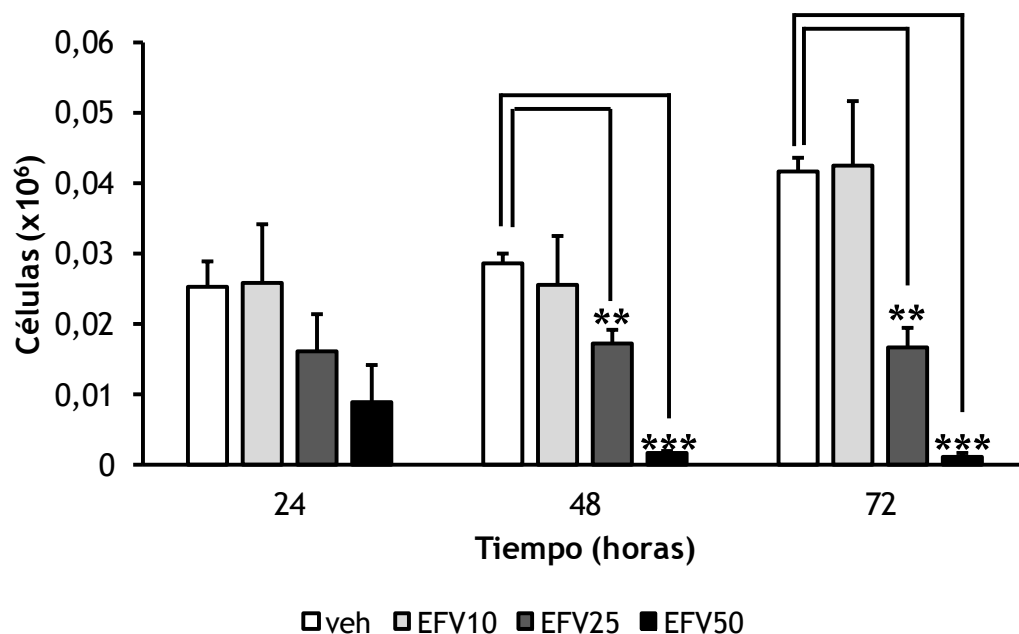
## **BLOQUE 1: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR AL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ**

### **1. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ REDUCE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD, Y ADEMÁS ALTERA EL CICLO CELULAR**

#### **1.1. Análisis de la proliferación celular**

En este experimento se evaluó la respuesta de la proliferación de las células Hep3B al tratamiento con tres concentraciones de EFV (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante 3 días. Durante este periodo de tiempo no se detectaron diferencias significativas en la proliferación de las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, las células tratadas con 25  $\mu\text{M}$  presentaron disminución en la proliferación a las 24 h de tratamiento aunque sin llegar a ser significativa; esta disminución se mantuvo y alcanzó significatividad estadística durante los periodos de tratamiento de 48 y 72 h (Fig. IV.1 A). La concentración de EFV 50  $\mu\text{M}$  resultó ser citotóxica, ya que la mayoría de las células no sobrevivieron al tratamiento. Después de 24 h de tratamiento, la disminución del número de células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  fue sustancial (más del 50%) y fue significativa después del tratamiento de 48 y 72 h. La Fig. IV.1 B muestra imágenes representativas de células Hep3B en un microscopio óptico invertido después del tratamiento con las tres concentraciones de EFV durante 24 h; en estas imágenes es muy notoria no solo la disminución en la proliferación de las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  sino también la presencia de cambios morfológicos indicativos de estrés celular.

**A**



**B**

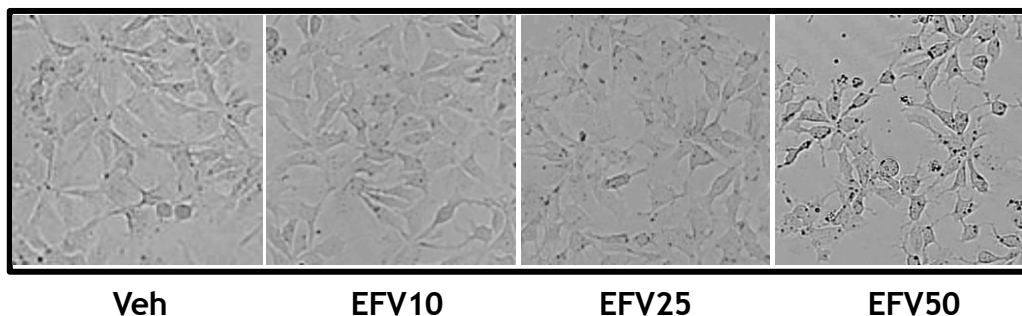


Figura IV.1. Efecto del tratamiento de EFV sobre la proliferación de células Hep3B. (A) Conteo de células durante tres días usando un hematocitómetro. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-6). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo. (B) Imágenes representativas de un cultivo celular tratado con EFV durante 24 h tomadas en un microscopio óptico invertido con un objetivo 10X.

## 1.2. Análisis de la viabilidad celular

Los resultados del ensayo de MTT (Fig. IV.2.) confirmaron el efecto inhibitorio del tratamiento de 24 h con EFV 50  $\mu\text{M}$  y sugieren una disminución en la función mitocondrial. Para determinar si este efecto inhibitorio es específico de un tipo celular, también se estudió la viabilidad en otros dos tipos celulares (HeLa y HUVEC) y se encontró una inhibición aún más severa, alcanzando niveles estadísticamente significativos en los dos tipos celulares a 24 h de tratamiento con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$ .

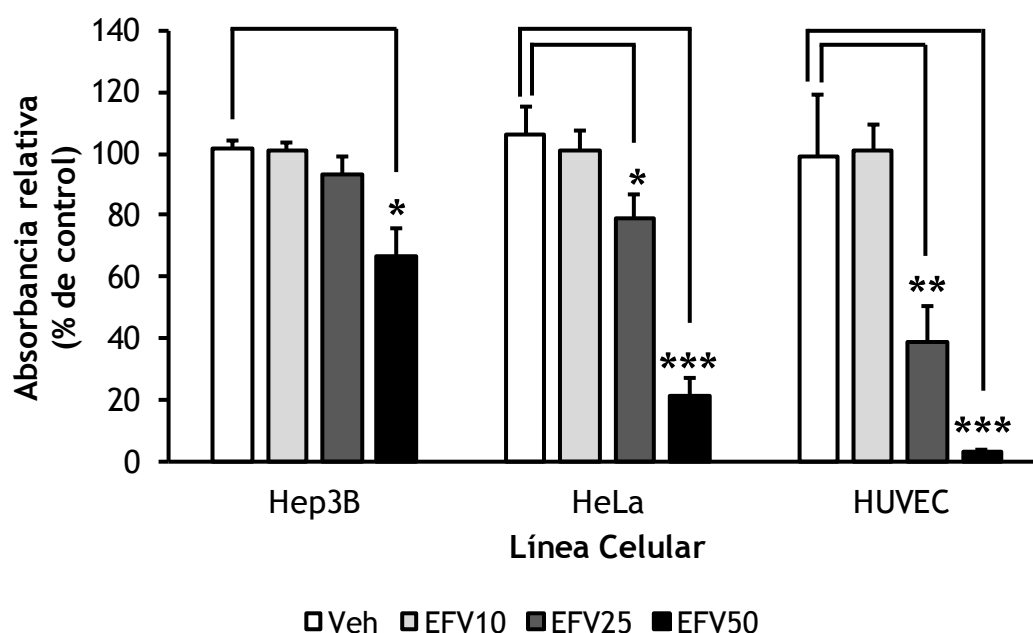


Figura IV.2. Efecto del tratamiento de EFV sobre la viabilidad celular de las líneas celulares Hep3B, HeLa y HUVEC medida por el ensayo del MTT después de 24 h de tratamiento. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=6-9). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

### **1.3. Análisis del ciclo celular**

Al analizar el ciclo celular en células Hep3B tratadas con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  durante 24 h, no se detectaron cambios significativos con respecto al control; pero al evaluar las que fueron tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  se encontró un incremento significativo en la población SubG1 así como un menor porcentaje de células en fase G1 y un incremento en la subpoblación G2M (Fig. IV.3 A y IV.3 B). El incremento en G2M puede apuntar a una detención del ciclo celular y el de SubG1 suele ser una característica indicativa de apoptosis.

## **2. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ PRODUCE APOPTOSIS**

Para corroborar los indicios de la inducción de apoptosis por EFV en este modelo, se hizo un análisis bivariado de Anexina V/IP de células Hep3B en crecimiento exponencial tratadas con EFV durante 24 h. El experimento se realizó por microscopia de fluorescencia (citometría estática) evaluando cuatro subpoblaciones celulares: población vital (Anexina V<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>), población apoptótica (Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>), población con apoptosis tardía o necrosis (Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>) y población de células dañadas (Anexina V<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>). El citograma (Fig. IV.4 A) muestra un experimento representativo en el cual las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  presentan rasgos apoptóticos: 9,3% de las células fueron Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> en comparación con solo el 0,5% presentes en el control negativo y el 29,2% del control positivo (células tratadas con STS 1  $\mu\text{M}$ ). La Fig. IV.4 B muestra imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de núcleos marcados con Hoechst 33342 en células Hep3B expuestas al tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$ , que exhibieron rasgos típicamente apoptóticos tales como la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. La cuantificación de la intensidad media de la fluorescencia de Hoechst 33342 en



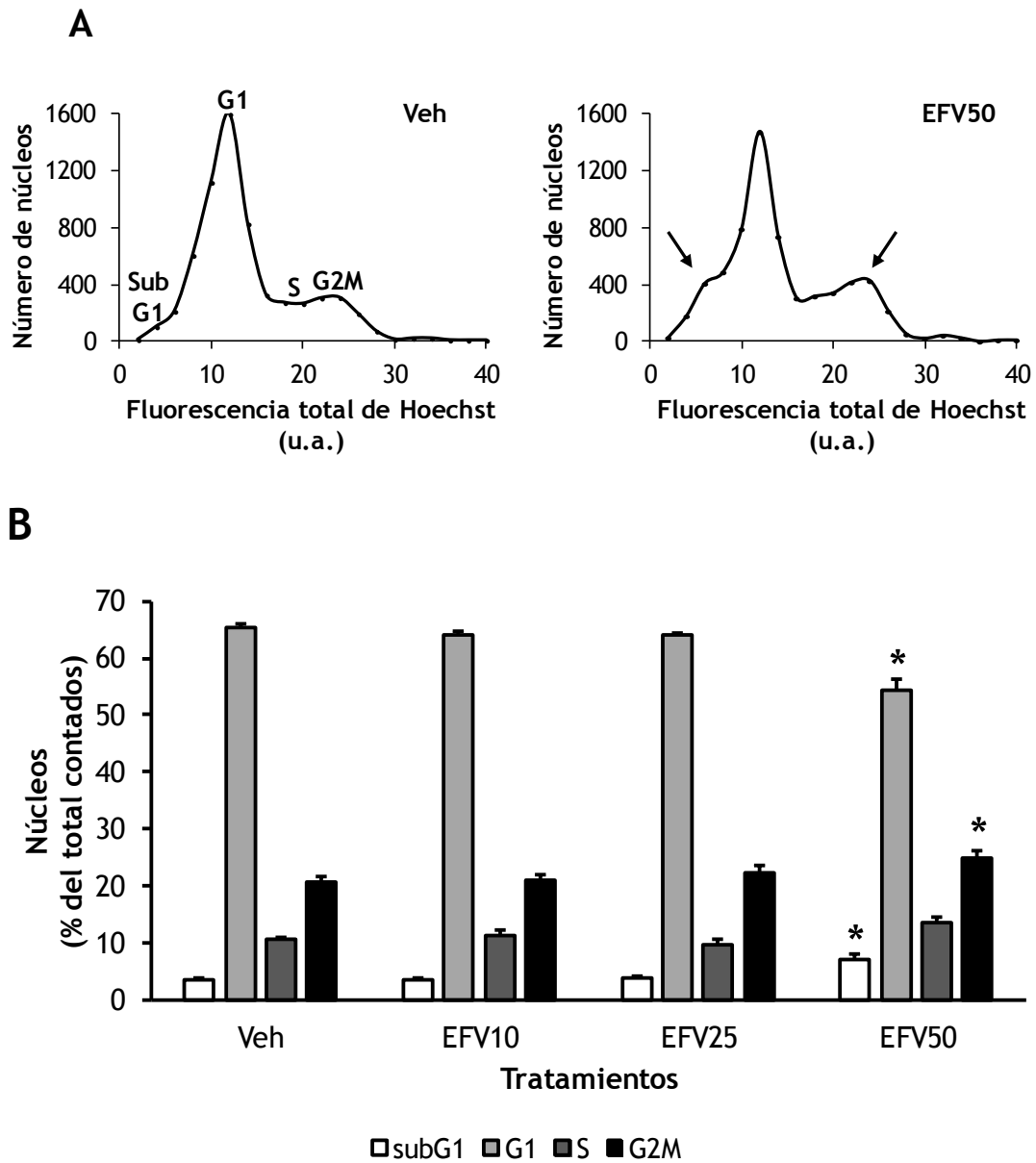


Figura IV.3. Análisis del ciclo celular por citometría estática (Fluorescencia de Hoechst 33342) en células Hep3B tratadas con EFV durante 24 h. (A) citograma representativo. (B) Histograma resumen. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=9-13). \*P<0,05 respecto al vehículo.

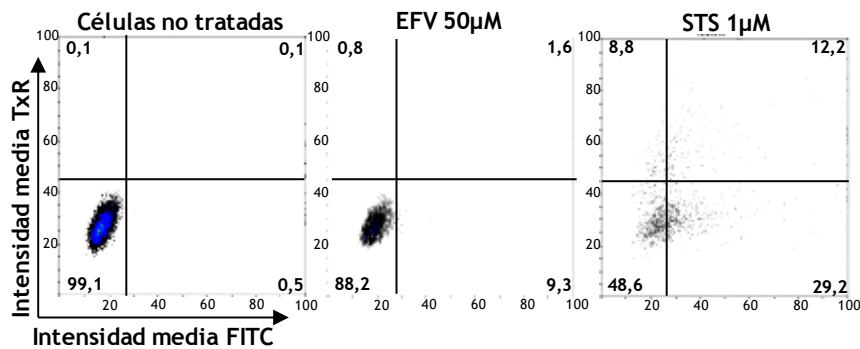
### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

cada núcleo muestra un incremento consistente, paralelo a una disminución del área nuclear, siendo ambos rasgos indicadores de condensación de cromatina. Aunque se observó una tendencia, los cambios en el análisis bivariado de Anexina V/IP y la intensidad de la fluorescencia de Hoechst 33342 en células tratadas con concentraciones más bajas de EFV (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) no fueron estadísticamente significativos. El área media de los núcleos marcados con Hoechst 33342 de células tratadas con EFV 10  $\mu\text{M}$  fue  $99,52 \pm 0,55\%$ ; este valor disminuyó a  $97,71 \pm 1,39\%$  y  $94,57 \pm 1,11\%$  en las células tratadas con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente, mientras la media de fluorescencia de Hoechst 33342 aumento gradualmente de  $103,23 \pm 1,56\%$  en células tratadas con EFV 10  $\mu\text{M}$  a  $105,97 \pm 1,5\%$  y  $123,82 \pm 3,33\%$  con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente (todos los valores comparados con el valor del control que fue considerado de 100%).

Hay que resaltar que los experimentos de citometría estática confirmaron los efectos deletéreos de EFV 50  $\mu\text{M}$  sobre la proliferación y la viabilidad celular observados con otra técnica y descritos en las Fig. IV.1. y IV.2. Por ejemplo, mediante medición de la fluorescencia de Hoechst 33342, se detectaron 8022 células en 30 campos por pocillo (Fig. IV.4 A) en el control sin tratamiento, 3118 células con el tratamiento de EFV 50  $\mu\text{M}$  y 1576 células con el tratamiento de STS 1  $\mu\text{M}$ .

Otro parámetro relevante en el estudio de la apoptosis, es el análisis de la expresión de cyt c, AIF y Smac/DIABLO, tres proteínas mitocondriales proapoptóticas, que durante la apoptosis se traslocan al citosol (cyt c y Smac/DIABLO) y al núcleo (AIF) (Fig. IV.5.). La incubación de células Hep3B con EFV durante 24 h, produjo una reducción concentración-dependiente en la expresión de estas tres proteínas evaluada por WB en extractos proteicos de fracciones celulares enriquecidas en mitocondrias. La disminución alcanzó significatividad estadística en cyt c y AIF solo para el tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$  y para Smac/DIABLO en los tratamientos con EFV 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ .

A



B

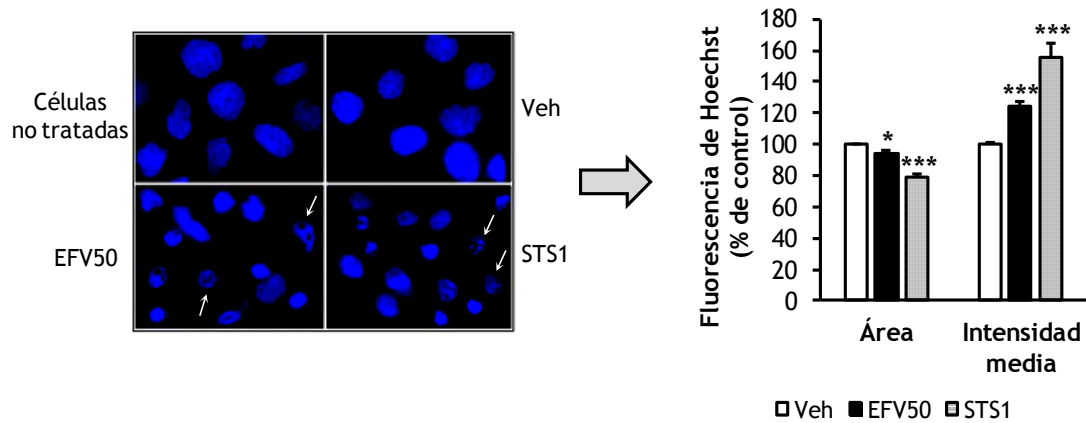


Figura IV.4. Activación de la apoptosis en células Hep3B después de 24 h de tratamiento con EFV. (A) Histograma representativo (Análisis bivariado de Anexina V/IP) de células control no tratadas, células tratadas con EFV 50 µM y STS 1 µM. (B) Morfología de los núcleos teñidos con Hoechst 33342. El panel izquierdo muestra imágenes representativas tomadas en un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 40X. El panel derecho resume los datos de fluorescencia de Hoechst 33342, mostrando el área de los núcleos así como la intensidad media de su fluorescencia. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=6-11). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

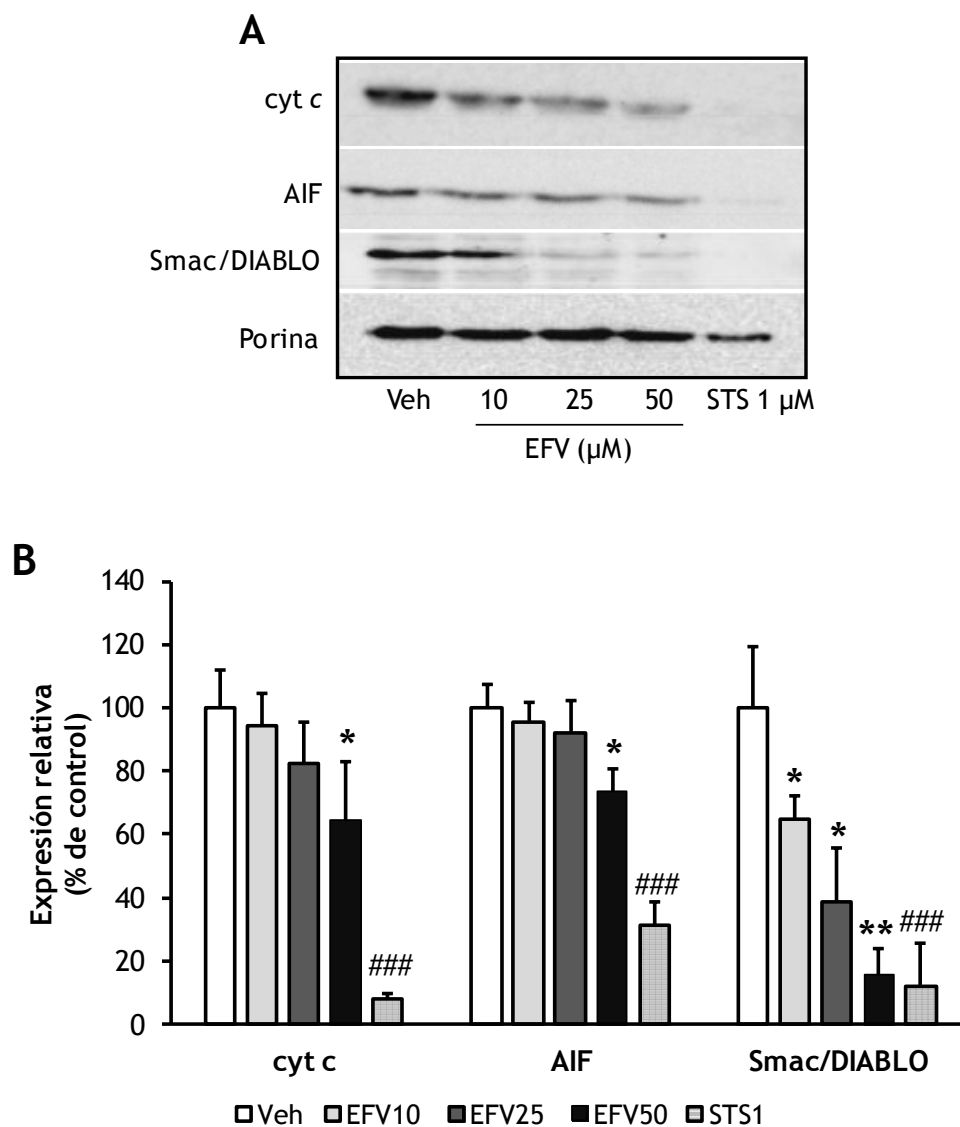


Figura IV.5. Análisis por Western blot de proteínas mitocondriales proapoptóticas, usando extracto celular enriquecido en mitocondrias de células Hep3B tratadas por 24 h. (A) Las imágenes representativas muestran la expresión de Cyt c, AIF y Smac/DIABLO. (B) La gráfica muestra los análisis densitométricos de las imágenes, normalizados frente a la expresión de porina, y expresados como porcentaje del control. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-9). \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente por un test T de Student, ###P<0,001.

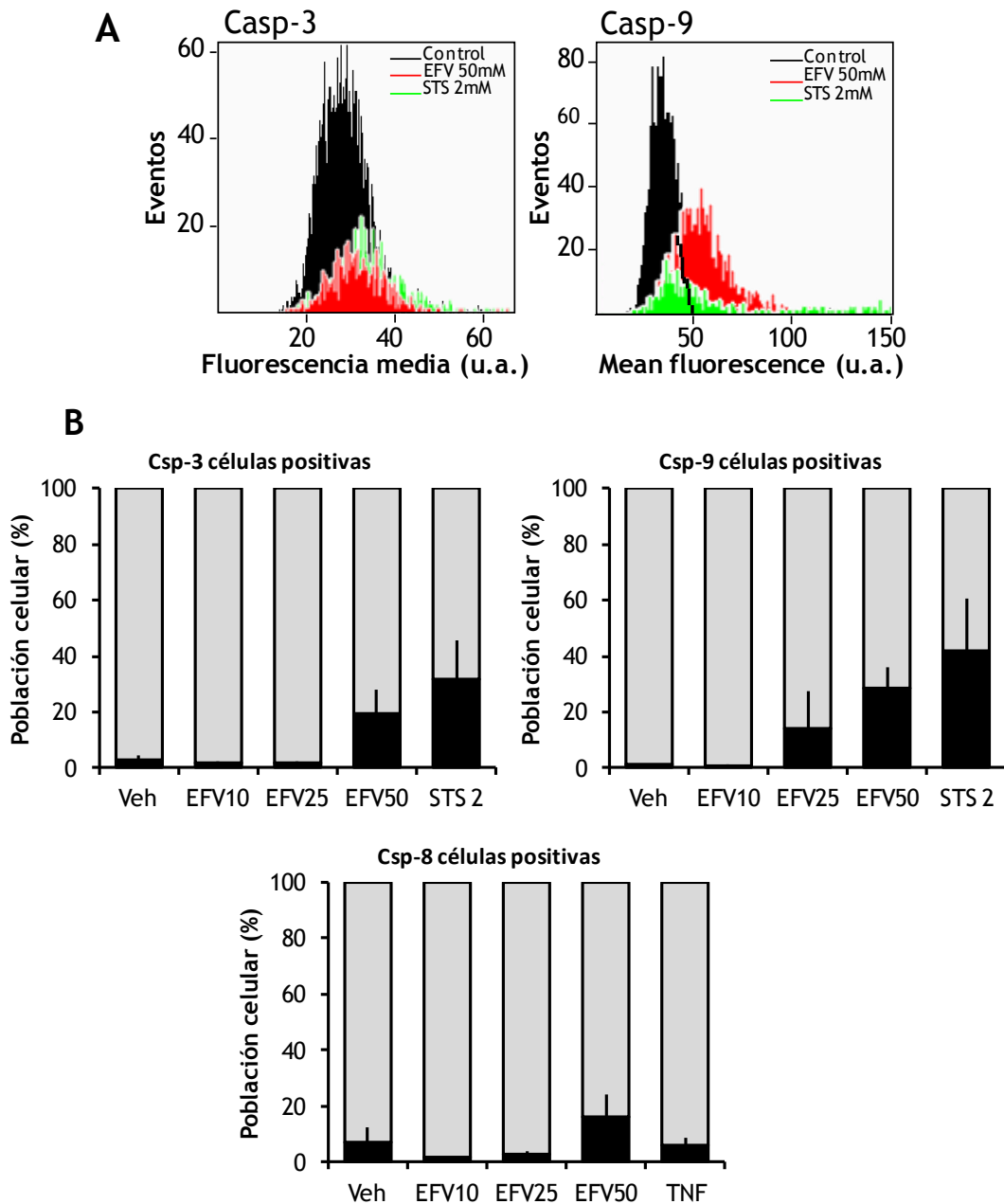


Figura IV.6. Análisis de la activación de las caspasas 3 y 9 por citometría estática en células Hep3B tratadas con EFV por 24 h y usando un tratamiento con 2  $\mu$ M de STS como control. Citogramas representativos (A) muestran la activación de las caspasas 3 y 9 detectadas como fluorescencia media. Los histogramas (B) representan el % de células positivas para las caspasas 3, 8 y 9 del total de la población celular (área oscura). Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-6).

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Una confirmación adicional del efecto proapoptótico de EFV, es proporcionada por el estudio de la activación de las caspasas, proteínas que se emplean como indicadores de apoptosis. La Fig. IV.6 A, muestra un histograma representativo en el que se puede ver como EFV 50  $\mu\text{M}$  indujo la activación de las casp-3 y -9, pero no de la casp-8. Estos hechos apuntan al desencadenamiento de la vía intrínseca de la apoptosis (mitocondrial) pero no de la extrínseca. La Fig. IV.6 B presenta un resumen, mostrando la población celular positiva para las casp-3 y -9 después de 24 h de tratamiento, revelando que el  $19,44 \pm 8,50\%$  de las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  fueron positivas para casp-3, mientras que el  $28,55 \pm 7,41\%$  resultaron ser positivas para casp-9. Es interesante destacar que las células tratadas con EFV 25  $\mu\text{M}$  solo mostraron activación de la casp-9.

## **3. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ COMPROMETE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL**

### **3.1. Determinación de los niveles mitocondriales de superóxido**

Para analizar el potencial mitotóxico de EFV, se evaluó su efecto sobre la producción del ion superóxido mitocondrial usando el fluorocromo MitoSOX que es específico para mitocondria. Se hicieron mediciones por citometría estática tras tres periodos de incubación (1, 6 y 24 h) que mostraron que la incubación de células Hep3B con EFV 50  $\mu\text{M}$  llevó a un incremento significativo en la producción de superóxido mitocondrial, detectado como un incremento en la fluorescencia de MitoSOX (Fig. IV.7 A). Es remarcable el incremento en el superóxido mitocondrial acumulado en el tiempo; en particular a las 6 y 24 h de tratamiento donde los valores obtenidos con EFV 50  $\mu\text{M}$  fueron muy similares a los obtenidos con rotenona, un conocido inductor de la producción de superóxido en el complejo I de la cadena mitocondrial transportadora de electrones. A diferencia de la mayoría de los experimentos previos con

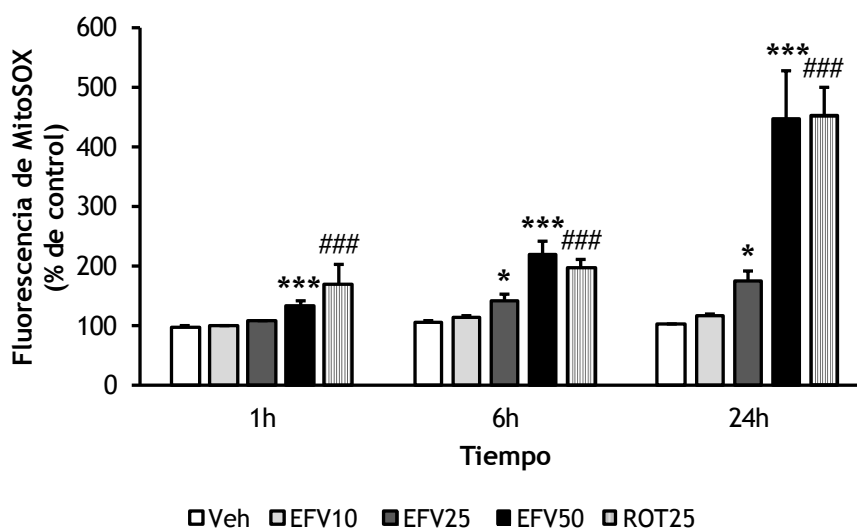
apoptosis, un efecto claro y estadísticamente significativo fue también observado con EFV 25  $\mu\text{M}$ . EFV 10  $\mu\text{M}$  no produjo efecto significativo. Dado que en células vivas la selectividad de pruebas basadas en etidio; tales como MitoSOX para superóxido, son complicadas por los procesos de autooxidación y la oxidación independiente del superóxido, se realizó un experimento adicional para asegurar la especificidad de la señal detectada. La incubación de células Hep3B con 50  $\mu\text{M}$  de FeTCCP, una SOD mimética, previno el incremento de la fluorescencia de MitoSOX inducida por EFV, sugiriendo que el superóxido fue el responsable del incremento en la señal fluorescente. Por otra parte, tomando en consideración recientes evidencias de que el producto de la oxidación de MitoSOX dependiente de superóxido, exhibe una alta selectividad con la excitación a 390 nm, se detectó esta fluorescencia en un fluorímetro de plato multipocillo con una excitación/emisión máxima de 390/530 nm (Fig. IV.7 B) y se confirmó que el incremento de la señal inducida por EFV en células Hep3B después de 24 h de tratamiento fue dependiente de la concentración.

### **3.2. Cuantificación de los niveles intracelulares de glutatión (GSH)**

La cuantificación fluorimétrica con monoclorobimane del contenido celular de GSH, reveló una disminución significativa en el nivel intracelular de GSH después de 4 h de tratamiento con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  en células Hep3B (Fig. IV.8 A). En células HeLa (Fig. IV.8 B) aunque se ve una clara tendencia, solo se observaron diferencias significativas con EFV 50  $\mu\text{M}$ .

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

**A**



**B**

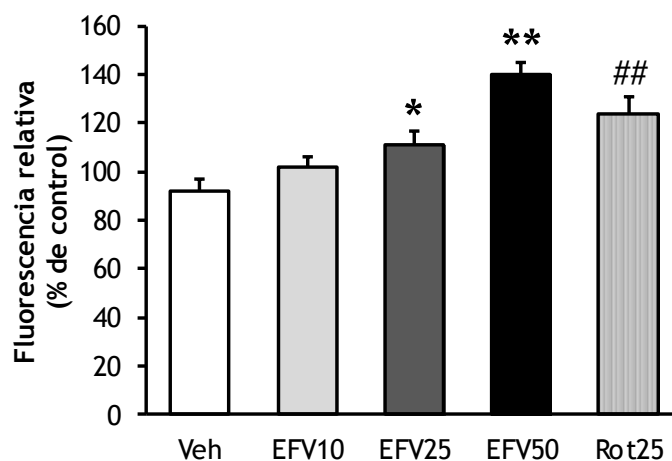


Figura IV.7. Efecto de EFV en la producción de superóxido mitocondrial. (A) Fluorescencia de MitoSOX en células Hep3B tratadas con EFV por 1, 6 y 24 h, usando rotenona 25  $\mu$ M como control positivo las mediciones se hicieron por citometría estática. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=6). (B) El histograma resume datos de fluorescencia de MitoSOX en células Hep3B tratadas con EFV por 24 h, detectado con un fluorometro multipocillo 'Fluoroskan'. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=5). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo. Los datos de rotenona se analizaron de manera independiente frente a su propio vehículo con un test T de Student, ####P<0,001, ##P<0,01.



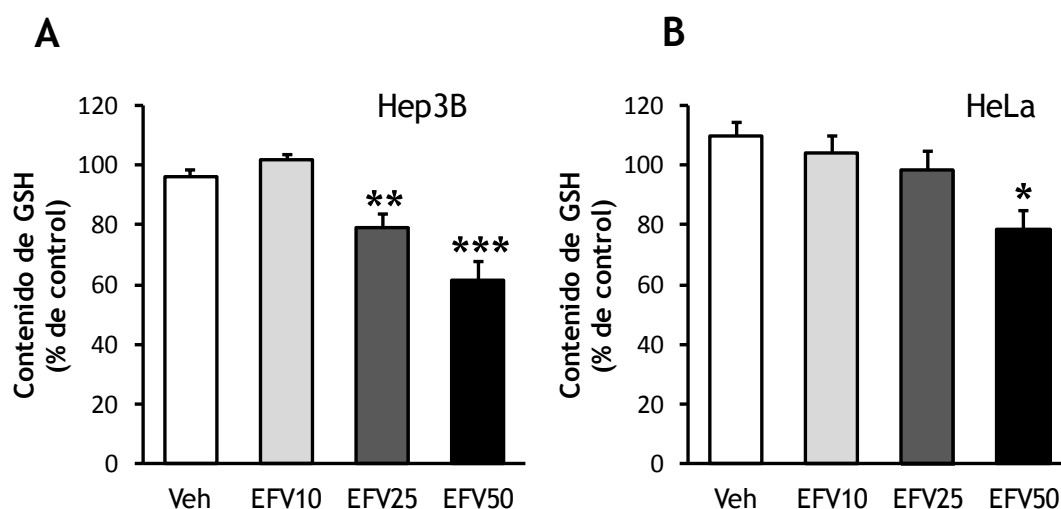


Figura IV.8. Efecto de EFV en los niveles intracelulares de GSH. (A) En células Hep3B, tratadas con EFV durante 4 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=8). (B) En células HeLa, tratadas con EFV durante 4 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=8-9). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

### 3.3. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

Otro parámetro directamente relacionado con la disfunción mitocondrial es el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Mediciones por citometría estática, usando la sonda fluorescente TMRM en células Hep3B y en células HeLa, tratadas con EFV durante 1 h revelaron una disminución significativa para los tratamientos con EFV 25 y 50  $\mu$ M en el caso de Hep3B y para los tratamientos con EFV 10, 25 y 50  $\mu$ M en el caso de HeLa (Fig. IV.9 A y IV.9 B). Una disminución similar se observó a 6 y 24 h de tratamiento.

## Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

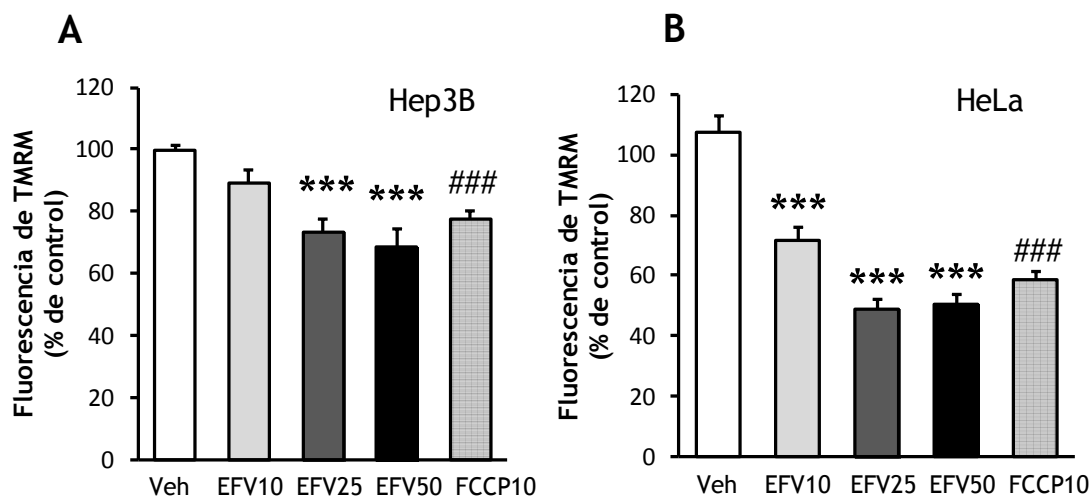


Figura IV.9. Efecto de EFV en el potencial de membrana mitocondrial. (A) En células Hep3B, tratadas con EFV durante 1 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=11). (B) En células HeLa, tratadas con EFV durante 1 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=7). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo. Los datos de FCCP se analizaron de manera independiente frente a su propio vehículo con un test T de Student, ###P<0,001.

### 3.4. Evaluación de la producción de superóxido mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial en hepatocitos primarios humanos

El efecto mitotóxico de EFV fue reproducido en hepatocitos humanos primarios, los cuales exhibieron un incremento concentración-dependiente en la producción de superóxido mitocondrial y una disminución significativa en el  $\Delta\psi_m$  después de 1 h de incubación con EFV (Fig. IV.10.). Es de resaltar que estas células fueron más sensibles al tratamiento con EFV que las líneas inmortales bajo las mismas condiciones y los efectos observados fueron detectados con menores concentraciones del fármaco. En particular, se observó una disminución significativa en  $\Delta\psi_m$  con EFV 10  $\mu$ M, sin embargo esta

concentración no provocó un cambio significativo en el mismo parámetro en células Hep3B.

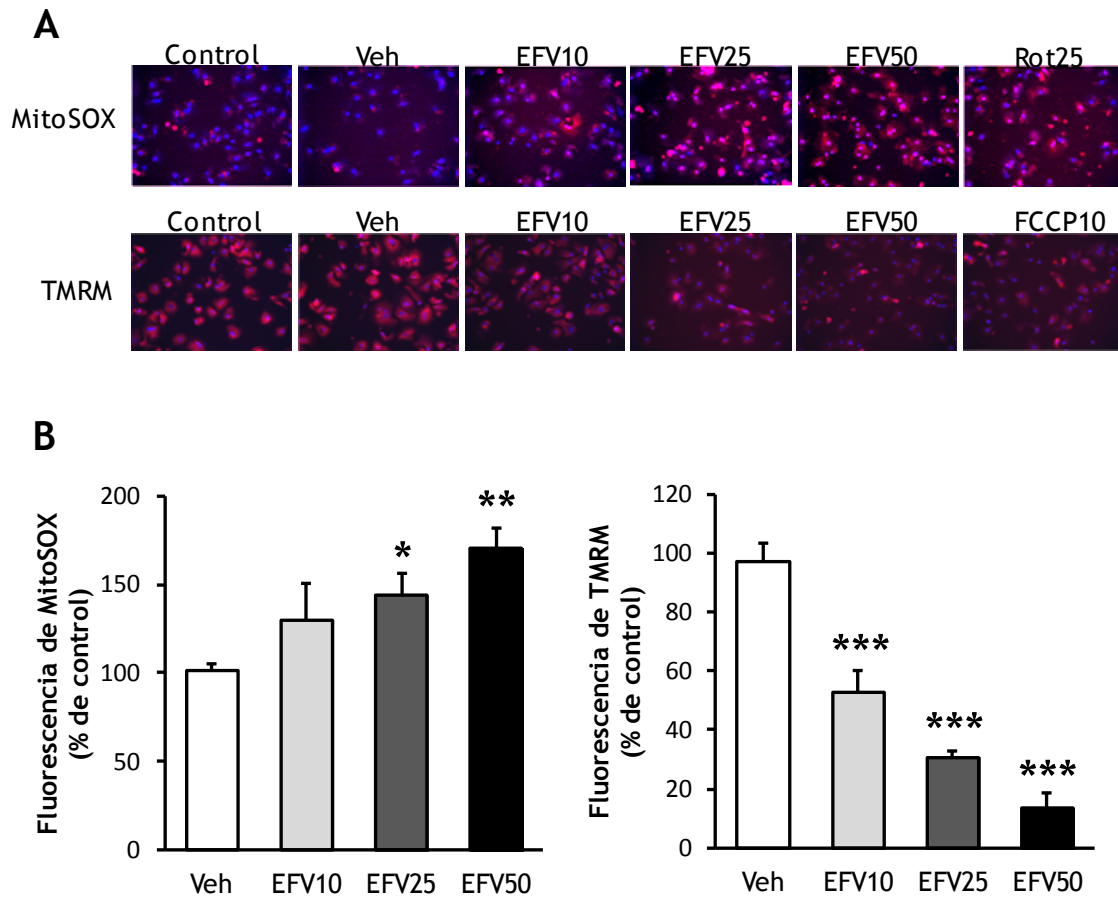


Figura IV.10. Efecto del tratamiento con EFV (1 h) sobre el potencial de membrana y la producción de superóxido mitocondrial en hepatocitos primarios humanos. Se usaron rotenona 25  $\mu$ M o FCCP 10  $\mu$ M como controles positivos. (A) Imágenes representativas de la producción de superóxido mitocondrial, detectado como fluorescencia de MitoSOX (Panel superior: Fluorescencia de MitoSOX en rojo, núcleos marcados con Hoechst 33342 en azul), y  $\Delta\psi_m$ , detectado como fluorescencia de TMRM (Panel inferior: Fluorescencia de TMRM en rojo, núcleos marcados con Hoechst 33342 en azul). (B) Los histogramas muestran la sumatoria de la fluorescencia de MitoSOX (panel izquierdo) y la de TMRM (panel derecho). Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-6). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

### 3.5. Reversibilidad de la producción de superóxido mitocondrial y la reducción del potencial de membrana mitocondrial

Los cambios mitocondriales provocados por el tratamiento de las células Hep3B con EFV durante 1 h, resultaron ser reversibles. Después de la retirada del fármaco se observó una rápida recuperación (1 h) tanto de los niveles de superóxido mitocondrial como de  $\Delta\psi_m$  hasta unos niveles similares a los observados en el control sin tratar (Fig. IV.11.).

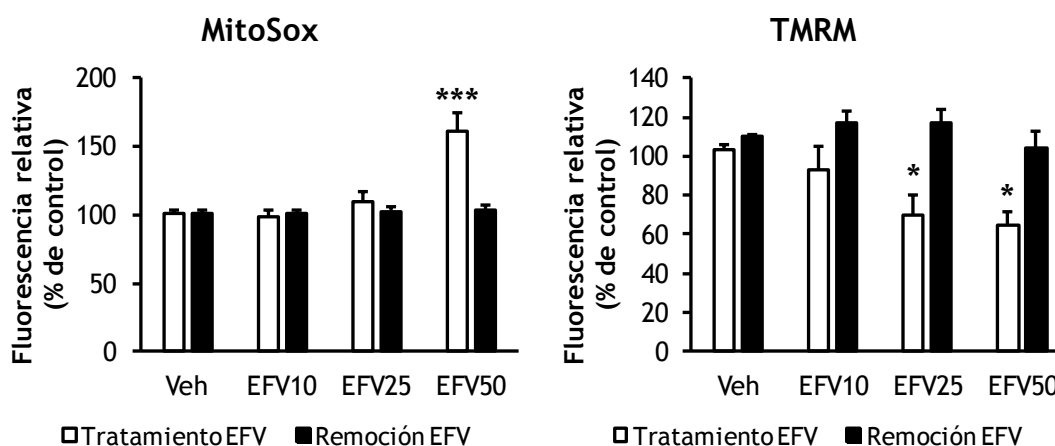


Figura IV.11. Efecto de la remoción de EFV sobre la función mitocondrial de células Hep3B. Los histogramas resumen los datos de la fluorescencia media de MitoSOX y TMRM en células tratadas con EFV durante 1 h y en células a las cuales se les removió el tratamiento con EFV. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-6). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

## 4. EL TRATAMIENTO CON EFAVIRENZ INDUCE UN INCREMENTO EN LA MASA MITOCONDRIAL.

### 4.1. Evaluación de la señal y la masa mitocondrial

En células tratadas con EFV 50  $\mu$ M, se evaluó la señal mitocondrial con la sonda fluorescente NAO, un fluorocromo específico para cardiolipina. En las Figuras IV.12 A y IV.12 B, llama la atención las imágenes de la red mitocondrial, que en las células tratadas con vehículo, se encontraba repartida por todo el citoplasma mientras que en las tratadas con EFV 50  $\mu$ M era más compacta y perdía su estructura de red, además la señal era más intensa. Estos cambios morfológicos también se pudieron apreciar en hepatocitos primarios (Fig. IV.18 B). La cuantificación de esta señal a diferentes tiempos de tratamiento (1, 6 y 24 h) mostró un incremento de la masa mitocondrial con EFV 50  $\mu$ M, que fue estadísticamente significativo después de 6 y 24 h de tratamiento (Fig. IV.12 C).

### 4.2. Reversión del efecto de efavirenz sobre la proliferación y la masa mitocondrial

La Fig. IV.13 muestra los resultados obtenidos con experimentos de citometría estática en células Hep3B tratadas con EFV 50  $\mu$ M durante 24 h en presencia de 0,5 mM de Trolox. El citograma de un experimento representativo (Fig. IV.13 A) muestra como el tratamiento con Trolox lleva a una recuperación parcial del número de células y revierte parcialmente el incremento en la condensación de la cromatina determinada con Hoechst 33342 (Canal DAPI, panel izquierdo) y el incremento de la masa mitocondrial detectada con NAO (Canal FITC, panel derecho) inducido por el tratamiento con EFV. La Fig. IV.13 B presenta un resumen del efecto de Trolox 0,5 mM sobre la supervivencia celular.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

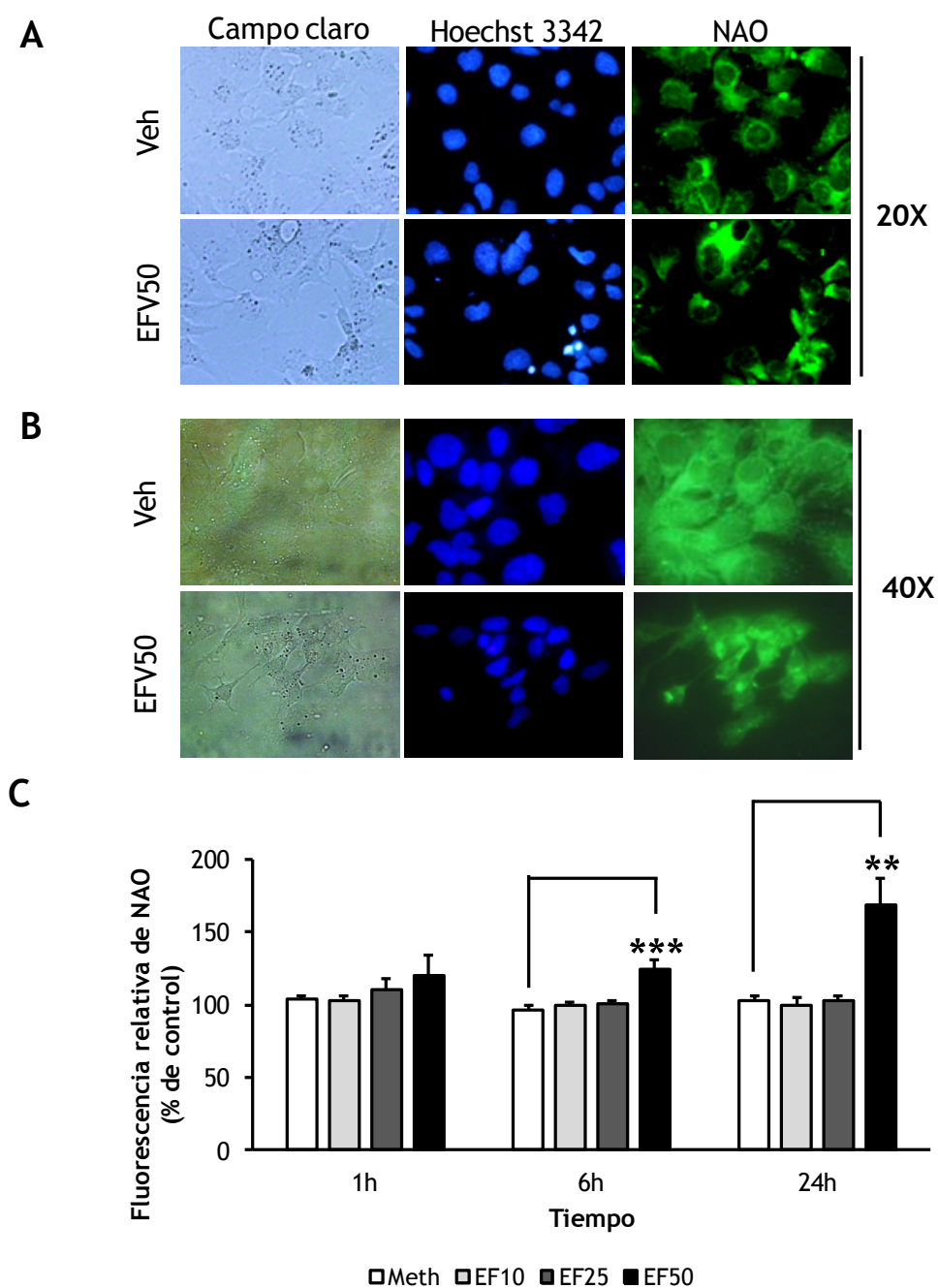


Figura IV.12. Masa mitocondrial en células tratadas con EFV. Imágenes de microscopía de fluorescencia 20X (A) y 40X (B) de células Hep3B tratadas durante 6 h con EFV 50  $\mu$ M, mostrando núcleos (azul, marcados con Hoechst 33342) y mitocondrias (verde, marcadas con NAO). (C) El histograma resume la fluorescencia de NAO. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=5-9). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

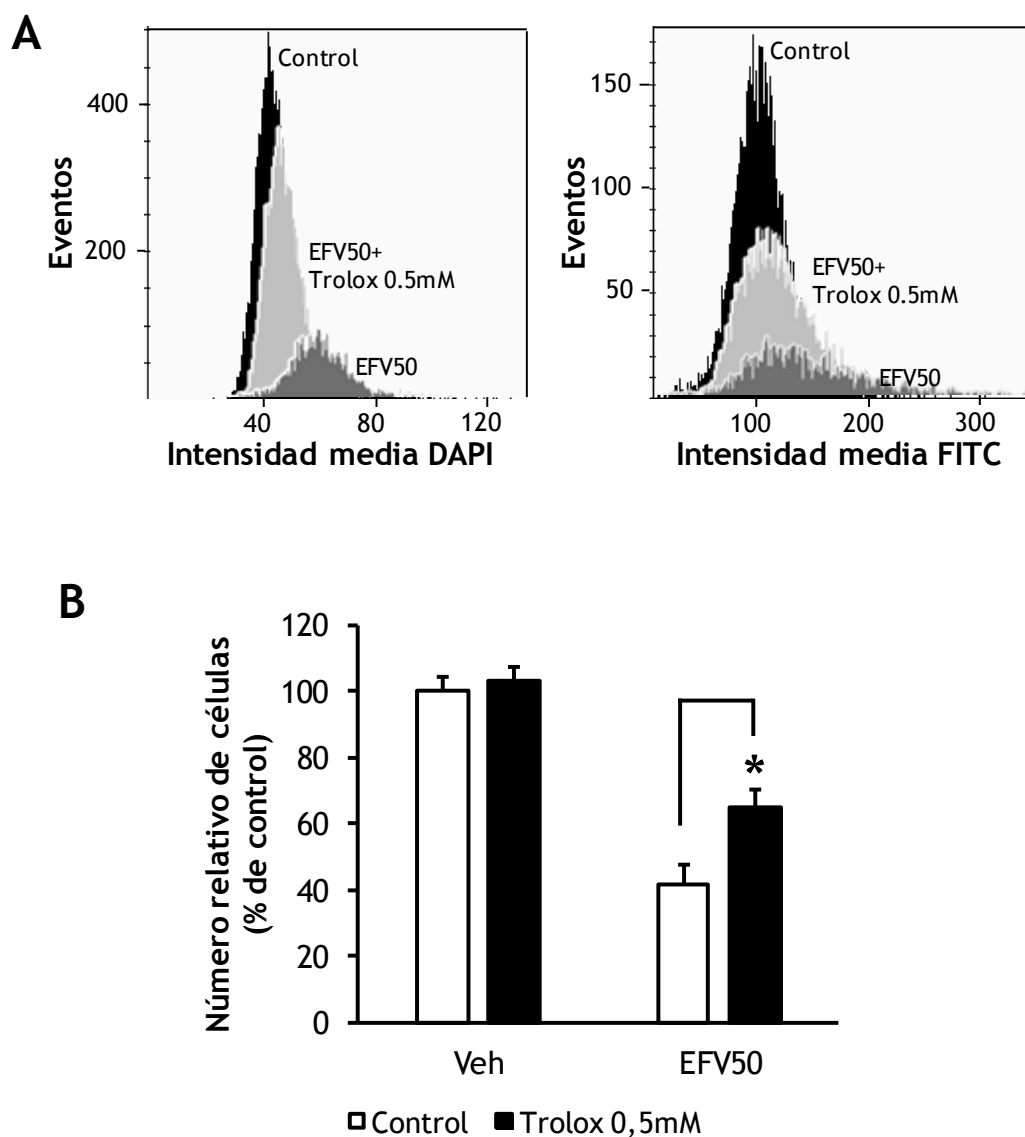


Figura IV.13. Efecto del antioxidante Trolox sobre células Hep3B tratadas con EFV. (A) Citogramas representativos de células control sin tratar, tratadas con EFV 50  $\mu$ M y tratadas con EFV 50  $\mu$ M + 0,5 mM de Trolox muestran la fluorescencia media de Hoechst 33342 (DAPI) y la fluorescencia media de NAO (FITC). (B) Histograma de número de células analizadas por citometría estática. Los datos fueron analizados con un test T de Student, \*P<0,05 con respecto al vehículo.

#### **4.3. Evaluación del contenido proteico mitocondrial**

Para confirmar el incremento de la masa mitocondrial producida por el tratamiento con EFV observada con NAO, se evaluó el contenido total de proteínas mitocondriales. La Fig. IV.14. muestra el efecto de EFV a 8 y 24 h de tratamiento sobre la expresión de varias proteínas mitocondriales evaluadas por WB usando extractos proteicos totales. Aunque una tendencia similar fue observada en ambos periodos de incubación, se encontraron cambios más grandes después de 24 h de tratamiento. Estos resultados sugieren un incremento dependiente de la concentración en el contenido celular de porina, CV subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , cyt c, y AIF. El CIV subunidad II (COX II), una proteína codificada por el ADN mitocondrial, fue ligeramente pero no significativamente incrementada por EFV 50  $\mu$ M. Cabe resaltar que EFV 50  $\mu$ M produjo una mayor disminución en la expresión de la proteína de las tres subunidades estudiadas del CI, CI 17, 20 y 39 kDa, apuntando así a un posible defecto en la biogénesis del complejo I.

#### **4.4. Determinación de la cantidad de ADN mitocondrial**

Después de haber detectado un incremento en la masa mitocondrial y un aumento general en el contenido de la proteína mitocondrial, se evaluó el proceso de biogénesis mitocondrial a través del análisis del número relativo de copias de mtADN (Fig. IV.15.). Se trataron células Hep3B con EFV durante 8 y 24 h y por PCR en tiempo real, se cuantificó el número de copias de mtADN, normalizado con respecto al nADN. No se presentaron cambios con ninguna concentración ni tiempo evaluado cuando se compararon las células tratadas con EFV con las tratadas con vehículo.



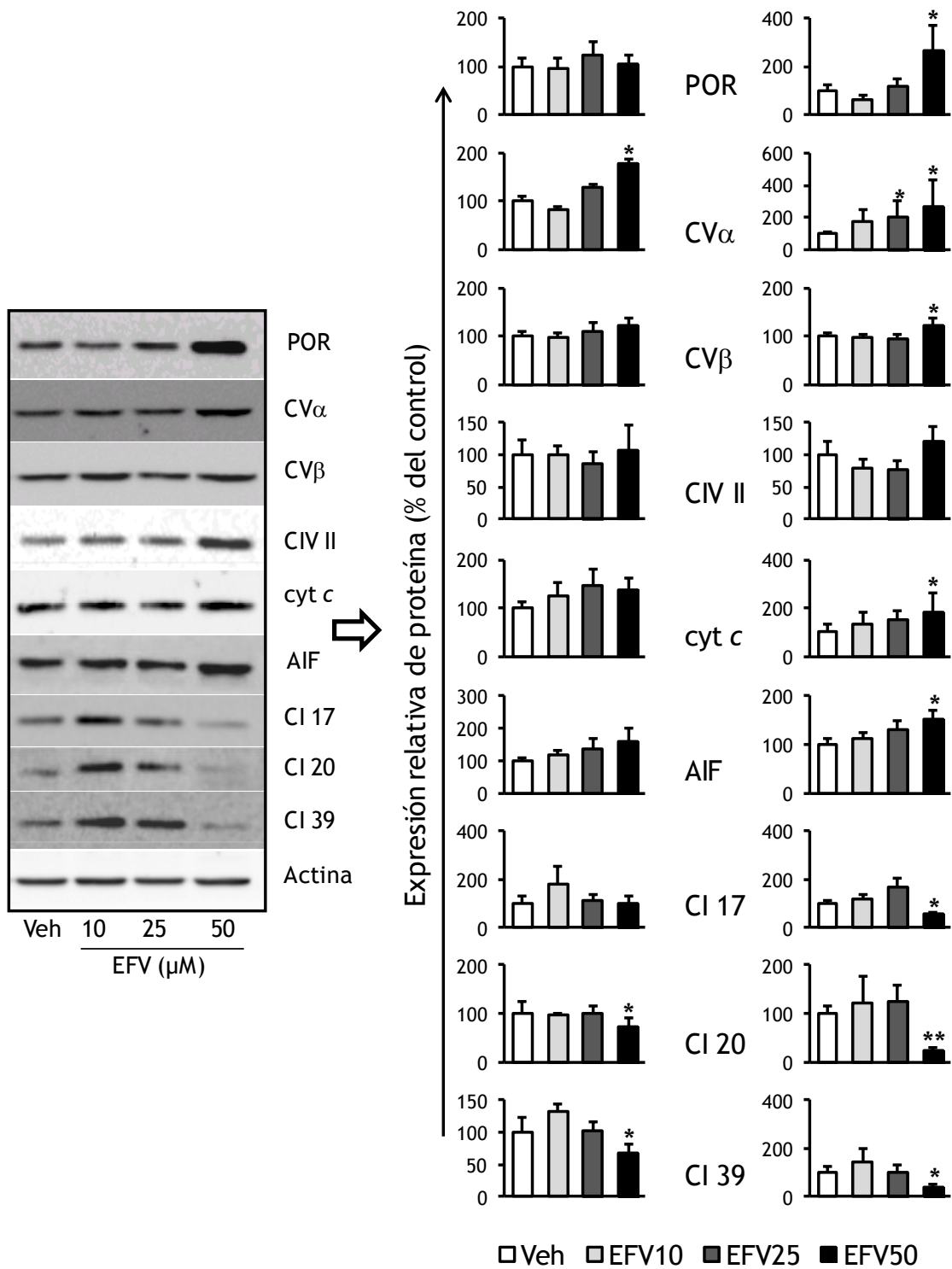


Figura IV.14. Efecto del tratamiento de EFV sobre la expresión de proteínas mitocondriales. Células Hep3B fueron tratadas con EFV durante 8 y 24 h, se muestran imágenes representativas de WB (24 h) e histogramas representando la cuantificación de

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

la expresión de varias proteínas (8 y 24 h). Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-7). \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo

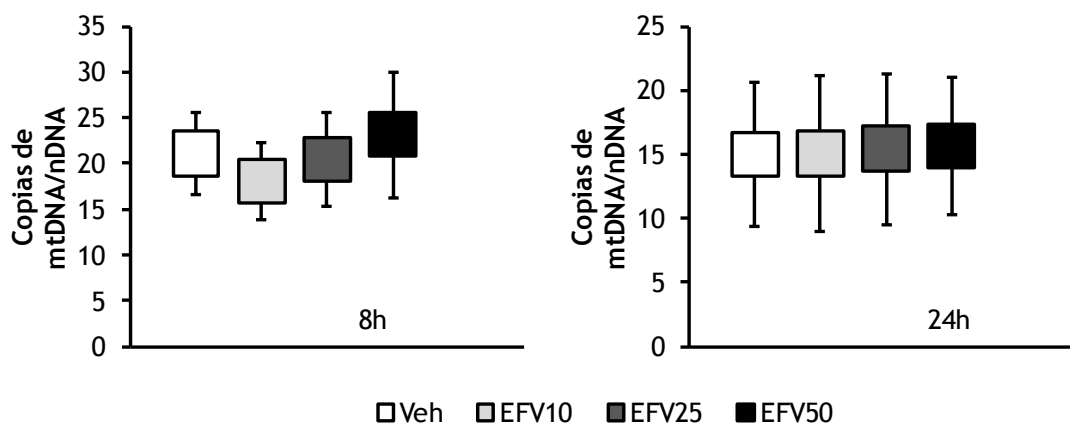


Figura IV.15. Cuantificación del ratio relativo de mtDNA/nDNA por PCR cuantitativa genómica, los datos son expresados como  $\pm$  SEM, n=3-7.

#### 4.5. Cuantificación de la masa mitocondrial a través de la expresión de la proteína mtdsRED

Para profundizar en el análisis del incremento de la masa mitocondrial promovida por el tratamiento con EFV se usaron células HeLa establemente transfectadas que expresaban la proteína mtdsRed. Se trataron con EFV 10, 25 y 50  $\mu$ M por periodos de 1, 6, 24 y 48 h. La cuantificación de la señal roja mitocondrial usando citometría estática reveló un incremento dependiente de la concentración en la masa mitocondrial relativa (Fig. IV.16.) que fue estadísticamente significativo a las 6 h de tratamiento con EFV 50  $\mu$ M. A las 24 h de tratamiento, EFV 25  $\mu$ M también alcanzó significatividad estadística. A las 48 h de tratamiento, los valores medios de fluorescencia roja no diferían de los alcanzados a las 24 h.

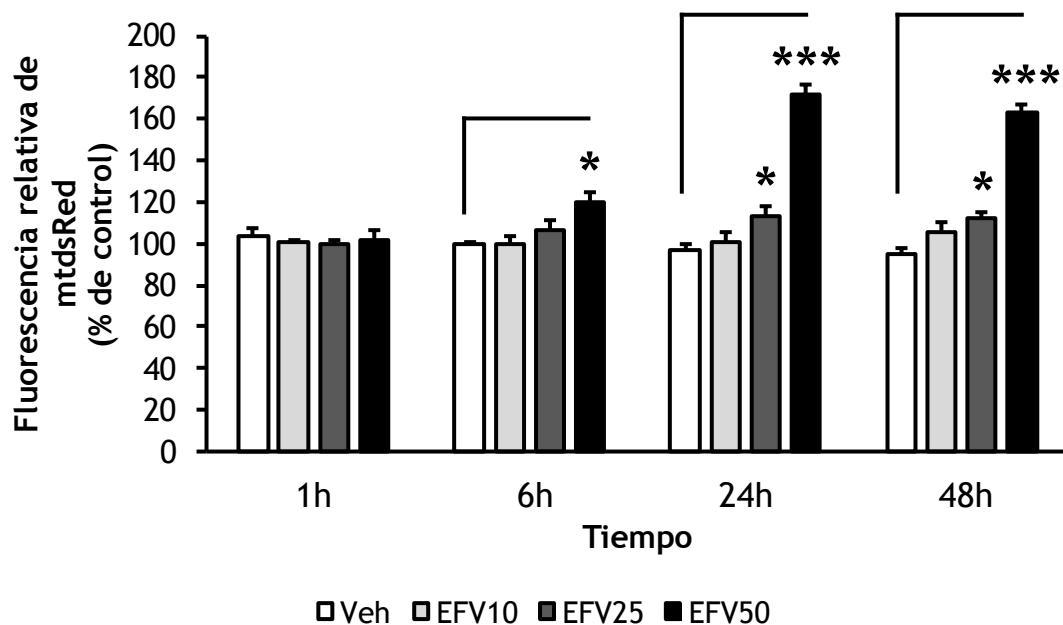


Figura IV.16. Determinación de la masa mitocondrial a través de la expresión de la proteína mtdsRed. Citometría estática de la fluorescencia (roja) media en células HeLa mtdsRed establemente transfectadas. Los datos son mostrados como media  $\pm$  SEM n=6 (1 h), 4-5(6 h), 9(24 h) y 3-4 (48 h). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo.

#### 4.6. Análisis de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes obtenidas por MET de células Hep3B, hepatocitos primarios y HeLa, (Fig. IV.17. y IV.18 A.) revelaron que el tratamiento con EFV durante 24 h produce daño mitocondrial dependiente de la concentración del fármaco. En las células control, las mitocondrias eran regulares, con crestas definidas y membranas completas. Las células tratadas con EFV 10  $\mu$ M presentaban mitocondrias generalmente normales y solo ocasionalmente alteradas. Las células tratadas con EFV 25  $\mu$ M presentaban un daño severo en la estructura mitocondrial con crestas aberrantes y en un menor número. Algunas de las mitocondrias dañadas tenían una apariencia hinchada y había un claro cambio en su forma. Las células control presentaban un alto porcentaje de

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

mitocondrias en forma de vara, mientras la exposición a EFV produjo estructuras irregulares o redondeadas. También se observó un aumento significativo en el tamaño y una reducción en el número de mitocondrias, estos cambios fueron dependientes de la concentración de EFV usada. Un gran número de mitocondrias de células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$ , no presentaban crestas visibles y muchas presentaban alteraciones de la membrana externa incluyendo verticilos superficiales. Además su estructura interna estaba hipercondensada y oscurecida por la presencia de una matriz electrodensa. Es de destacar que en el caso de EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  también se encontró evidencia de degradación autofágica de las mitocondrias, manifestada en estructuras vacuolares de doble membrana en las que estaba contenida la mitocondria. Por otra parte, una examinación más detallada de las imágenes de MET reveló que el RE se encontraba enrollado alrededor de la mitocondria, posiblemente para generar una membrana que pudiera ser después incorporada en las vacuolas autofágicas.

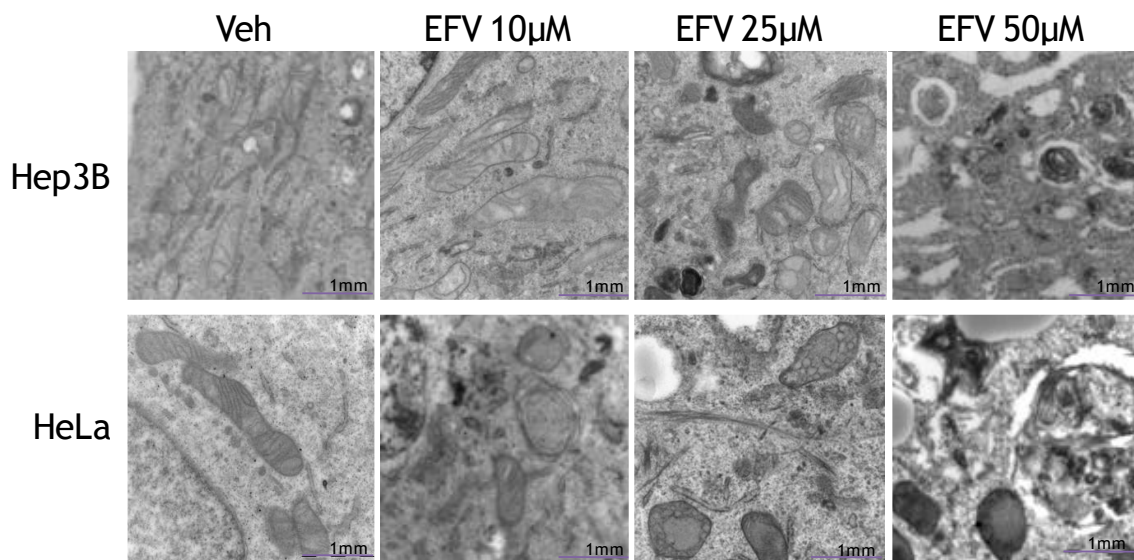


Figura IV.17. Análisis de la morfología mitocondrial. Imágenes representativas de MET de Hep3B y HeLa tratadas con vehículo o EFV durante 24 h. Ampliación de 26.500X.

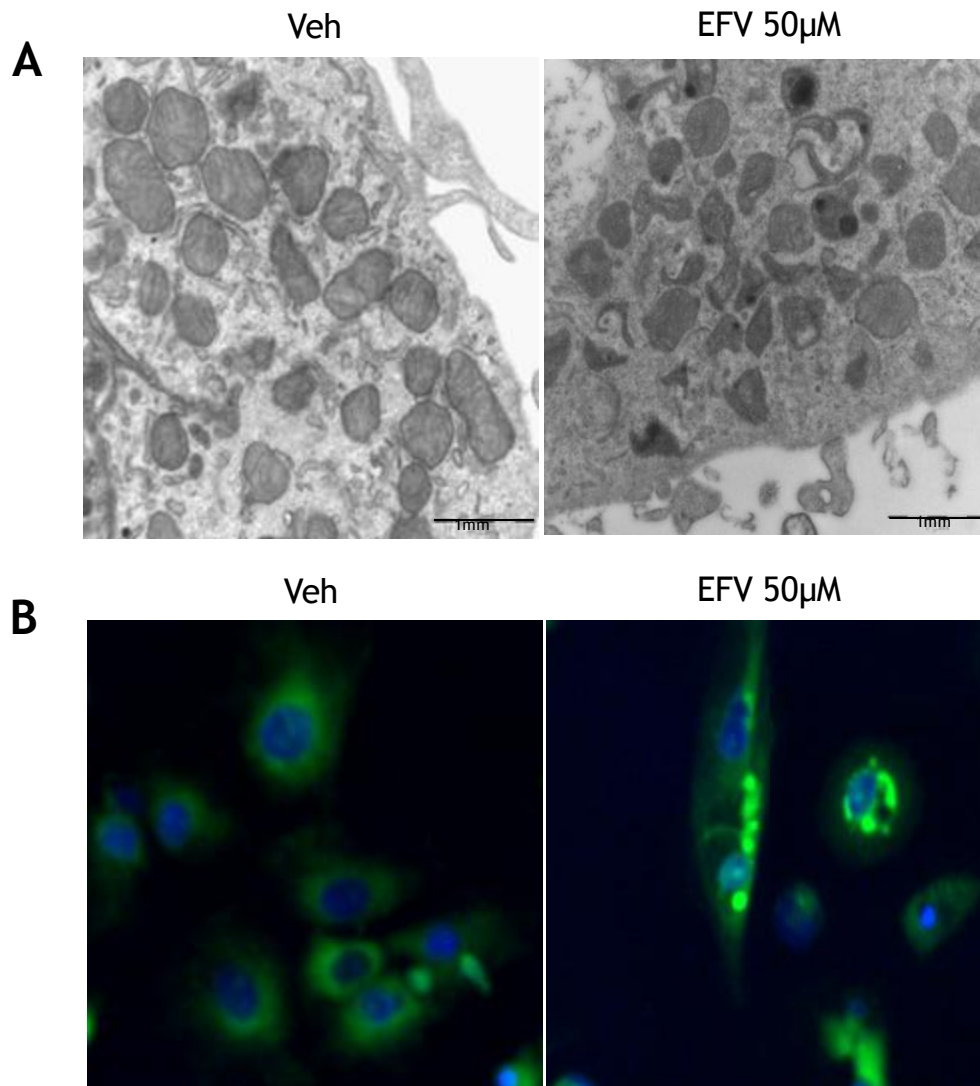


Figura IV.18. Alteraciones mitocondriales en hepatocitos primarios tratados con vehículo o EFV 50  $\mu$ M durante 24 h. (A) Imágenes representativas de MET. Ampliación de 26.500X. (B) Imágenes representativas de fluorescencia. Se muestran los núcleos (azul = Hoechst 33342) y las mitocondrias (verde = NAO).

## **BLOQUE 2: AUTOFAGIA**

### **1. INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA.**

#### **1.1. Determinación de los niveles de expresión de proteínas asociadas con la autofagia**

Para confirmar la presencia de autofagia sugerida en el análisis morfológico de las mitocondrias, se estudió por WB la expresión de dos proteínas indicadoras de autofagia, Beclina 1 y LC3. La conversión de LC3-I a LC3-II es considerada como el principal marcador de autofagia. La Fig. IV.19. muestra un incremento en la expresión de LC3-II y Beclina 1. Como control positivo se usaron células privadas de nutrientes (cultivadas en HBSS). La expresión de LC3-II aumentó de manera concentración-dependiente, alcanzando significatividad estadística con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  tanto a 8 como a 24 h de tratamiento. Por otro lado, la expresión de Beclina 1, solo se incrementó después de 24 h de tratamiento y fue estadísticamente significativa con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  aunque cabe resaltar que a 8 h el control positivo tampoco presentó inducción de la expresión de esta proteína. La activación de LC3 también fue detectada en hepatocitos primarios después de 24 h de tratamiento. En estas células, LC3-II se expresa de manera concentración-dependiente, pero solo presenta significatividad estadística el tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$  (Fig. IV.24 A y IV.24 B).

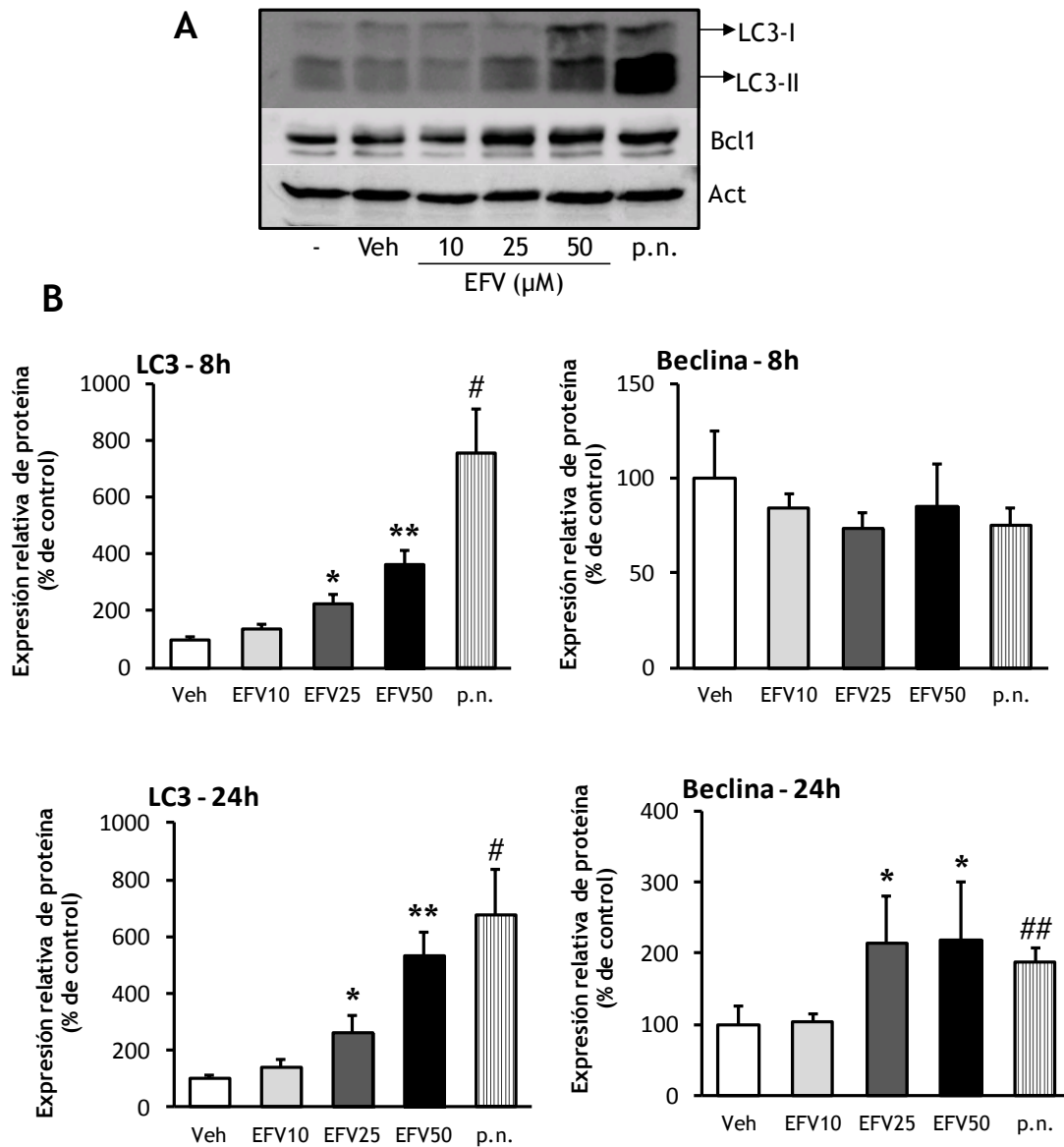


Figura IV.19. Expresión de proteínas marcadoras de autofagia. (A) Imágenes representativas de WB de LC3 y Beclina-1 en células Hep3B tratadas con vehículo o EFV o expuestas a privación de nutrientes (p.n.) por 24 h. (B) Resumen de la densitometría de la expresión de proteínas de células Hep3B tratadas por 8 h y 24 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó con un test T de Student, \*P<0,05, \*\*P<0,01. El control (p.n.) fue analizado por separado #P<0,05, ##P<0,01, con respecto a las células sin tratamiento.

## **1.2. Evaluación de la fluorescencia del LC3-GFP**

Al evaluar por microscopía de fluorescencia las células HeLa LC3-GFP establemente transfectadas, se detectó un incremento concentración-dependiente en la presencia de puntos característicos de LC3-II (Fig. IV.20.). Estos puntos se detectaron a las 24 y 48 h de tratamiento con las tres concentraciones usadas de EFV (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). También se evaluó la media de fluorescencia verde total, la cual se incrementó significativamente en las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  a 24 h, y en un mayor grado a 48 h (Fig. IV.20 C).

## **1.3. Evaluación de la formación de autofagolisosomas**

La activación de la autofagia observada por microscopía de fluorescencia, fue confirmada por un análisis de microscopía confocal en células HeLa que expresan LC3-GFP de forma estable y marcadas con LysoTracker Red, un marcador fluorescente lisosomal. De forma similar a los resultados obtenidos con microscopía de epifluorescencia, en las células control, la señal de LC3-GFP se presentaba de manera dispersa, mientras que en las células tratadas con EFV (24 h), se observaban puntos específicos de LC3-II, visibles en los tratamientos con 25 y 50  $\mu\text{M}$ . Las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$ , solo presentaron estos puntos ocasionalmente (Fig. IV.21 A). El tratamiento con EFV indujo un solapamiento sustancial de las señales verde (LC3-GFP) y roja (LysoTracker Red), sugiriendo así la formación de autofagolisosomas. El análisis de la colocalización de las dos señales, presentado como Icorr (Índice de correlación) en la Fig. IV.21 B, reveló significatividad estadística en las células tratadas con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$ , mientras que las células tratadas con EFV 10  $\mu\text{M}$  no difirieron de las células tratadas con vehículo.



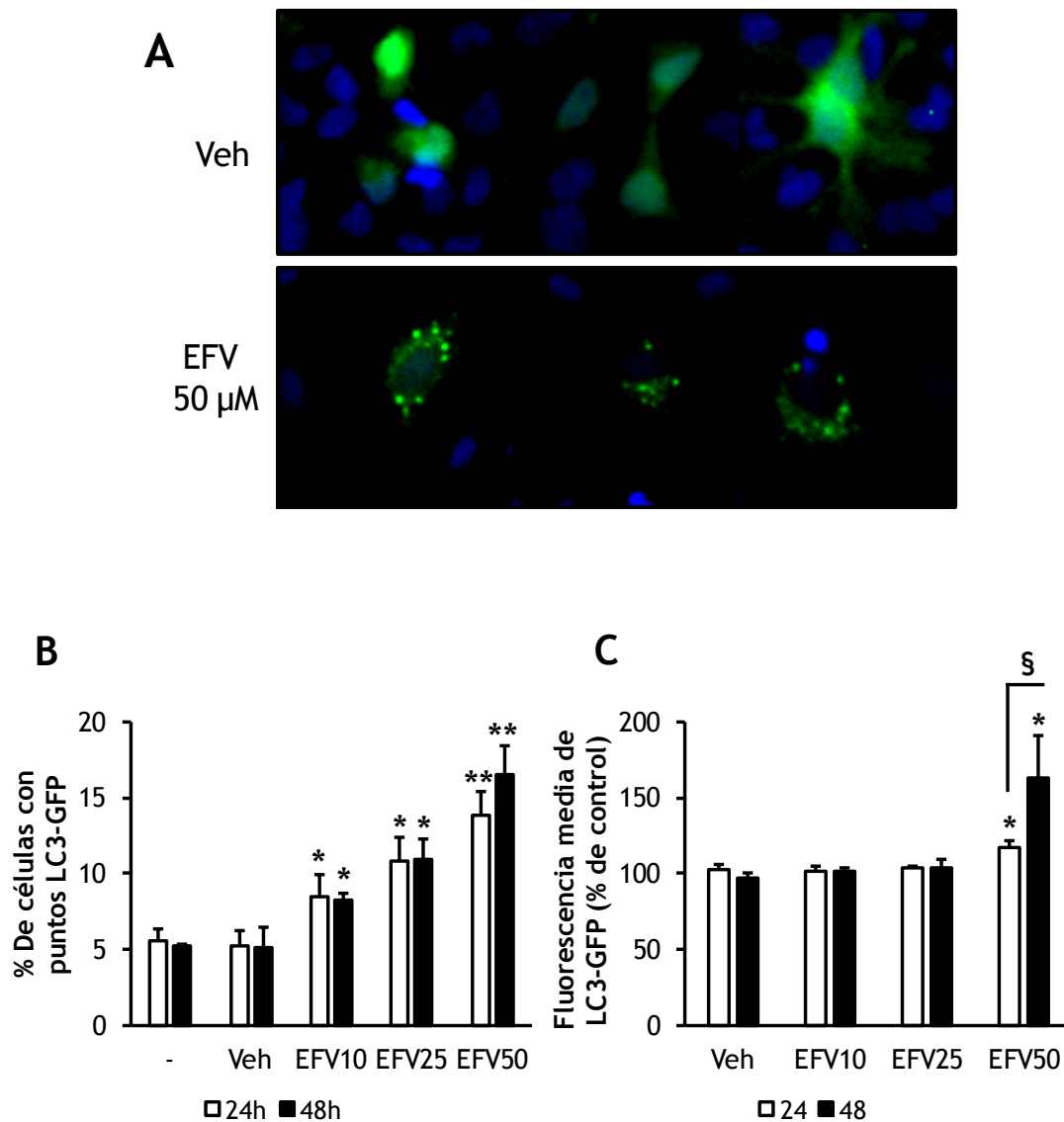
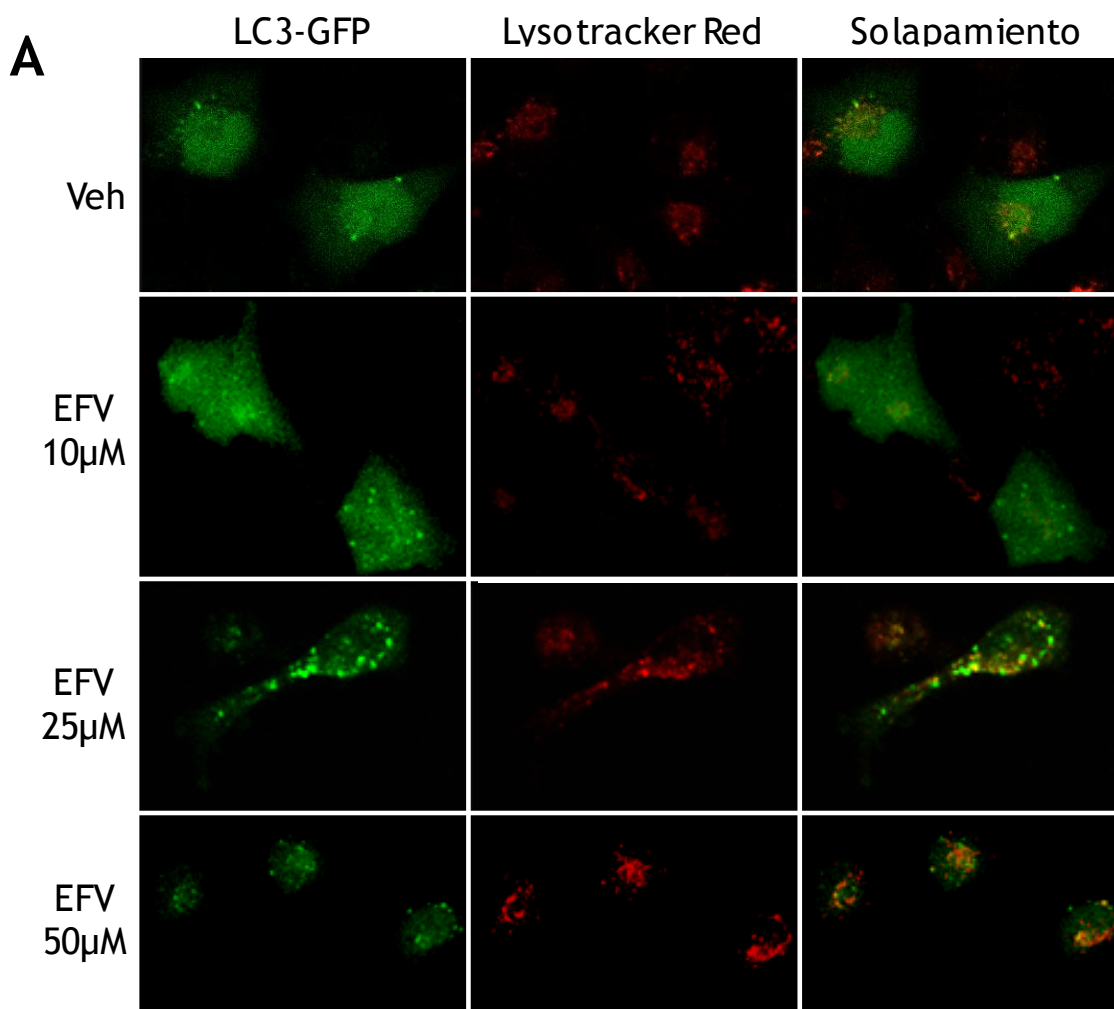


Figura IV.20. Análisis de la expresión de LC3 por microscopía de fluorescencia en células HeLa LC3-GFP establemente transfectadas, tratadas con EFV durante 24 h y 48 h. (A) Imágenes de fluorescencia representativas después de 24 h de tratamiento con vehículo y EFV 50  $\mu$ M (verde: LC3-GFP y azul: Hoechst 33342). (B) Análisis de la presencia de puntos verdes (LC3II); los datos son mostrados como media  $\pm$  SEM, n=4. (C) Fluorescencia media de LC3-GFP; los datos son mostrados como media  $\pm$  SEM, n=4. \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. La comparación entre 24 h y 48 h de tratamiento se hizo por el test T de Student, §P<0,05.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz



**B**

Tratamiento	Veh	EFV 10µM	EFV 25µM	EFV 50µM
Icorr	0.19 ± 0.040	0.20 ± 0.029	0.41 ± 0.013 *	0.78 ± 0.018 *

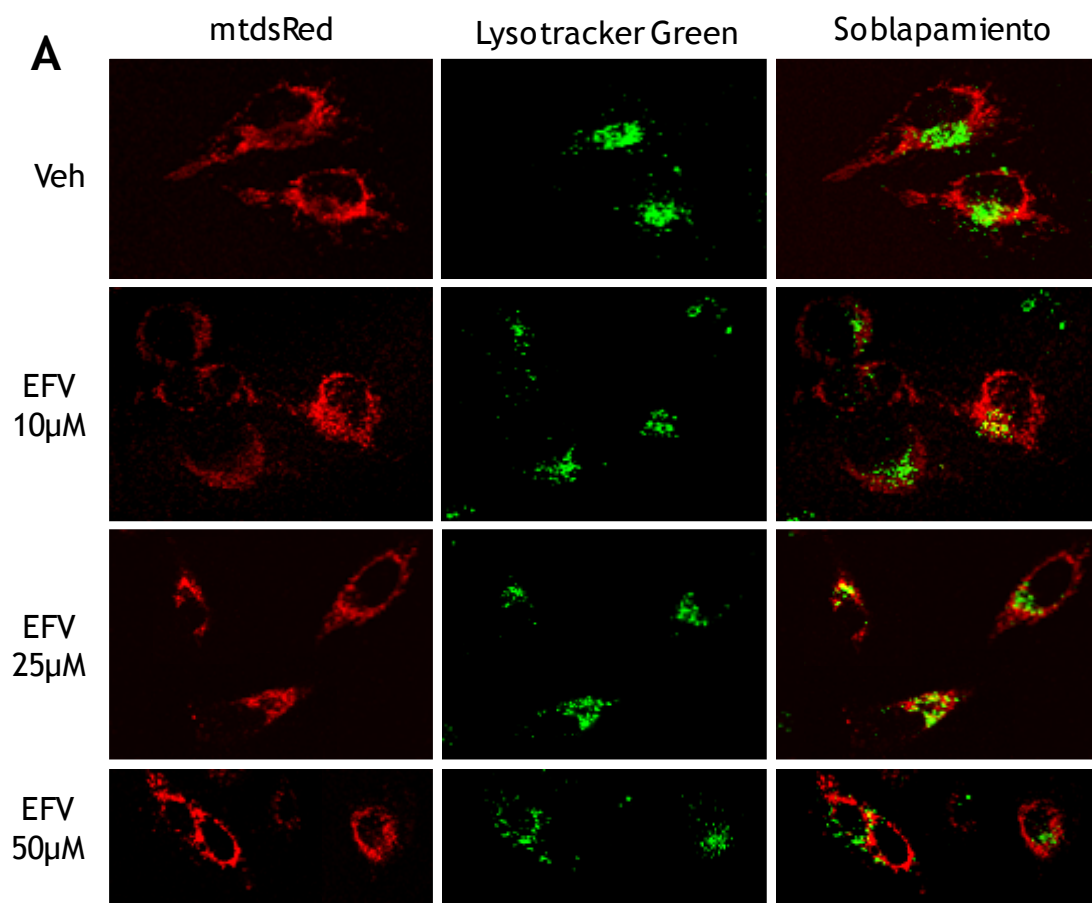
Figura IV.21. Evaluación de la formación de autofagolisosomas por microscopía confocal de células HeLa LC3-GFP establemente transfectadas, tratadas con EFV por 24 h. (A) Imágenes representativas de fluorescencia que muestran LC3-GFP (verde) y lisosomas teñidos con LysoTracker Red (rojo). (B) Análisis del solapamiento de las señales verde y roja, expresado como Icorr, los datos son mostrados como media ± SEM, n=3-6. El análisis estadístico se realizó con un test T de Student, \*P<0,05 con respecto al vehículo.

## 2. CONCENTRACIONES MODERADAS DE EFAVIRENZ INDUCEN DEGRADACIÓN MITOCONDRIAL POR AUTOFAGIA, MIENTRAS QUE ALTAS CONCENTRACIONES DE EFV INDUCEN ESTRÉS AUTOFÁGICO

### 2.1. Evaluación de la degradación mitocondrial por autofagia

Para determinar si los orgánulos degradados por autofagia eran las mitocondrias, se realizaron experimentos adicionales con microscopía confocal. Se utilizaron células HeLa que expresan establemente la proteína mtdsRed, tratadas con EFV durante 24 h. Se marcaron los lisosomas con LysoTracker Green y se evaluó la colocalización de las dos señales expresada como Icorr. En las células tratadas con vehículo, la colocalización entre las señales mitocondrial y la lisosomal fue muy baja o en ocasiones nula. El tratamiento con EFV 25  $\mu\text{M}$ , produjo una colocalización positiva de las dos señales (Fig. IV.22.). Sin embargo, el tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$  no siguió una tendencia concentración-dependiente mostrando una menor colocalización. Este resultado indica un posible bloqueo del flujo autofágico causado por el tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$ . En experimentos de citometría estática usando células HeLa se obtuvieron resultados que apuntaban a la misma línea, las células tratadas durante 24 h con EFV, revelaron un incremento en la fluorescencia media de LysoTracker Green con el tratamiento de 50  $\mu\text{M}$ , mientras que no se detectaron cambios con tratamientos de 10 o 25  $\mu\text{M}$  (Fig. IV.23 A).

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz



**B**

Tratamiento	Veh	EFV 10µM	EFV 25µM	EFV 50µM
Icorr	0.32 ± 0.018	0.39 ± 0.067	0.58 ± 0.066 *	0.37 ± 0.033

Figura IV.22. Evaluación de la degradación mitocondrial autofágica por microscopía confocal de células HeLa mtdsRed establemente transfectadas, tratadas con EFV por 24 h. (A) Imágenes representativas de fluorescencia que muestran la señal de mtdsRed (rojo) y lisosomas marcados con LysoTracker green (verde). (B) Análisis del sobrelapamiento de las señales verde y roja, expresado como Icorr, los datos son mostrados como media ± SEM, n=4-6. El análisis estadístico se realizó con un test T de Student, \*P<0,05 con respecto al vehículo.

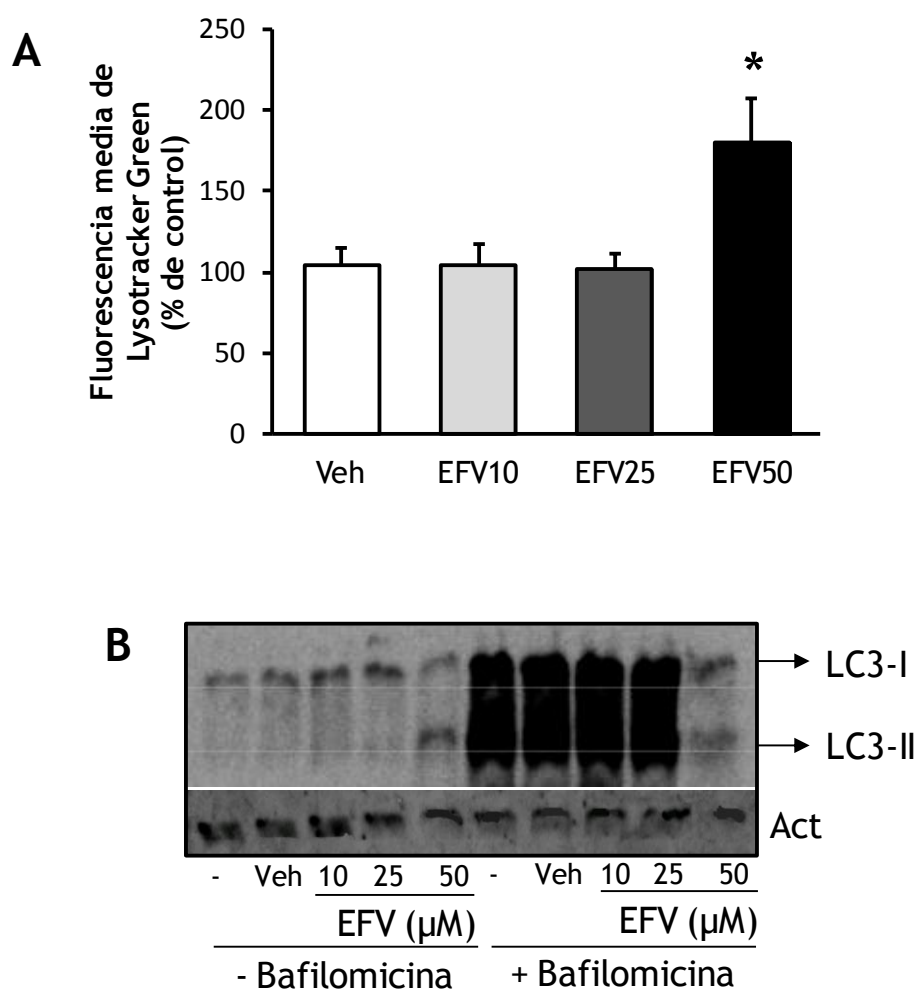


Figura IV.23. Análisis del flujo autofágico. (A) Resumen de la fluorescencia media de LysoTracker green (media  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 con respecto al vehículo.) en células HeLa tratadas con EFV durante 24 h. (B) Imagen representativa de WB de la expresión de LC3 en células Hep3B, después de 24 h e tratamiento con EFV en presencia o ausencia de 20 nM de Bafilomicina A1.

## 2.2. Análisis del flujo autofágico por Western blot

Para confirmar los resultados anteriores, se evaluó el flujo autofágico. Para ello se estudió la expresión de LC3 en células Hep3B y hepatocitos primarios en presencia de Bafilomicina A1, un inhibidor vacuolar tipo ATPasa que impide la formación del lisosoma inhibiendo su bomba  $\text{Na}^+\text{H}^+$ . En un flujo autofágico

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

eficiente, en presencia de Bafilomicina A1, se acumulan los autofagosomas LC3 positivos (Barth *et al.*, 2010). La ausencia de esta acumulación, es indicativa de un bloqueo o demora en el proceso previo a la degradación en el lisosoma. Los experimentos de WB mostraron que el cotratamiento con 20 nM de Bafilomicina A1, lleva a la acumulación de LC3 en células tratadas con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  durante 24 h, algo muy similar a lo observado en las células control. Sin embargo, en presencia de EFV 50  $\mu\text{M}$ , la exposición a Bafilomicina A1 no induce tal acumulación (Fig. IV.23 B y IV.24 A). Esto confirma un defecto en la progresión/resolución de la autofagia en células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$ , una condición también conocida como “Estrés autofágico”.

### **3. LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR EFAVIRENZ PROMUEVE LA SUPERVIVENCIA CELULAR**

La autofagia es un mecanismo adaptativo que promueve la supervivencia celular. Sin embargo, también es considerado como una condición que, si se prolonga, puede llevar a lo que es conocido como “muerte celular programada de tipo II” (Levine and Yuan, 2005). En este experimento se evaluó si la activación autofágica en este modelo promueve o compromete la supervivencia celular. Para esto, se trataron células HeLa que expresan establemente la proteína mtdsRed con 3MA 2,5 mM, un inhibidor clase III PI3K usado a menudo como un supresor de la formación del autofagosoma. Como ya se ha mostrado en el Bloque 1 de experimentos, altas concentraciones de EFV ejercen un efecto inhibitorio sobre la viabilidad y la proliferación de células Hep3B y HeLa, promoviendo la apoptosis. Este experimento reveló que la inhibición de la autofagia empeora el efecto dañino de EFV, sugiriendo que esta juega un papel en promover la supervivencia celular.

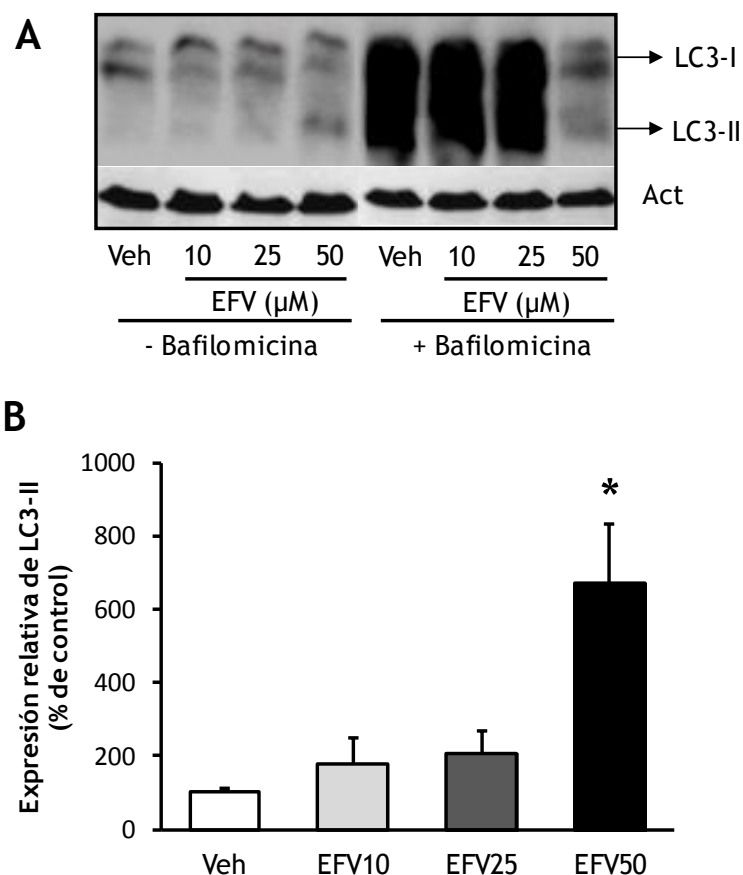


Figura 24. Expresión de LC3 en hepatocitos primarios tratados con EFV durante 24 h. (A) Imágenes representativas de WB de LC3 en presencia o ausencia de 20 nM de Bafilomicina A1. (B) Resumen de la densitometría de la expresión de LC3. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM, n=3. El análisis estadístico se realizó con un test T de Student, \*P<0,05.

Los experimentos de citometría estática, mediante la cuantificación del número de células midiendo la fluorescencia de Hoechst 33342, muestran que el tratamiento de células HeLa con EFV durante 24 h produce una disminución concentración-dependiente en la proliferación celular y en presencia de 3MA, esta disminución es aún mayor (Fig. IV.25.). También se cuantificó la señal mitocondrial, por medio de la fluorescencia de mtdsRed en presencia o ausencia de 3MA. Se encontró que las células tratadas con EFV 25  $\mu$ M en

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

presencia de 3MA, presentaron valores de fluorescencia media mayores, que aquellas no tratadas con 3MA. Sin embargo, en el caso de EFV 50  $\mu\text{M}$  el incremento en la señal roja fue moderado y no presentó significatividad estadística indicando que en este modelo, el tratamiento con EFV 50  $\mu\text{M}$  lleva a un bloqueo de la ruta autofágica. No se detectaron cambios significativos con EFV 10  $\mu\text{M}$  en presencia de 3MA (Fig. IV.25.). La incubación de células control con 3MA no afectó el número de células o la fluorescencia media de mtdsRed (datos no mostrados).

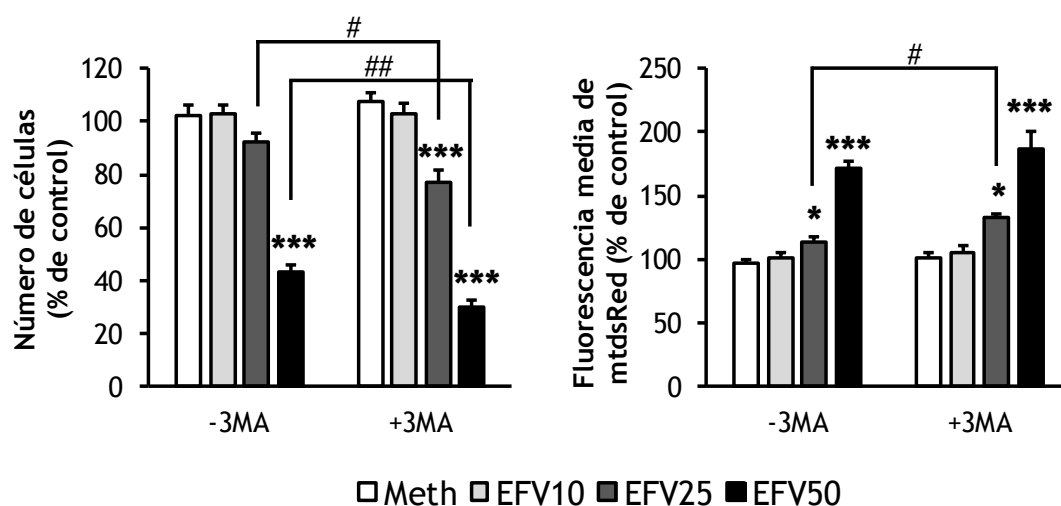


Figura IV.25. Relación de la autofagia con la supervivencia de células Hep3B. Efecto del tratamiento con EFV durante 24 h en presencia de 2,5 mM de 3MA sobre las fluorescencia y el número de células HeLa mtdsRed establemente transfectadas. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=5-9). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo. #P<0,05, ##P<0,01 con respecto al valor correspondiente en el experimento realizado en ausencia de 3MA (test T de Student).



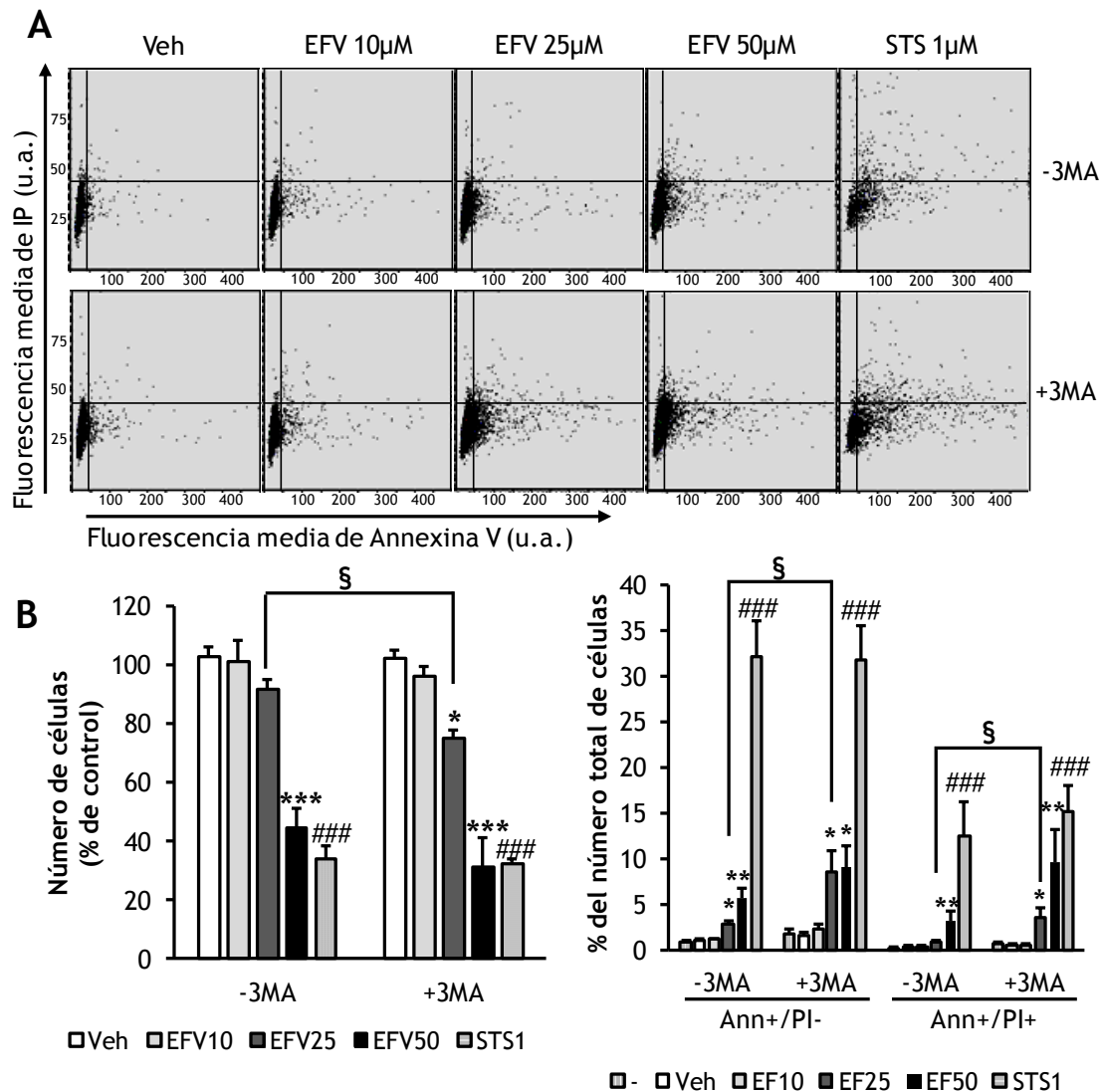


Figura IV.26. Papel de la autofagia sobre la apoptosis inducida por EFV. Efecto del tratamiento con EFV en células Hep3B, tratadas durante 24 h en presencia o ausencia de 2,5 mM de 3MA estudiado por citometría estática. (A) Histogramas representativos del análisis biviado Annexina V/IP. (B) Resumen del número de células y de la activación de la apoptosis. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=6-9). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo. §P<0,05, con respecto al valor correspondiente en el experimento realizado en ausencia de 3MA (test T de Student). El control positivo para apoptosis, STS 1  $\mu$ M fue analizado estadísticamente por separado con un test T de Student con respecto al control ###P<0,001.

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

Las células Hep3B y los hepatocitos primarios tratados con EFV en presencia de 3MA, en cuanto a la proliferación, presentaron un efecto similar al previamente descrito para células HeLa (Fig. IV.26 B y IV.27.).

Para evaluar el papel de la autofagia sobre la apoptosis inducida por EFV, se hizo un análisis bivariado Anexina V/IP en presencia o ausencia de 3MA. Por citometría estática, se analizaron las cuatro subpoblaciones celulares ya descritas en la sección 1.2 y se encontró que el cotratamiento con 3MA, potencia el efecto apoptótico de EFV, pero no interfiere con la acción del control positivo de apoptosis STS. Este resultado demuestra que la autofagia juega un papel específico en el efecto apoptótico inducido por EFV pero no así en la apoptosis inducida por STS (Fig. IV.26 A).

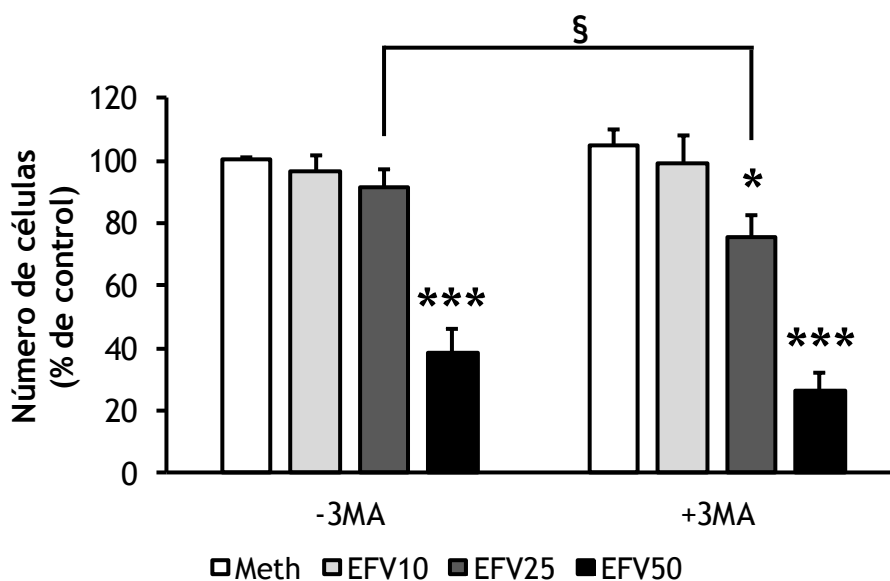


Figura IV.27. Relación de la autofagia con la supervivencia de hepatocitos primarios. Número de células después de un tratamiento de 24 h con EFV sobre hepatocitos primarios, co-tratadas con 2,5 mM de 3MA. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=4-5). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo. §P<0,05, con respecto al valor correspondiente en el experimento realizado en ausencia de 3MA (test T de Student).

## **BLOQUE 3: PERFIL DE ESTRÉS Y TOXICIDAD**

### **1. MICROMATRIZ DE RT-PCR EN TIEMPO REAL DE GENES IMPLICADOS EN ESTRÉS Y TOXICIDAD**

Con el fin de evaluar de una forma global el efecto tóxico del EFV, se realizó una micromatriz de RT-PCR en tiempo real de genes implicados en estrés y toxicidad. En células Hep3B tratadas con diferentes concentraciones de EFV durante 8 y 24 h, se estudió la expresión de 8 grupos de genes involucrados en: estrés metabólico, estrés oxidativo, choque térmico, proliferación y carcinogénesis, detención del crecimiento y senescencia, inflamación, necrosis/apoptosis (daño y reparación de ADN) y señalización de la apoptosis.

#### **1.1. Expresión de genes relacionados con estrés y toxicidad a 8 h de tratamiento con efavirenz**

En este experimento se usaron células Hep3B tratadas con EFV 25  $\mu\text{M}$  por 8 h. Debido a que el metabolismo de EFV es mediado en gran parte por el citocromo P450, es relevante el hecho de que con solo 8 h de tratamiento, se modifique la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de fármacos (Tabla IV.1 y Fig. IV.28.). Del grupo de genes involucrados en estrés metabólico, se analizaron 8 genes (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP7A1*, *EPHX2*, *FMO1*, *FMO5*, *GSTM3* Y *POR*). Se observó un aumento significativo en la expresión de *CYP1A1* y una disminución en *CYP2E1*, *CYP7A1*, *POR*, *GSTM3*, *FMO1* y en menor medida en *FMO5* mientras que *EPHX2* no presentó ningún cambio. Se evaluaron 11 genes de respuesta a estrés oxidativo (*CAT*, *CRYAB*, *GPX1*, *GSR*, *HMOX1*, *MT2A*, *PRDX1*, *PRDX2*, *PTGS1*, *SOD1*, *SOD2*), de éstos se incrementó significativamente la expresión de *SOD2* y a un grado incluso mayor, la expresión de *MT2A*. Por otro lado, se encontró una reducción en la expresión de *CAT* y *PTGS1*. No se detectaron cambios significativos en la expresión de

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

*CRYAB*, *GPX1*, *GSR*, *HMOX1*, *PRDX1*, *PRDX2* ni *SOD1*. Entre los 16 genes evaluados relacionados con choque térmico (*DNAJA1*, *DNAJB4*, *HSF1*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPA2*, *HSPA4*, *HSPA5*, *HSPA6*, *HSPA8*, *HSPB1*, *HSP90AA2*, *HSP90AB1*, *HSPD1*, *HSPE1*, *HSPH1*), solo se encontró modificada la expresión de *HSPA2* que disminuyó y la expresión de *HSPA6* que aumentó. En términos de genes implicados en proliferación y/o carcinogénesis se evaluaron 6 genes (*CCNC*, *CCND1*, *CCNG1*, *E2F1*, *EGR1* y *PCNA*), se incrementó la expresión de *CCND1* y *EGR1*, mientras que *CCNG1* y *PCNA* exhibieron niveles de mRNA disminuidos. No se observaron modificaciones significativas en la expresión de *CCNC* o de *E2F1*. De los genes 7 genes evaluados asociados con la detención del crecimiento o senescencia (*CDKN1A*, *DDIT3*, *GADD45A*, *GDF15*, *IGFBP6*, *MDM2* y *TP53*), se observó un gran incremento en la expresión de *GDF15*, mientras que *CDKN1A* y *MDM2* exhibieron un incremento menor, pero al igual que *GDF15*, estadísticamente significativo. No se detectaron cambios en la expresión de *DDIT3*, *GADD45A*, *IGFBP6* ni *TP53*. Entre los 14 genes implicados en inflamación (*CCL21*, *CCL3*, *CCL4*, *CSF2*, *CXCL10*, *IL18*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *LTA*, *MIF*, *NFKB1*, *NOS2* y *SERPINE1*), se detectó un incremento significativo en la expresión de *SERPINE1* y una clara y estadísticamente significativa disminución de los niveles de mRNA de *CXCL10*. Ninguna de las interleucinas, ni de los ligandos de quimiocinas CC (CCL), así como tampoco *CSF2*, *NOS2*, *LTA* y *MIF*, presentaron cambios significativos. Entre los 22 genes relacionados con necrosis y apoptosis (*ATM*, *CHEK2*, *DDB1*, *ERCC1*, *ERCC3*, *RAD23A*, *RAD50*, *UGT1A4*, *UNG*, *XRCC1*, *XRCC2*, *ANXA5*, *BAX*, *BCL2L1*, *CASP1*, *CASP10*, *CASP8*, *FASLG*, *NFKBIA*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *TNFSF10*), solo *CASP8* y *TNF* fueron regulados al alta de manera significativa. *BCL2L1* y *FASLG* también presentaron incremento, aunque sin significatividad estadística, mientras que *TNFSF10* fue regulado a la baja.

Símbolo	Tasa de cambio de la expresión de los genes vs Vehículo					
	8 h		24 h		25 (µM EFV)	p valor
	25 (µM EFV)	p valor	10 (µM EFV)	p valor		
<b>Estrés metabólico</b>						
<i>CYP1A1</i>	3,16	<b>0,0148</b>	1,84	<b>0,0035</b>	3,43	<b>0,0013</b>
<i>CYP2E1</i>	0,44	<b>0,0001</b>	0,69	0,1956	0,64	0,5116
<i>CYP7A1</i>	0,17	<b>0,038</b>	0,90	0,7934	0,90	0,8938
<i>EPHX2</i>	1,05	0,7262	0,93	0,2808	1,85	0,0784
<i>FMO1</i>	0,24	<b>0,0066</b>	0,44	0,3758	0,37	<b>0,0262</b>
<i>FMO5</i>	0,57	0,0899	1,02	0,8890	1,14	0,3059
<i>GSTM3</i>	0,61	<b>0,0002</b>	1,01	0,9614	0,77	0,7474
<i>POR</i>	0,65	<b>0,0056</b>	0,99	0,9540	1,54	0,4301
<b>Estrés oxidativo</b>						
<i>CAT</i>	0,57	0,0987	0,97	0,7298	1,28	0,3865
<i>CRYAB</i>	0,86	0,5965	0,89	0,7882	0,56	0,0701
<i>GPX1</i>	0,78	0,2295	1,23	0,4879	1,52	0,0710
<i>GSR</i>	1,08	0,8389	1,13	0,1478	1,36	0,6981
<i>HMOX1</i>	1,00	0,9954	1,03	0,9152	1,17	0,7362
<i>MT2A</i>	2,32	<b>0,0033</b>	1,99	<b>0,0103</b>	3,59	0,0546
<i>PRDX1</i>	0,96	0,7409	1,58	0,3984	1,69	<b>0,0073</b>
<i>PRDX2</i>	0,64	0,3295	1,12	0,1278	1,33	0,3881
<i>PTGS1</i>	0,65	<b>0,0063</b>	1,32	0,7088	0,76	<b>0,0493</b>
<i>SOD1</i>	0,91	0,6648	1,04	0,3056	1,32	0,2009
<i>SOD2</i>	1,41	<b>0,018</b>	1,17	0,4404	1,12	0,7714
<b>Choque térmico</b>						
<i>DNAJA1</i>	0,94	0,6648	1,00	0,9866	1,01	0,9410
<i>DNAJB4</i>	1,20	0,2413	1,20	<b>0,0340</b>	1,36	0,0958
<i>HSF1</i>	0,84	0,3354	1,14	0,5016	1,22	0,5050
<i>HSPA1A</i>	1,11	0,6876	1,16	0,7269	1,44	0,6701
<i>HSPA1L</i>	0,92	0,5798	1,02	<b>0,0363</b>	1,71	0,2402
<i>HSPA2</i>	0,52	<b>0,0472</b>	0,91	0,8172	1,09	0,8536
<i>HSPA4</i>	0,93	0,742	1,04	0,9481	1,17	0,8293
<i>HSPA5</i>	0,79	0,6034	1,14	0,6219	1,23	0,6163
<i>HSPA6</i>	3,17	<b>0,0441</b>	0,90	0,5741	2,82	0,2556
<i>HSPA8</i>	0,99	0,9686	1,01	0,9229	1,01	0,9507
<i>HSPB1</i>	0,78	0,2709	0,92	0,1562	1,26	0,6665
<i>HSP90AA2</i>	0,99	0,9698	0,75	0,0698	0,88	0,3659
<i>HSP90AB1</i>	0,99	0,9456	1,01	0,8344	1,24	0,3531
<i>HSPD1</i>	1,11	0,3582	1,21	<b>0,0011</b>	1,46	0,4387
<i>HSPE1</i>	0,92	0,6773	1,14	0,2865	1,23	0,4716
<i>HSPH1</i>	0,90	0,4271	0,93	0,3818	0,92	0,4994
<b>Proliferación y carcinogénesis</b>						
<i>CCNC</i>	0,81	0,4741	0,79	<b>0,0017</b>	1,14	0,7705
<i>CCND1</i>	1,80	<b>0,0463</b>	1,47	0,2166	1,05	0,8386
<i>CCNG1</i>	0,66	<b>0,013</b>	0,97	0,6882	1,12	0,5963
<i>E2F1</i>	0,79	0,3984	0,88	0,6577	0,75	0,3307
<i>EGR1</i>	3,38	<b>0,0103</b>	2,49	<b>0,0282</b>	3,01	<b>0,0189</b>
<i>PCNA</i>	0,74	<b>0,0451</b>	0,92	0,4305	0,92	0,7789

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

<b>Detención del crecimiento y senescencia</b>						
<i>CDKN1A</i>	1,31	<b>0,0469</b>	0,72	0,3465	0,82	0,1610
<i>DDIT3</i>	1,54	0,2706	1,44	0,3976	2,62	<b>0,0001</b>
<i>GADD45A</i>	0,83	0,5737	0,55	<b>0,0097</b>	0,91	0,8843
<i>GDF15</i>	3,08	<b>0,0065</b>	1,14	0,0550	1,54	<b>0,0065</b>
<i>IGFBP6</i>	0,99	0,9655	1,31	<b>0,0240</b>	1,72	0,4315
<i>MDM2</i>	1,19	<b>0,0275</b>	1,17	0,1598	1,67	0,3388
<i>TP53</i>	1,39	0,5984	1,35	0,4127	1,39	0,1572
<b>Inflamación</b>						
<i>CCL21</i>	1,53	0,3403	2,04	0,1551	1,39	0,1572
<i>CCL3</i>	1,05	0,9201	1,63	0,2926	0,86	0,5830
<i>CCL4</i>	1,18	0,8063	1,27	0,6026	1,15	0,3721
<i>CSF2</i>	2,18	0,3387	1,13	0,2069	1,22	0,6381
<i>CXCL10</i>	0,19	<b>0,0297</b>	0,40	0,1110	0,16	<b>0,0068</b>
<i>IL18</i>	1,21	0,1195	0,54	0,1120	0,50	0,1121
<i>IL1A</i>	0,73	0,0613	0,67	0,1760	0,63	0,3962
<i>IL1B</i>	0,80	0,2763	1,29	0,8008	0,87	0,3375
<i>IL6</i>	0,85	0,6465	0,86	0,9153	0,81	0,8805
<i>LTA</i>	1,33	0,5014	0,55	0,1135	1,20	0,7121
<i>MIF</i>	0,83	0,4905	0,92	0,5481	1,13	0,7000
<i>NFKB1</i>	2,41	0,2417	1,08	0,4045	1,09	0,6532
<i>NOS2</i>	0,92	0,7952	1,92	0,5901	1,59	0,6917
<i>SERPINE1</i>	5,79	<b>0,0117</b>	1,67	<b>0,0023</b>	1,87	0,2379
<b>Necrosis o apoptosis (Daño y reparación del DNA)</b>						
<i>ATM</i>	1,00	0,9639	1,16	0,4761	1,51	<b>0,0443</b>
<i>CHEK2</i>	0,89	0,6853	1,22	0,4784	1,29	0,6010
<i>DDB1</i>	0,85	0,3657	1,34	0,1644	1,49	0,2650
<i>ERCC1</i>	1,04	0,7027	0,96	0,8973	1,29	0,4044
<i>ERCC3</i>	0,82	0,5098	0,91	0,1597	0,93	<b>0,0111</b>
<i>RAD23A</i>	1,09	0,425	1,09	0,7593	1,51	0,3772
<i>RAD50</i>	0,95	0,9025	1,15	0,7038	1,14	0,7021
<i>UGT1A4</i>	1,09	0,6556	0,44	0,0879	0,58	0,1384
<i>UNG</i>	0,93	0,5643	0,78	0,2949	1,08	0,8106
<i>XRCC1</i>	1,12	0,7654	0,69	0,2278	1,03	0,9110
<i>XRCC2</i>	1,43	0,2942	0,92	0,2258	1,42	0,6878
<b>Necrosis o apoptosis ( Señalización de apoptosis)</b>						
<i>ANXA5</i>	1,18	0,0544	0,99	0,9696	1,42	0,1703
<i>BAX</i>	0,81	0,2674	0,86	0,6249	1,27	0,6159
<i>BCL2L1</i>	1,34	0,1308	0,96	0,4846	0,84	0,1026
<i>CASP1</i>	0,53	0,1466	0,72	0,5916	0,53	0,5695
<i>CASP10</i>	0,85	0,5504	1,15	0,1948	1,52	0,3882
<i>CASP8</i>	1,47	<b>0,0406</b>	1,88	0,0525	2,18	0,2462
<i>FASLG</i>	2,61	0,0895	0,91	0,8704	0,40	0,2122
<i>NFKBIA</i>	0,84	0,7175	0,76	0,0713	0,74	0,5306
<i>TNF</i>	1,80	<b>0,0287</b>	0,47	<b>0,0053</b>	0,47	<b>0,0128</b>
<i>TNFRSF1A</i>	1,18	0,6517	1,13	0,2754	1,29	0,4533
<i>TNFSF10</i>	0,16	<b>0,0016</b>	0,69	0,1900	0,70	0,5180

Tabla IV.1. Expresión de los genes de la micromatriz RT2 Human Stress and Toxicity Pathway Finder™ en células Hep3B tratadas con EFV 25 µM durante 8 h (n=3) y con EFV 10 y 25 µM durante 24 h (n=2). Los datos se refieren a la tasa de cambio con respecto a

las células tratadas con vehículo y son presentados como media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se hizo con un test T de Student \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al vehículo.

### 1.2. Expresión de genes relacionados con estrés y toxicidad a 24 h de tratamiento con efavirenz

A continuación, también fue analizada la expresión de los genes después de un periodo de exposición con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  durante 24 h. La mayoría de los resultados encontrados, eran acordes con las tendencias observadas después de 8 h de tratamiento (Tabla IV.1. y Fig. IV.29.). Con respecto al estrés metabólico, con ambas concentraciones se produjo un incremento significativo en la expresión de *CYP1A1*, mientras que *FMO1* permaneció regulado a la baja. *CYP2E1*, *CYP7A1*, *POR* and *GSTM3* presentaron niveles de mRNA similares a los detectados en las células tratadas con vehículo; mientras que la expresión de *EPHX2* se incrementó con EFV 25  $\mu\text{M}$ . Entre los genes de respuesta a estrés oxidativo, solo *MT2A* presentó un incremento concentración-dependiente en su expresión; mientras que *CRYAB* y *PTGS1* fueron regulados a la baja. Ni *CAT* ni *SOD2* presentaron cambios estadísticamente significativos. Entre las HSP, se incrementó la expresión de *HSPA6* en células tratadas con EFV 25  $\mu\text{M}$ , pero no en las incubadas con EFV 10  $\mu\text{M}$ . De los genes implicados en proliferación y/o carcinogénesis, solo *EGR1* se incrementó significativamente y de manera concentración-dependiente. De los genes relacionados con detención del crecimiento y senescencia, *GDF15* fue regulado al alta de forma concentración-dependiente y una tendencia similar fue detectada con *MDM2*, *IGFBP6* y *TP53*. En este punto se detectó un mayor incremento en los niveles de mRNA de *DDIT3*, particularmente después del tratamiento con EFV 25  $\mu\text{M}$ . El perfil observado en la expresión de los genes relacionados con inflamación, no difiere significativamente entre 8 y 24 h de tratamiento con EFV, de hecho la única variación observada fue una disminución del contenido de mRNA entre varias interleuquinas. De los genes

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

asociados con necrosis o apoptosis, solo *CASP8* continuó mostrando el incremento exhibido después de 8 h de exposición a EFV, aunque este incremento no fue concentración-dependiente. Se observó además una disminución no significativa en la expresión de *CASP1* y *TNFSF10*. En el caso del mRNA de *ATM*, se detectó un incremento significativo. Curiosamente, *FASLG* y *TNF* fueron regulados a la baja, a pesar de haber mostrado un incremento en la expresión después de 8 h de tratamiento.

## 2. VALIDACIÓN DE LA MICROMATRIZ

### 2.1. RT-PCR en tiempo real

Para validar la micromatriz, se eligieron varios genes que mostraban una alteración significativa y se validó su expresión individual por RT-PCR en tiempo real. Se analizaron los genes *ATM*, *EGR1*, *HSPA6*, *MT2A*, *SERPINE1* y *CXCL10* de células Hep3B tratadas durante 8 y 24 h con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos en la validación, coinciden con los antes vistos en la micromatriz. La expresión de *ATM*, *EGR1*, *HSPA6*, *MT2A* se mostró incrementada de manera concentración-dependiente. El contenido de mRNA de *SERPINE1* también aumentó, pero no de manera concentración-dependiente. El incremento de *EGR1*, *MT2A* y *SERPINE1* fue estadísticamente significativo (Fig. IV.30.). Al igual que lo observado en la micromatriz, la expresión de *CXCL10*, disminuyó de manera concentración-dependiente y fue estadísticamente significativa.



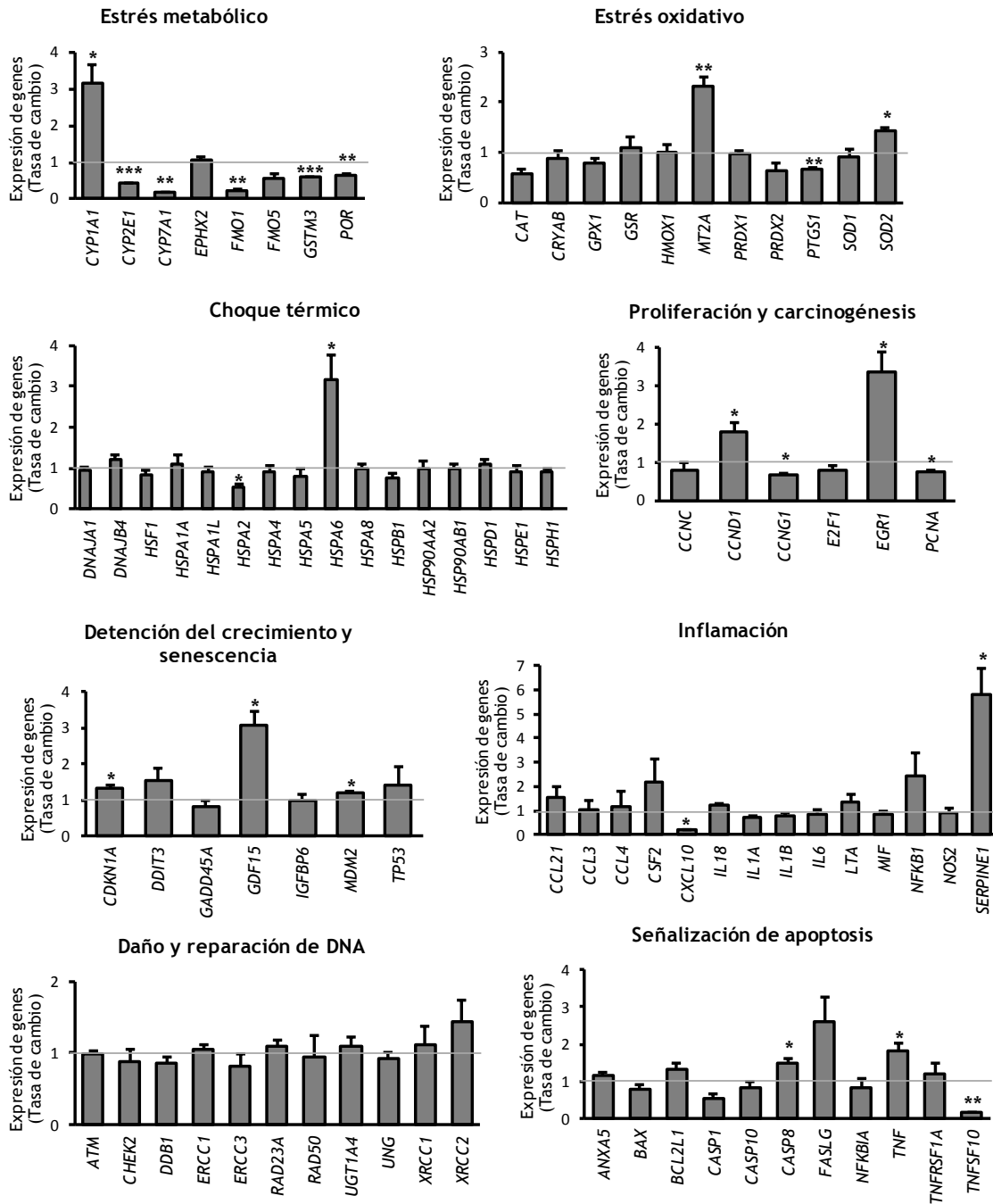


Figura IV.28. Expresión diferencial de 8 grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés y toxicidad en células Hep3B tratadas con EFV 25  $\mu$ M durante 8 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3). Son representados como tasa de cambio con respecto a las células tratadas con vehículo. El análisis se hizo con un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo.

## Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

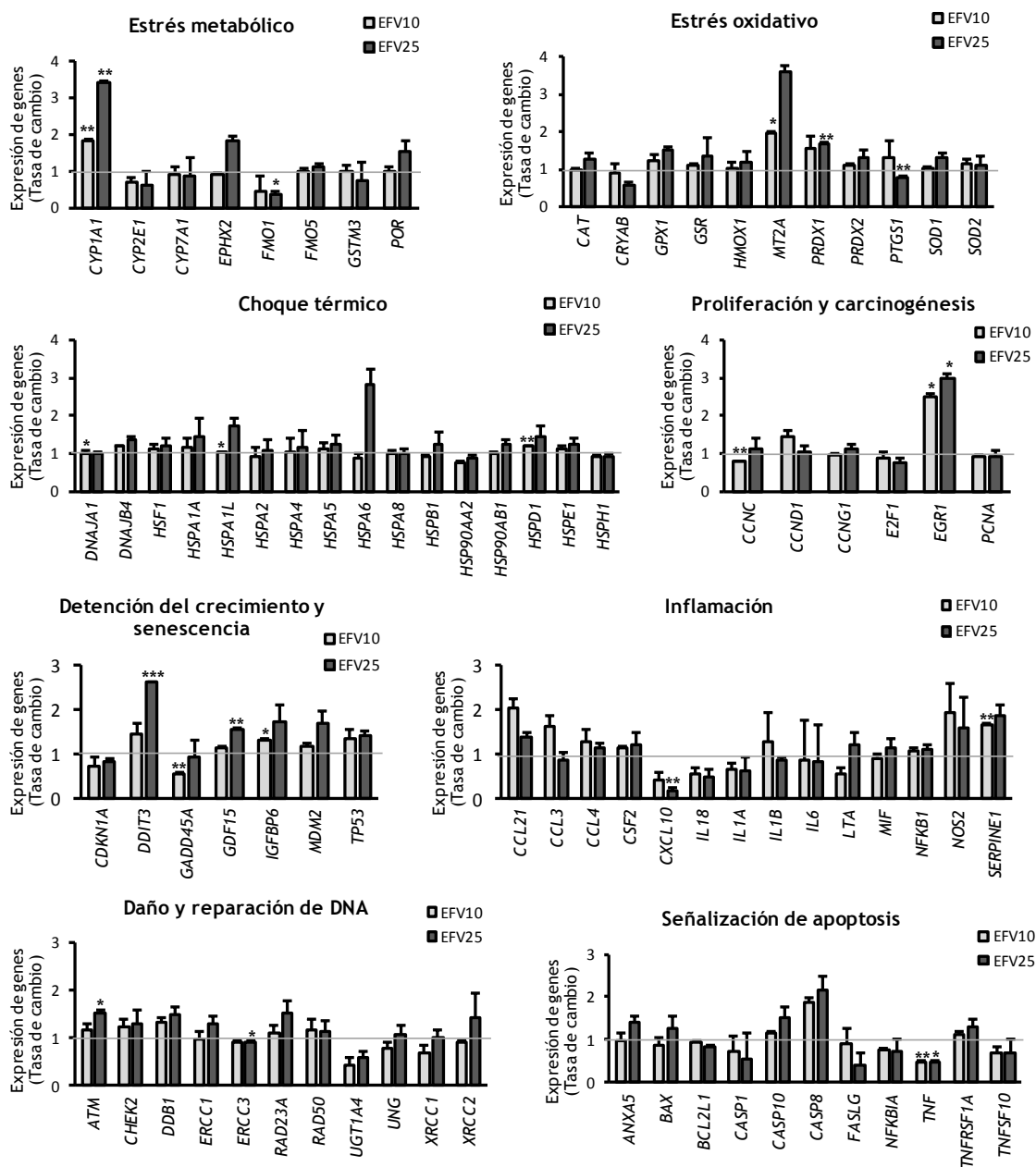


Figura IV.29. Expresión diferencial de 8 grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés y toxicidad en células Hep3B tratadas con EFV 10  $\mu$ M y 25  $\mu$ M durante 24 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=2). Son representados como tasa de cambio con respecto a las células tratadas con vehículo. El análisis se hizo con un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo.

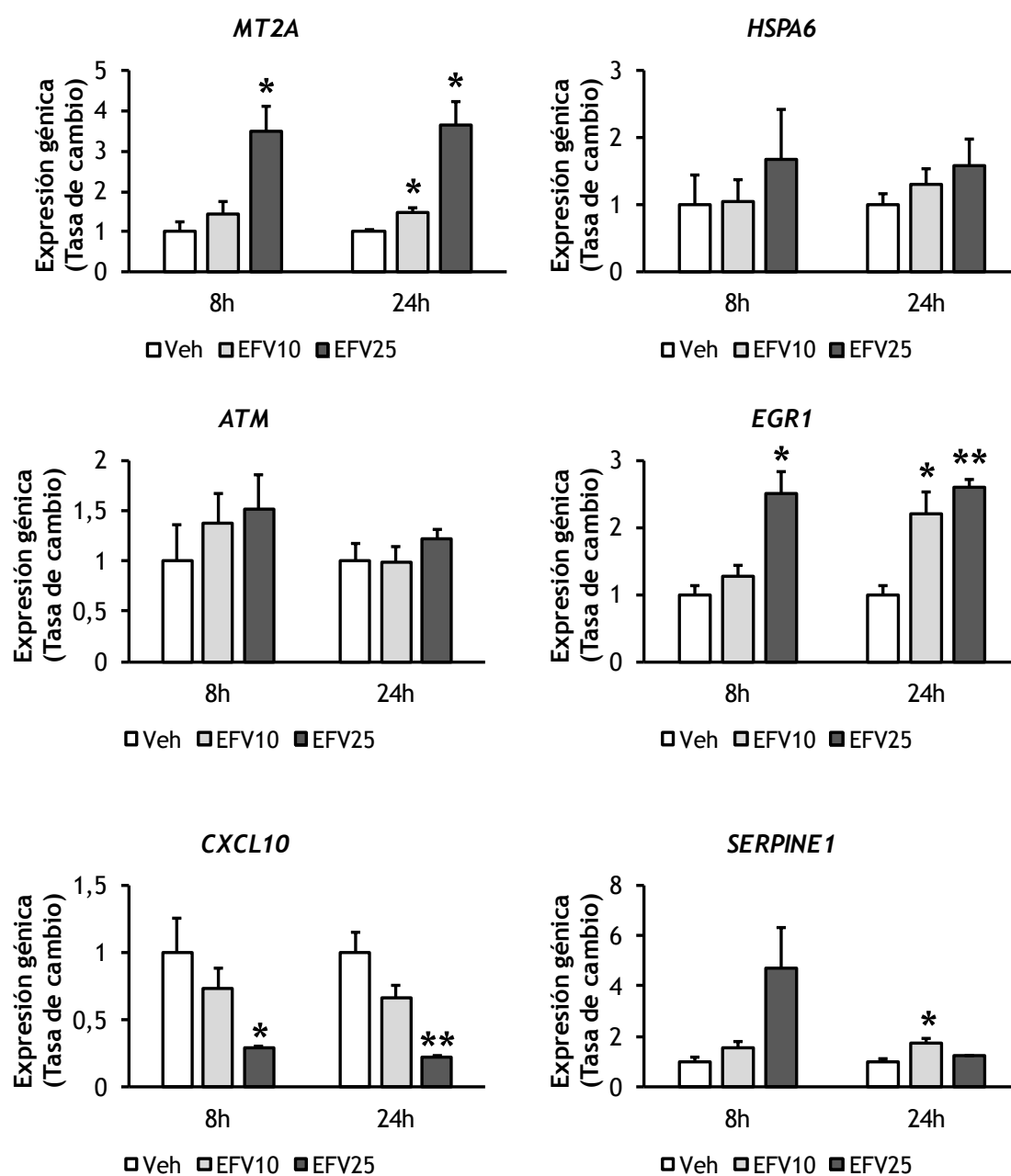


Figura IV.30. Validación de la micromatriz por RT-PCR en tiempo real de genes seleccionados después del tratamiento de células Hep3B con EFV 10  $\mu$ M y 25  $\mu$ M durante 8 h y 24 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de Ciclofilina A. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3-4). Son representados como tasa de cambio con respecto a las células tratadas con vehículo. El análisis se hizo con un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 con respecto al vehículo.

## 2.2. Validación de la expresión de proteína

Tomando en cuenta la evidencia antes mencionada de estrés oxidativo y daño mitocondrial en células hepáticas producido por EFV, es particularmente interesante el incremento en la expresión de *HSPA6* y *MT2A*. Para confirmar este resultado, se hizo un análisis de WB usando extractos proteicos totales. Este análisis mostró un aumento significativo en los niveles de proteína de *HSPA6* y *MT2A* después de 24 h de tratamiento con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  (Fig. IV.31.).

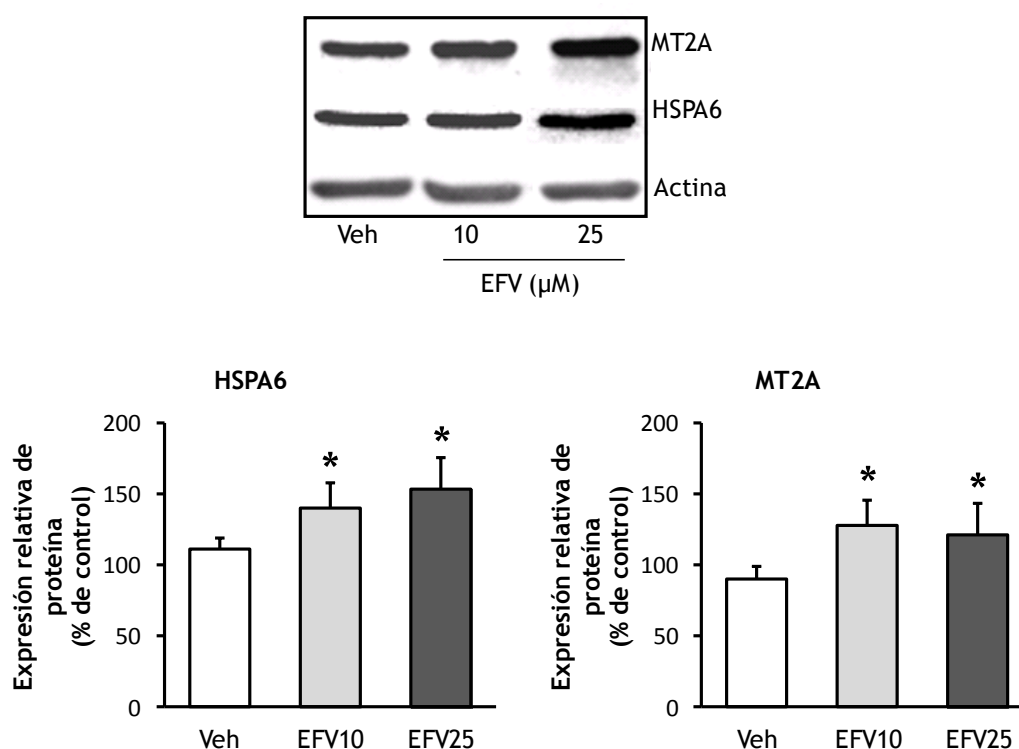


Figura IV.31. Validación de la micromatriz a nivel de proteína. Análisis por WB de la expresión de *HSPA6* y *MT2A* después del tratamiento de células Hep3B con 10  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  durante 24 h. La figura muestra imágenes representativas y un resumen de la densitometría. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=6-7). \*P<0,05 con respecto al vehículo.

### 2.3. Hepatocitos primarios humanos

Con el fin de descartar que el efecto observado estuviera relacionado con la línea celular (Hep3B), se hicieron varios experimentos confirmatorios usando hepatocitos primarios humanos. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real, tras el tratamiento con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  durante 24 h, mostraron un incremento en la expresión de *ATM*, *EGR1*, *HSPA6*, *MT2A* y *SERPINE1* mientras que los niveles del mRNA de *CXCL10* no cambiaron significativamente y solo presentaron una suave tendencia de disminución (Fig. IV.32.). Al evaluar la expresión proteica de *HSPA6* y *MT2A* mediante WB, se observó que ambas mostraron un aumento (Fig. IV.33.). Estos resultados confirman los previamente obtenidos con las células de la línea celular Hep3B.

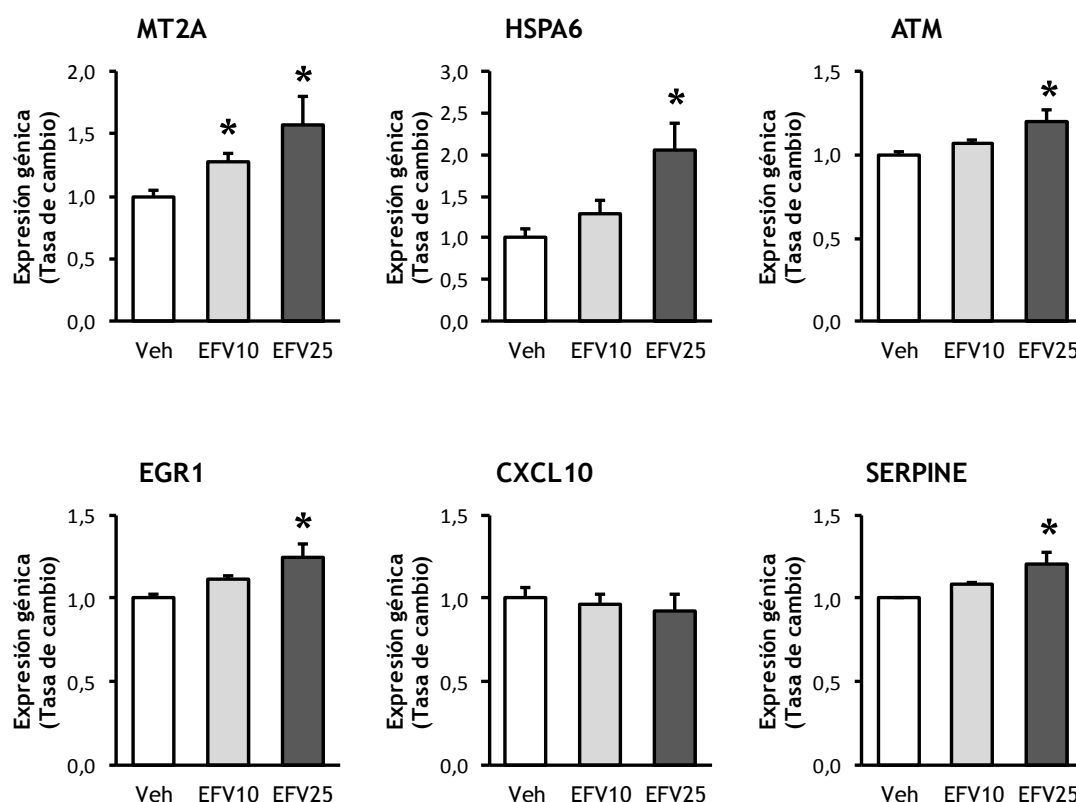


Figura IV.32. Validación de la micromatriz por RT-PCR en tiempo real. RT-PCR en tiempo real de genes seleccionados después del tratamiento de Hepatocitos primarios con EFV 10

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

$\mu\text{M}$  y  $25 \mu\text{M}$  durante 24 h. Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de Ciclofilina A. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3). Son representados como tasa de cambio con respecto a las células tratadas con vehículo. El análisis se hizo con un test T de Student \*P<0,05 con respecto al vehículo.

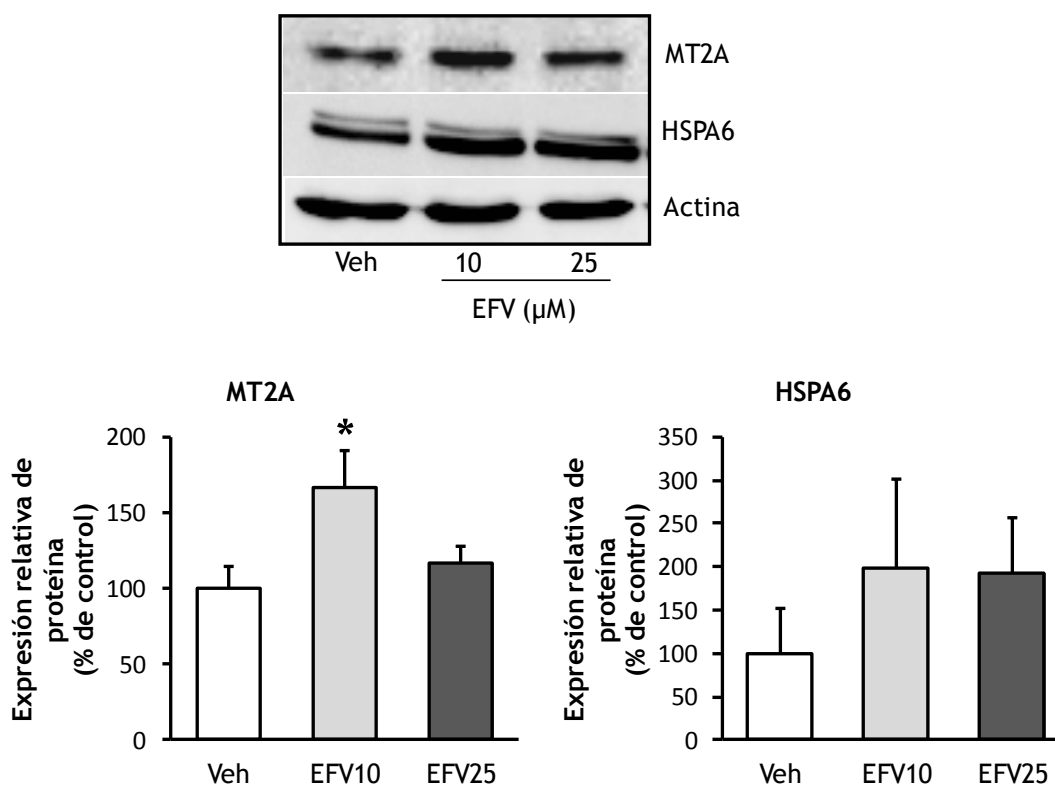


Figura IV.33. Validación de la micromatriz a nivel de la expresión de proteínas. Análisis por WB de la expresión de HSPA6 y MT2A después del tratamiento de Hepatocitos primarios con  $10 \mu\text{M}$  y  $25 \mu\text{M}$  durante 24 h. La figura muestra imágenes representativas y un resumen de la densitometría. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (n=3). \*P<0,05 con respecto al vehículo.

## **BLOQUE 4: ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

### **1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)**

El análisis detallado de los resultados obtenidos de de la micromatriz de ARN (Ver bloque 3) reveló una regulación al alta en ciertos genes relacionados con el proceso de estrés de RE o en la respuesta al mismo. Este fue el caso de *DDIT3/CHOP*, *DNAJB4*, *HSPA6 (HSP70B')* y *HSPD1*, razón por la cual se procedió a evaluar más a fondo la inducción de estrés de RE por EFV.

#### **1.1. EFV aumenta la expresión de proteínas relacionadas con estrés de retículo endoplasmático**

Para determinar si el tratamiento con EFV inducía estrés de RE, se trataron células Hep3B durante 8 y 24 h con EFV, usando como control positivo TG 2  $\mu\text{M}$  y se hizo un análisis por WB para determinar los niveles de CHOP, GRP78 y la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  (P-eIF2 $\alpha$ ). El tratamiento de 8 h se realizó con EFV 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ; pero como previamente se había señalado que EFV 50  $\mu\text{M}$  presenta un efecto apoptótico, esta concentración no se utilizó en los análisis posteriores. En el tratamiento de 24 h se utilizaron las concentraciones de EFV 5, 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$ . Con 8 h de tratamiento se vio un claro incremento concentración-dependiente en los niveles de CHOP, siendo EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$  estadísticamente significativos. GRP78 también se incrementó aunque no alcanzó significatividad estadística. En el caso de P-eIF2 $\alpha$ , los tratamientos con EFV 10 y 50  $\mu\text{M}$  fueron estadísticamente significativos, EFV 25  $\mu\text{M}$  no alcanzó la significatividad estadística, aunque muestra una clara tendencia (Fig. IV.34.). Después de 24 h de tratamiento, mientras que EFV 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$  incrementaron la expresión proteica de CHOP, GRP78 y P-eIF2 $\alpha$ , EFV 5  $\mu\text{M}$  no produjo cambios en ninguna de las proteínas analizadas (Fig. IV.35.). Por este motivo, en los análisis posteriores solo se emplearon EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$ .

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

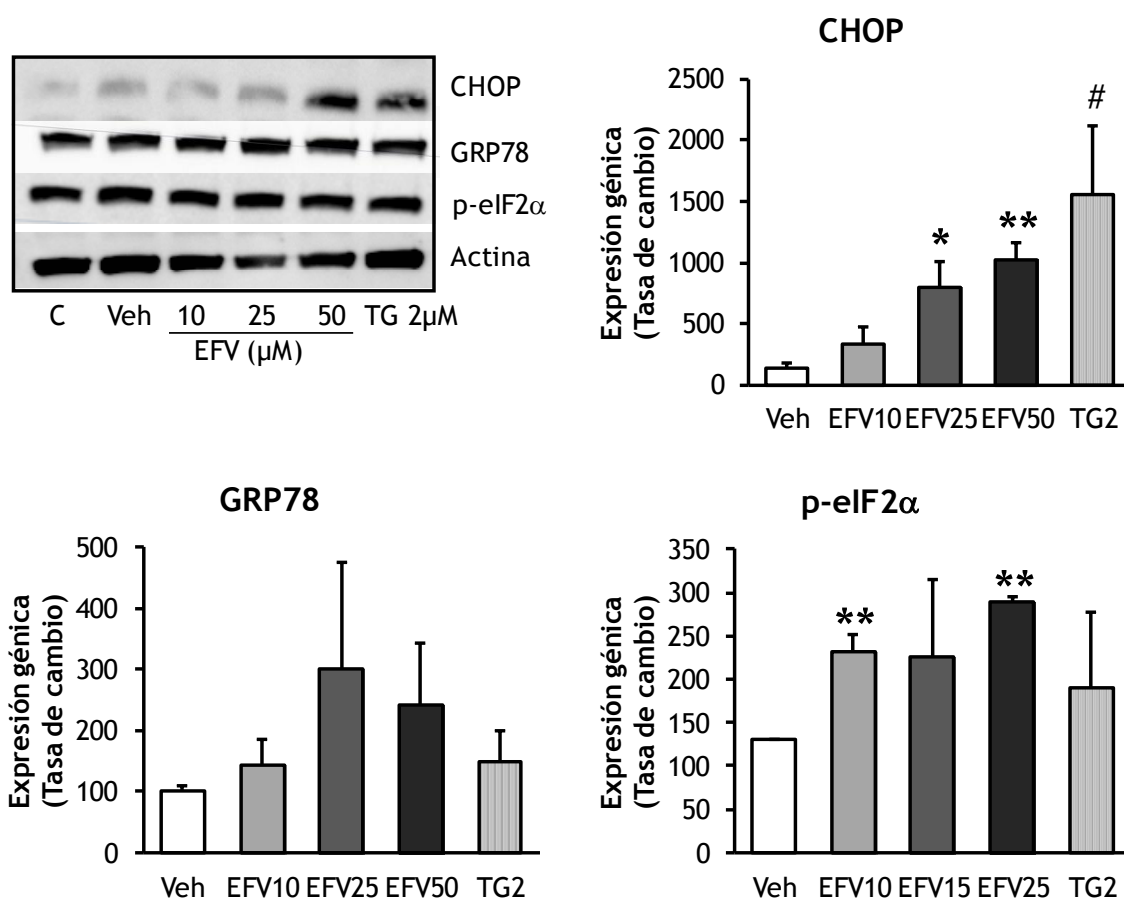


Figura IV.34. Análisis por WB de la expresión de los marcadores de estrés de RE CHOP, GRP78 y P-eIF2α después del tratamiento de células Hep3B con EFV 10, 25 y 50 μM durante 8 h. La figura muestra imágenes representativas y un resumen de la densitometría. Los resultados están expresados en media ± SEM (n=3). El análisis estadístico se realizó por un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente #P<0,05.



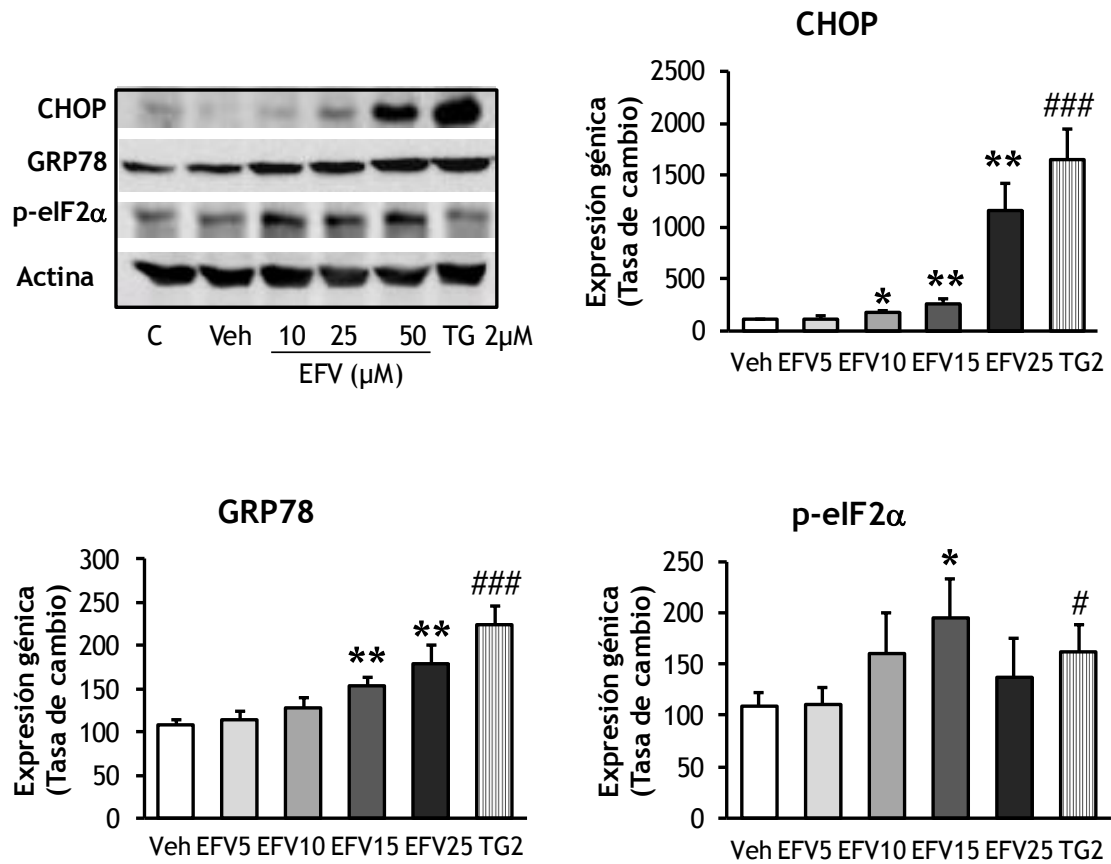


Figura IV.35. Análisis por WB de la expresión de los marcadores de estrés de RE CHOP, GRP78 y P-eIF2α después del tratamiento de células Hep3B con EFV 5, 10, 15 y 25 μM durante 24 h. La figura muestra imágenes representativas y un resumen de la densitometría. Los resultados están expresados en media ± SEM (n=8 excepto para EFV 5 μM n=3). El análisis estadístico se realizó por un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente #P<0,05, ###P<0,001.

## **1.2. Evaluación de los niveles de mRNA de genes indicadores de estrés de retículo endoplasmático**

Las células Hep3B fueron tratadas durante 24 h usando como control positivo TG 2  $\mu$ M, tras lo cual se analizaron los niveles de mRNA de *CHOP*, *GRP78*, *ATF $\alpha$*  y *XBP1* por medio de RT-PCR en tiempo real, y la edición post-transcripcional “splicing” de *XBP1* (s-*XBP1*), por RT-PCR semicuantitativa. El tratamiento con EFV incrementó el mRNA de todos estos genes de manera concentración-dependiente y el incremento fue estadísticamente significativo en casi todos los casos (Fig. IV.36.).

## **1.3. Determinación de los niveles citosólicos de calcio**

Por citometría estática se evaluaron los niveles de calcio citosólico de células Hep3B tratadas durante 6, 24 y 48 h con EFV y TG (control positivo) con la sonda fluorescente Fluo-4 AM. Después de 6 h de tratamiento no se detectó ningún cambio ni con el tratamiento con EFV ni con la TG. La exposición a EFV durante 24 h indujo un incremento concentración-dependiente en los niveles de calcio citosólico similar al observado en el tratamiento con TG. Después de 48 h el incremento de calcio inducido por EFV se mantuvo similar al observado a 24 h, mientras que el efecto de TG continuó incrementando (Fig. IV.37).

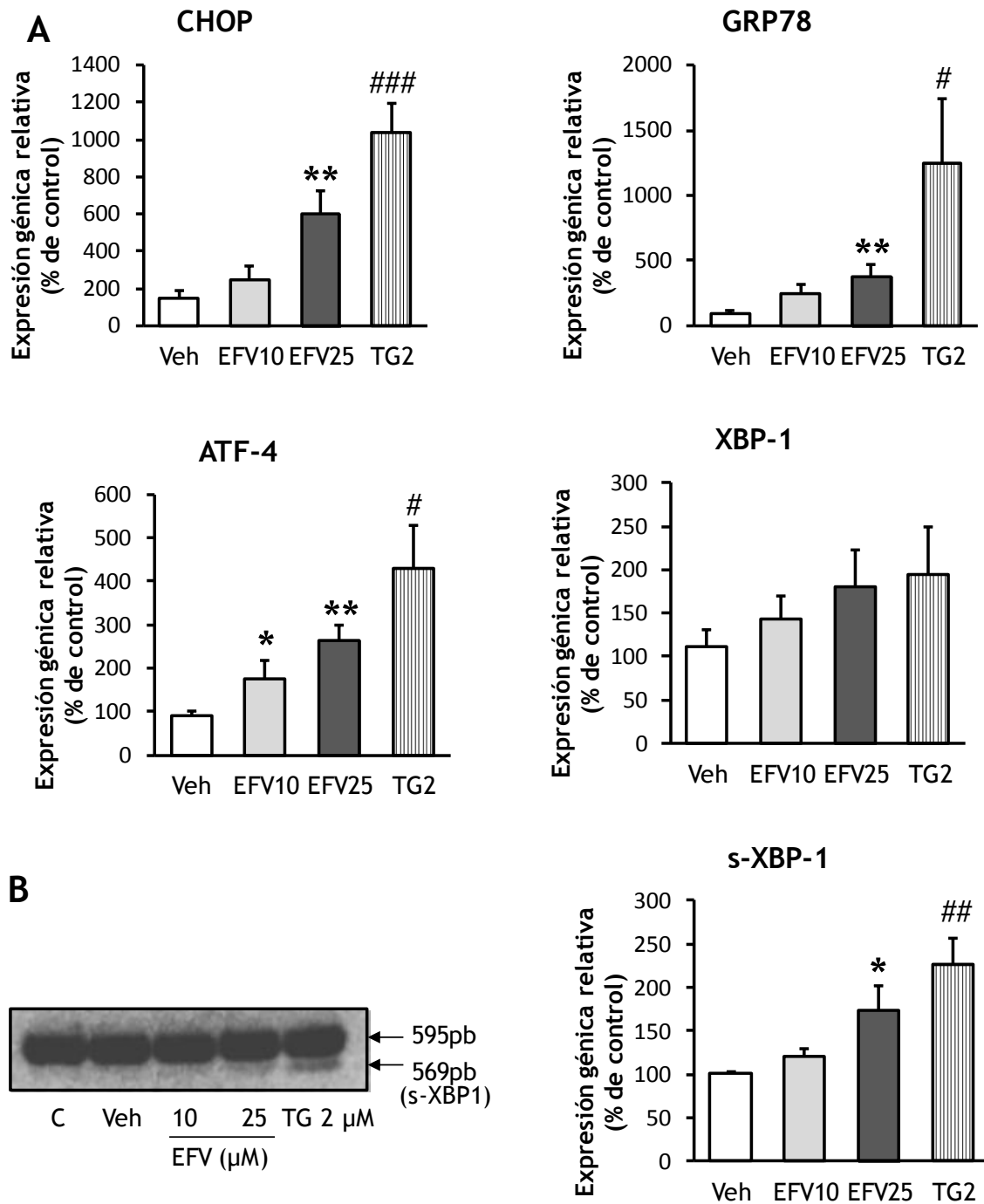


Figura IV.36. Análisis por PCR de la expresión de los marcadores de estrés de RE CHOP, GRP78, ATF4 y XBP-1 después del tratamiento de células Hep3B con EFV 10 y 25  $\mu$ M y TG 2  $\mu$ M durante 24 h. (A) RT-PCR cuantitativa. (B) RT-PCR semicuantitativa de s-XBP-1, la figura muestra una imagen representativa y un resumen de la densitometría de s-XBP-1

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

(569 pb). Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (CHOP n=7-8, GRP78 n=8, ATF4 n=4, XBP1 n=2, s-XBP-1 n=4) El análisis estadístico se realizó por un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente #P<0,05, ##P<0.01, ###P<0,001.

#### **1.4. Evaluación de la morfología y el contenido del retículo endoplasmático**

En células Hep3B expuestas a EFV durante 24 h, se cuantificó el contenido de RE y se evaluaron sus cambios morfológicos por medio de microscopía de fluorescencia y citometría estática, usando la sonda fluorescente ERtracker Red. Este experimento reveló un incremento concentración-dependiente de la señal fluorescente proveniente del RE con niveles similares a los obtenidos con el tratamiento con TG (Fig. IV.38 A).

El tratamiento con EFV también alteró la red del RE como se ve en las imágenes de microscopía confocal con el marcador fluorescente específico para el RE, ER-tracker Blue-White DPX. Se puede observar que la señal del RE en las células control era difusa, mientras que en las células tratadas con EFV era más intensa, compacta y reorganizada en cúmulos distribuidos especialmente en la periferia de las células que podrían ser nuevas membranas del RE. Con un mayor aumento se pudo observar una señal de RE punteada asociada al núcleo, un patrón descrito como dilatación de cisternas del RE que forman parte de la membrana interna de la envoltura nuclear, efecto inducido por estrés (Fig. IV.38 B).

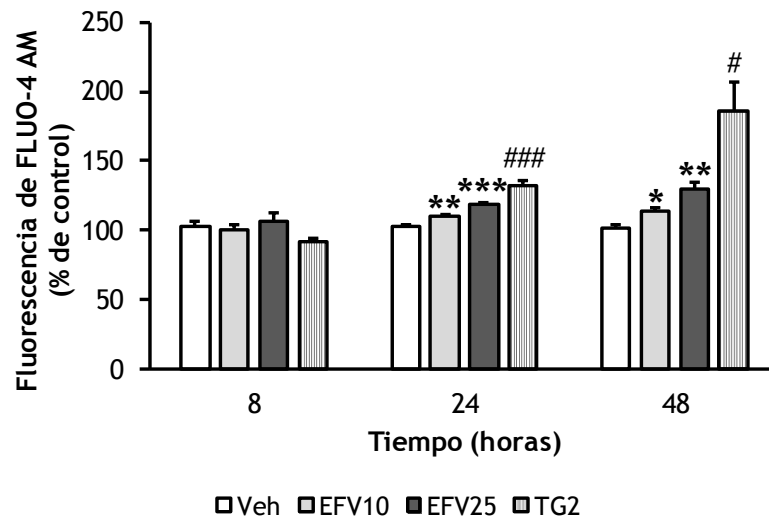


Figura IV.37. Análisis por medio de microscopía de fluorescencia de la concentración de calcio citosólico basado en la intensidad de fluorescencia de FLUO-4AM después del tratamiento de células Hep3B con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  y TG 2  $\mu\text{M}$  durante 6, 24 y 48 h. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM (6 h n=4-5, 24 h n=7-8, 48 h n=3) El análisis estadístico se realizó por un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente #P<0,05, ###P<0,001.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

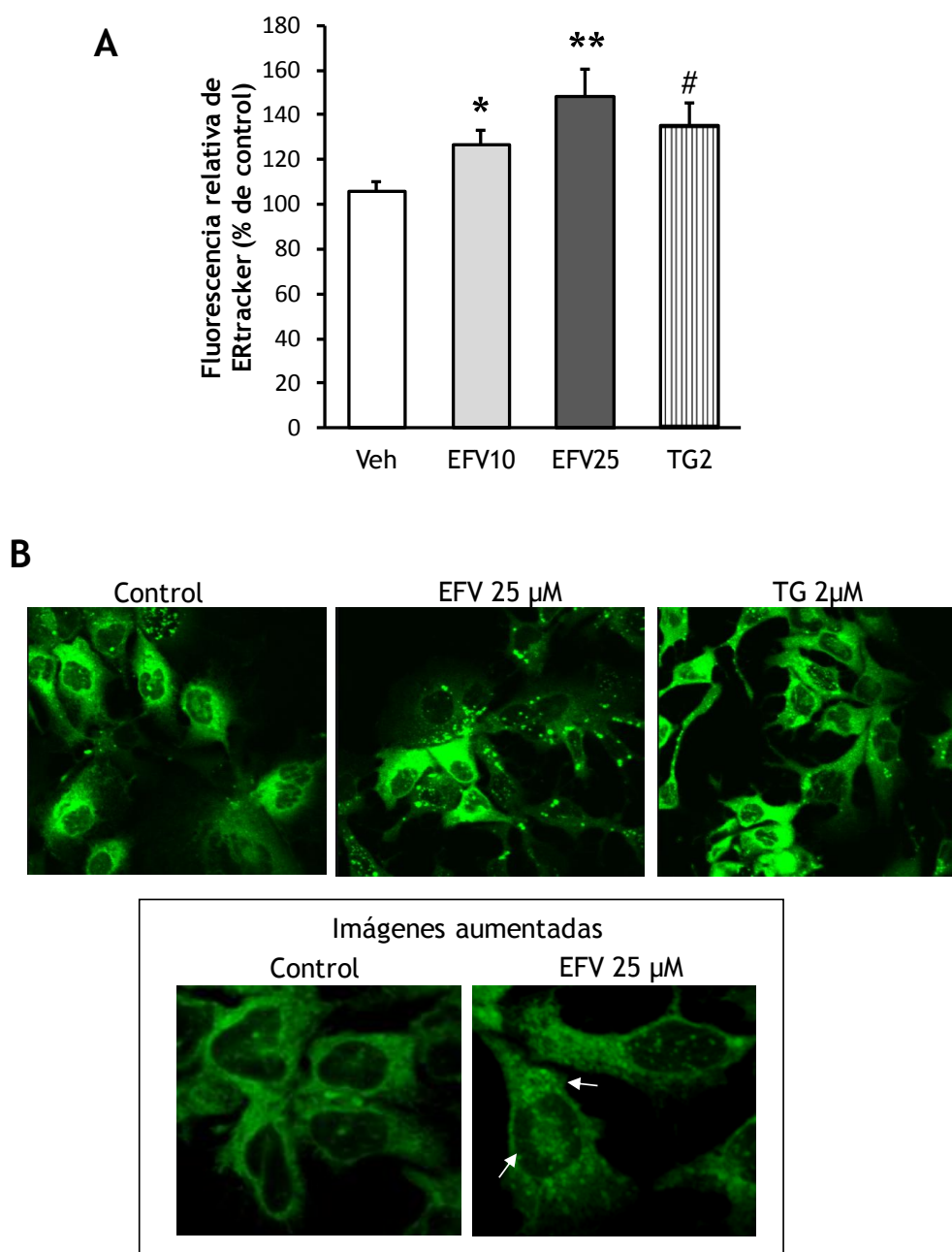


Figura IV.38. Análisis de la señal del RE. (A) Análisis cuantitativo de la señal de RE con la sonda ERtracker Red por medio de microscopía de fluorescencia después de 24 h de tratamiento en células Hep3B. Los resultados están expresados en media  $\pm$  SEM n=9 (las células no tratadas son consideradas el 100%). El análisis estadístico se realizó por un test T de Student \*P<0,05, \*\*P<0,01 respecto al vehículo. El control positivo fue analizado independientemente #P<0,05. (B) Imágenes del RE por microscopía de fluorescencia confocal después de 24 h de tratamiento usando la sonda ER tracker blue white DPX. Las

imágenes del panel superior fueron obtenidas con un aumento de 63X y las del panel superior con un zoom adicional de 2,5.

## 2. DIFERENCIACIÓN DEL PERFIL DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE EFAVIRENZ vs TAPSIGARGINA

Una caracterización adicional de la respuesta al estrés de RE inducido por EFV, reveló diferencias significativas con la respuesta a TG.

### 2.1. Activación de la caspasa 7

Se usaron células Hep3B tratadas durante 24 h con EFV y TG y por WB se evaluó la activación de la procaspasa 7. El tratamiento con EFV no indujo esta activación, mientras que con el tratamiento de TG se ve claramente la activación de la procaspasa 7 a caspasa 7 (Fig. IV.39.).

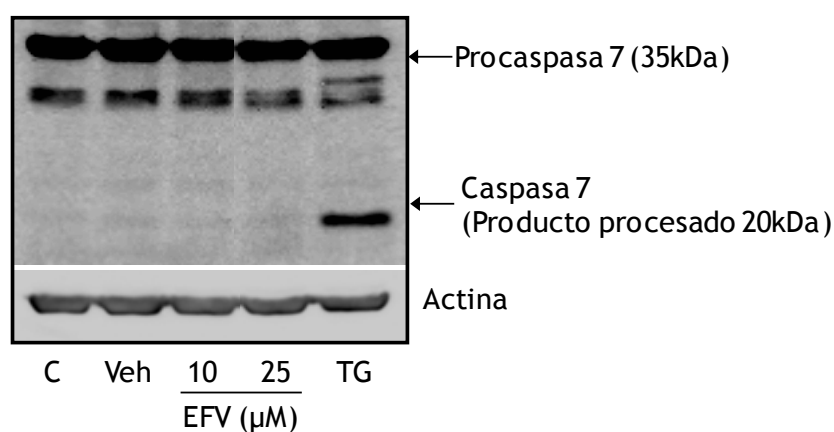


Figura IV.39. Análisis de la activación de la casp-7. Imagen representativa de un WB, mostrando la procaspasa 7 sin procesar y después la forma activa (casp-7) después de 24 h de tratamiento.

## **2.2. Silenciamiento de CHOP**

CHOP se silenció de forma transitoria en las células Hep3B. La expresión residual, evaluada por WB, fue de un 20% (Fig. IV.40 A). En las células silenciadas (siCHOP) y tratadas durante 24 h con EFV o TG se evaluó, por citometría estática, la producción de ión superóxido mitocondrial, el contenido de RE y la proliferación. Estos parámetros se compararon con los obtenidos en células no silenciadas (siControl). No se encontraron diferencias significativas en la producción de superóxido mitocondrial sin embargo, el tratamiento con TG si provocó diferencias significativas, mostrando un incremento en este parámetro en las células siCHOP (Fig. IV.40 B). La señal del RE no presentó diferencias significativas entre células siCHOP y células no silenciadas tratadas con EFV, pero si hubo una diferencia significativa al tratarlas con TG, presentándose un mayor incremento de la señal en células siCHOP (Fig. IV.40 C). No se encontraron diferencias entre la proliferación de células siCHOP y siControl con ninguno de los tratamientos empleados (Fig. IV.40 D).

## **2.3. Diferencias en la dinámica del calcio intracelular entre efavirenz y tapsigargina**

Los resultados de la activación de la procaspasa 7 y del siCHOP, sugieren diferencias entre el estrés de RE inducido por EFV y TG. Para confirmarlas se hizo un análisis más exhaustivo de la dinámica del calcio en células tratadas con EFV vs TG.



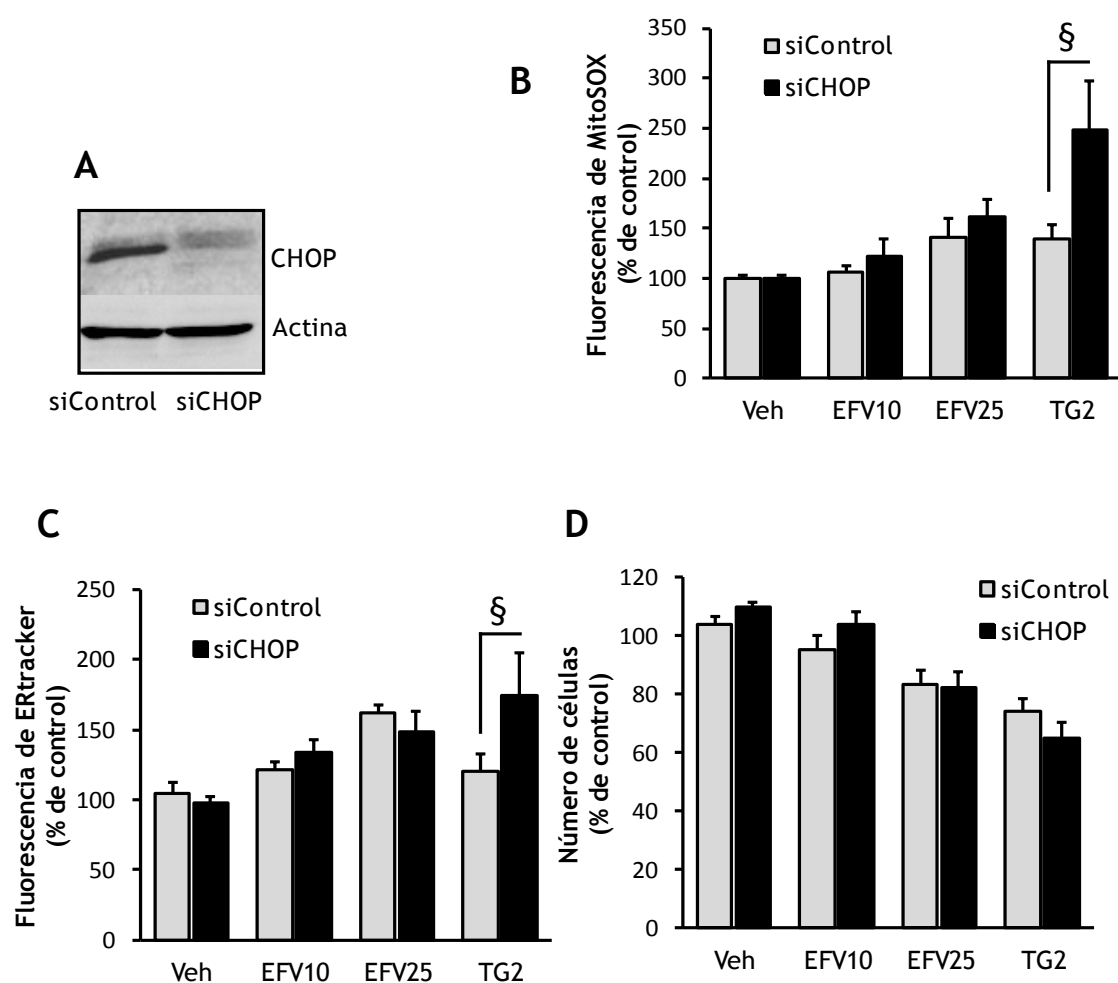


Figura IV.40. Silenciamiento de CHOP. (A) Imagen representativa de WB de CHOP en células siControl y siCHOP 3 días después de la transfección. (B) Análisis de la producción de superóxido usando la sonda fluorescente MitoSOX. (C) Análisis cuantitativo de la señal de RE usando la sonda fluorescente ERTracker Red. (D) Evaluación del número de células usando la sonda fluorescente Hoechst 33342. B, C y D se llevaron a cabo usando microscopía fluorescente acoplada a citometría estática en células siControl y siCHOP después de 24 h de tratamiento. Los datos están representados como  $medis \pm SEM$ ,  $n=4$ ; las células siControl y siCHOP sin tratamiento son consideradas el 100%. El análisis estadístico se realizó por un test T de Student  $\S P<0,05$  versus el mismo tratamiento en células siControl.

### **2.3.1. Cinética del calcio citosólico**

Como ya se mostró en la Fig. IV.36., el tratamiento de células Hep3B con EFV o TG durante 24 h produce un incremento de la concentración de calcio citosólico. Para determinar su origen se diseñó un protocolo específico con el cual después de 24 h de tratamiento con EFV o TG, se evaluó la respuesta a la aplicación adicional de TG (TG 5  $\mu\text{M}$ ).

Las células tratadas con TG 2  $\mu\text{M}$  durante 24 h, presentaron un incremento en sus niveles basales de calcio citosólico que no se vio modificado con la adición aguda de TG 5  $\mu\text{M}$ . Este no fue el caso de EFV, ya que las células tratadas con EFV durante 24 h presentaron un incremento en el calcio citosólico después de la adición aguda de TG 5  $\mu\text{M}$ ; sugiriendo que el incremento de calcio basal inducido por EFV se da por a un mecanismo diferente o a partir de un reservorio diferente al utilizado por TG (Fig. IV.41 A).

### **2.3.2. Determinación de los niveles de calcio mitocondrial**

Ya que la mitocondria es un importante regulador del calcio celular, se evaluó el efecto de EFV sobre el contenido mitocondrial de este ion. En células Hep3B se hizo un ensayo fluorimétrico usando el marcador rhod-5N AM y tratando las células de manera aguda con EFV, TG y CCCP. El tratamiento con EFV indujo una disminución en la señal fluorescente proveniente del calcio mitocondrial, de una manera similar a la observada en el tratamiento con CCCP. El tratamiento con TG bajo las mismas condiciones, produjo un incremento en la concentración del calcio mitocondrial (Fig. IV.41 C).

Estos hechos soportan la idea que TG y EFV modulan el calcio celular de diferente manera, lo cual explica la inducción de diferentes respuestas al estrés de RE.

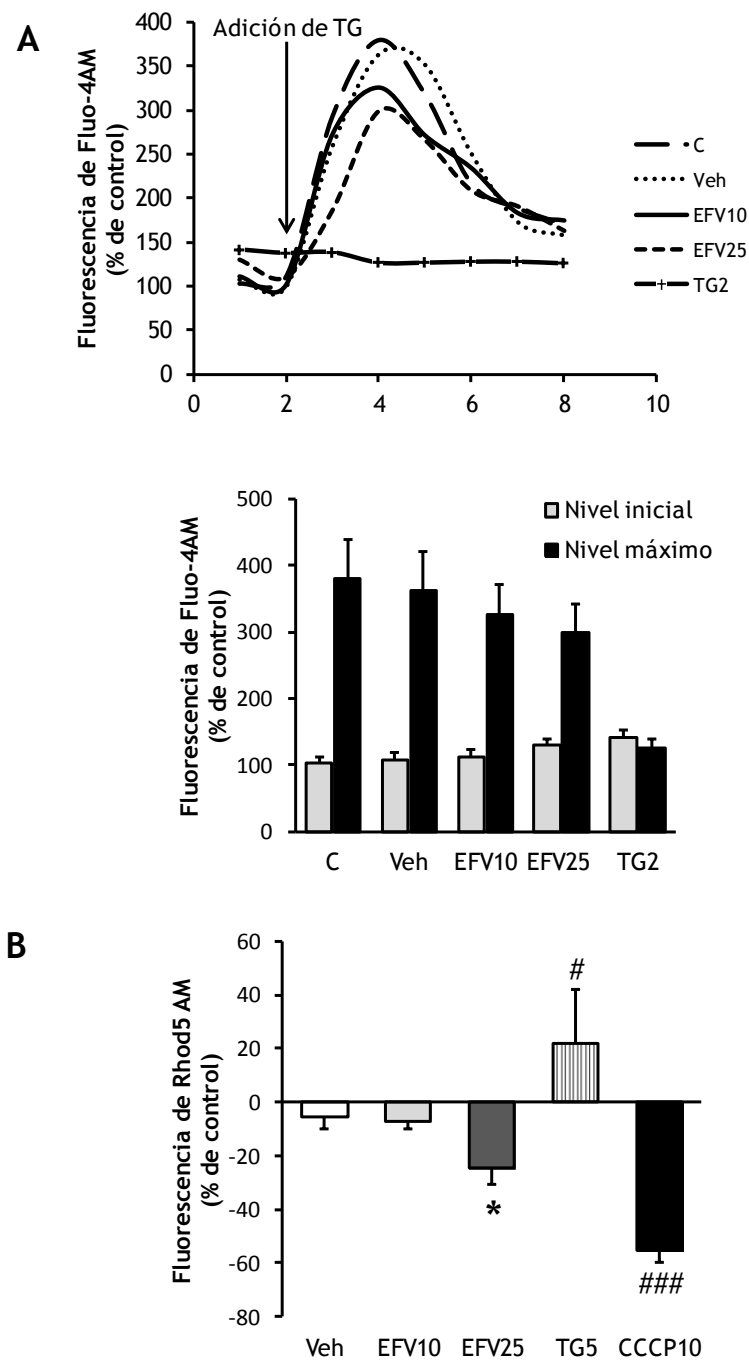


Figura IV.41. Reservorios de calcio intracelular. (A) Cambios en la concentración del calcio intracelular inducidos por la inhibición directa del flujo del calcio del RE por la adición de TG 5  $\mu$ M en células tratadas previamente durante 24 h. Los datos (Fluo 4AM) son mostrados como media  $\pm$  SEM n=3, la fluorescencia medida en las células sin tratamiento es considerada el 100% (Calcio basal citosólico) (B) Determinación

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

fluorimétrica de la concentración del calcio mitocondrial después de 20 minutos de tratamiento. Los datos (rhod-5N AM) son mostrados como media  $\pm$  SEM, n=6, las células sin tratamiento son consideradas el 100%. El análisis estadístico se realizó por un test T de Student: \*P<0,05 versus vehículo; TG y CCCP se analizaron por separado #p<0,05, ###p<0,001 versus células sin tratar.

## 3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUCIDO POR EFAVIRENZ

Para confirmar la implicación de la mitocondria en la respuesta al estrés de RE inducido por EFV, se estudió su efecto en el modelo de células Hep3B Rho<sup>0</sup>, que presentan mitocondrias no funcionales. El fenotipo del modelo Rho<sup>0</sup> se evaluó por medio de la proliferación de estas células en medio de cultivo con glucosa o galactosa. Las células Rho<sup>0</sup> presentaron una tasa de proliferación basal significativamente menor que las células Rho<sup>+</sup> y fueron incapaces de proliferar usando galactosa en lugar de glucosa (Fig. IV.42 A). Este resultado se corroboró por WB, evaluando la expresión de COX II, proteína codificada por mtADN, que desapareció casi por completo en células Rho<sup>0</sup> (Fig. IV.42 B).

### 3.1. Marcadores de estrés de retículo endoplasmático en células Rho<sup>0</sup>

Las células Hep3B Rho<sup>0</sup> y Rho<sup>+</sup> fueron tratadas durante 24 h, tras lo cual se evaluó la expresión de CHOP y GRP78 a nivel de proteína por WB y de mRNA por RT-PCR en tiempo real y el contenido de RE por citometría estática. Los niveles basales (tanto de proteína como de mRNA) de CHOP y GRP78 no fueron modificados en las células Rho<sup>0</sup>. Después del tratamiento con EFV, la inducción de CHOP y GRP78 por EFV fue sustancialmente menor en las células Rho<sup>0</sup> que en las células Rho<sup>+</sup> (Fig. IV.43.). Al evaluar la señal del RE, no se detectó ningún incremento en la señal de la fluorescencia (Fig. IV.44.) en las Rho<sup>0</sup> a diferencia del detectado en células Rho<sup>+</sup> (ver Bloque 4, sección 0).

Estos resultados sugieren que la mitocondria está involucrada en la respuesta al estrés de RE inducido por el tratamiento con EFV.

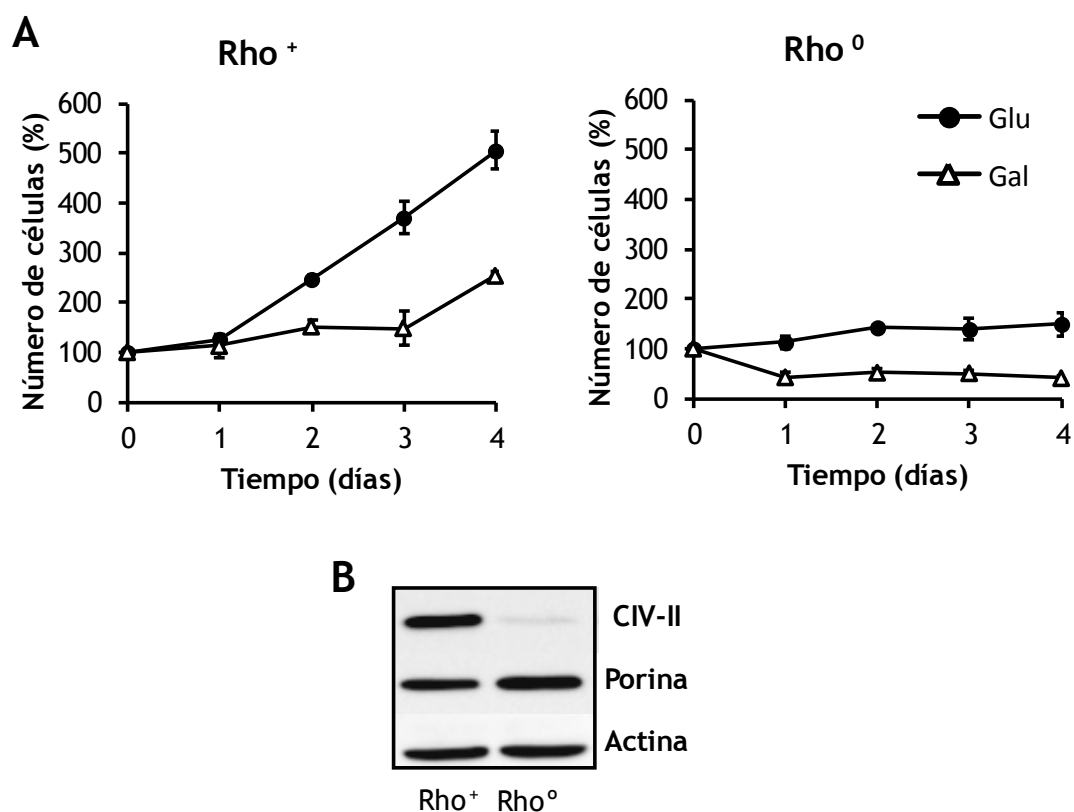
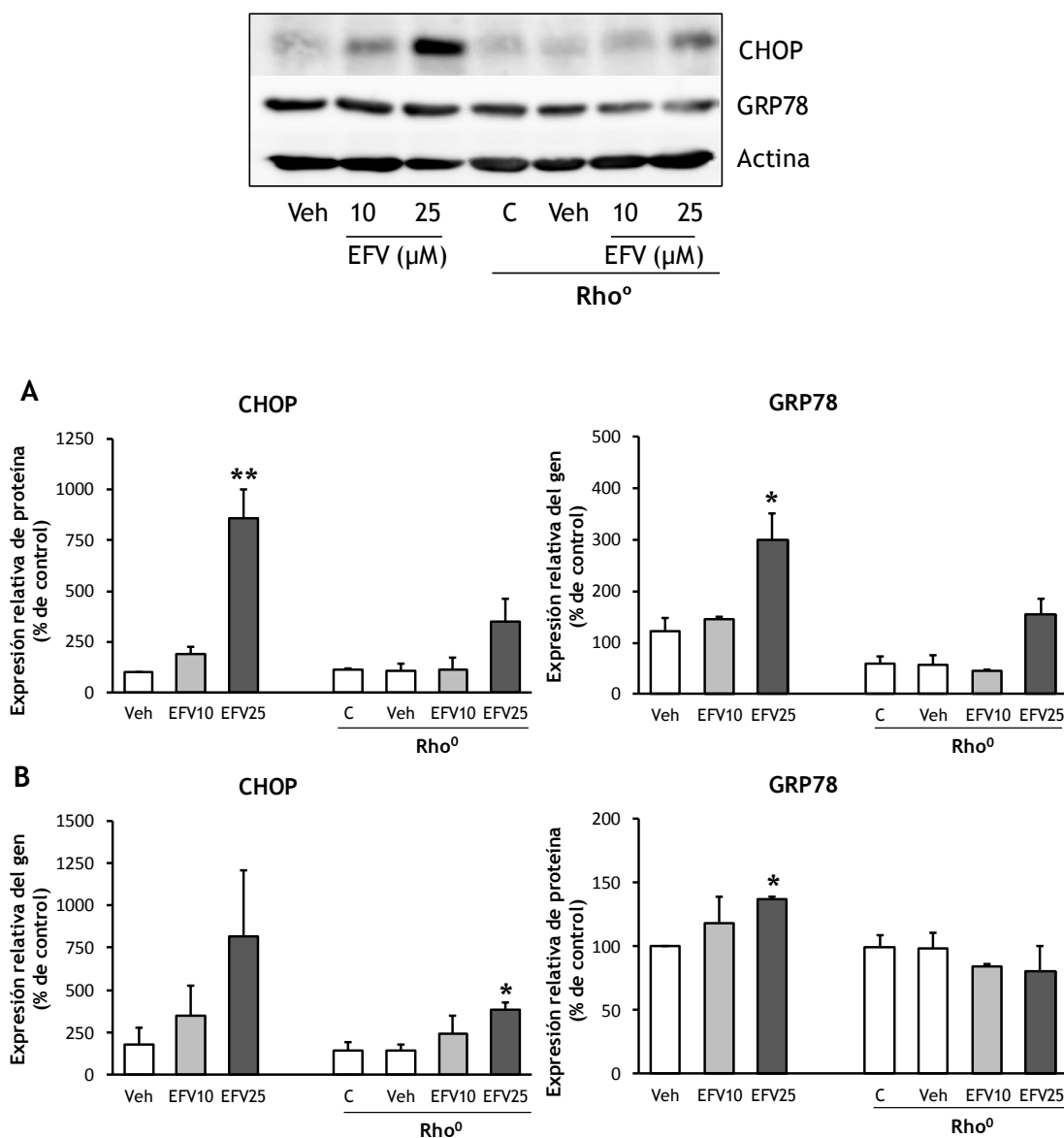


Figura IV.42. Determinación de fenotipo Hep3B Rho<sup>0</sup>. (A) proliferación de células Rho<sup>+</sup> y Rho<sup>0</sup> durante 4 días, en medio de cultivo suplementado con glucosa o galactosa, evaluada por citometría estática con el marcador fluorescente Hoechst 33342. Los resultados son representados como número relativo de células (media  $\pm$  SEM, n=3), el número inicial de células (día 0) es considerado el 100%. (B) Imagen representativa de WB, donde se pueden ver las proteínas CIV-II y porina en células Rho<sup>+</sup> y Rho<sup>0</sup>.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**



**Figura IV.43. Marcadores de estrés de RE en células Rho<sup>0</sup>.** (A) Imágenes representativas con su respectiva densitometría y (B) Análisis por RT-PCR cuantitativa de CHOP y GRP78 después de 24 h de tratamiento. Los datos (media ± SEM, n=3) son mostrados como expresión de proteína o contenido de mRNA, en relación a células sin tratamiento en cada experimento (las células control Rho<sup>+</sup>, son consideradas el 100%). El análisis estadístico se realizó por un test T de Student: \*P<0,05, \*\*P<0,001, versus vehículo.

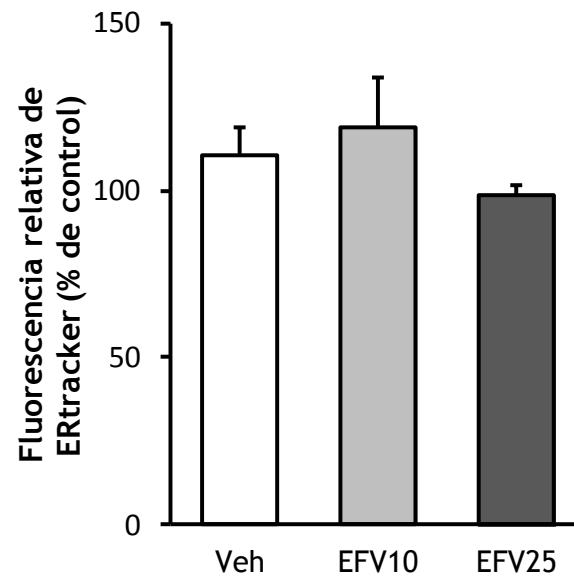


Figura IV.44. Análisis cuantitativo de la intensidad de la señal del RE en células Rho<sup>0</sup>, evaluado por microscopía de fluorescencia acoplada con citometría estática, usando la sonda fluorescente ERtracker Red. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n=4, las células no tratadas se consideraron el 100%.





## **V. DISCUSIÓN**



En los últimos años, en los países desarrollados, la infección por VIH ha pasado de ser una enfermedad mortal a convertirse en una enfermedad crónica. Este importante avance ha sido posible gracias al uso de la terapia combinada TARGA. Ya que este tratamiento una vez comenzado se tiene que tomar a lo largo de toda la vida, existe un interés creciente acerca de los efectos adversos a largo plazo relacionados con el uso de esta terapia de los cuales el daño hepático es uno de los efectos secundarios más frecuentes.

Existe una clara asociación entre concentraciones plasmáticas de EFV y efectos hepáticos adversos y cerca del 10% de los pacientes VIH positivos tratados con EFV muestran un incremento en enzimas hepáticas, lo que puede llevar a la discontinuación de la terapia (Abrescia *et al.*, 2005; Brück *et al.*, 2008; Kappelhoff *et al.*, 2005; Pandit *et al.*, 2012). Además, es conocido que el potencial de hepatotoxicidad incrementa con la presencia de coinfección con VHB/VHC (Brück *et al.*, 2008; Healy *et al.*, 2013; Hernandez and Sherman, 2011; Joshi *et al.*, 2011; Núñez, 2010). Esto es de gran relevancia ya que se estima que el 20 - 30% de los pacientes infectados con HIV también están infectados con VHC (Hernandez and Sherman, 2011).

Debido a la naturaleza de la TARGA y a la variabilidad interindividual, es muy difícil evaluar por separado los efectos adversos producidos por cada fármaco, hecho por el cual los estudios *in vitro* se convierten en una herramienta clave. Aunque un sistema estático de células *in vitro* es claramente diferente de la situación fisiopatológica presentada *in vivo*, en este trabajo se procuró que los parámetros experimentales fueran lo más semejantes posibles a las condiciones fisiológicas. Para el desarrollo experimental se eligió la línea celular de hepatoma humano Hep3B, la cual tiene un sistema P450 activo (Zhu *et al.*, 2007), necesario para la metabolización del EFV. Para determinar si los efectos observados eran dependientes de la línea celular utilizada, se realizaron algunos experimentos en las líneas celulares HeLa y HUVEC y para una aproximación más fisiológica, varios experimentos se reprodujeron usando hepatocitos humanos primarios. El rango de concentraciones de EFV

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

empleadas (entre 5 y 50  $\mu\text{M}$ ), fue escogido tomando en cuenta la importante variabilidad individual descrita para su farmacocinética. La dosis de EFV diaria recomendada para adultos es de 600 mg, resultando normalmente en niveles plasmáticos de 3,17 a 12,67  $\mu\text{M}$  (Starr *et al.*, 1999; Staszewski *et al.*, 1999), sin embargo, varios estudios clínicos han mostrado que hasta 20% de los pacientes exhiben valores más elevados, llegando a valores de 30 - 50  $\mu\text{M}$  (Burger *et al.*, 2006; Marzolini *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2001). Además hay numerosas publicaciones que describen interacciones con ciertos fármacos co-administrados durante el tratamiento de HIV-1, los cuales resultan en un incremento significativo en la  $C_{\text{max}}$  de EFV (Ficha técnica o resumen de las características de Sustiva, 2012). También se ha descrito que pacientes con coinfecciones HIV-HCV presentan hasta el doble de las concentraciones plasmáticas presentes en pacientes infectados solo con HIV (Dominguez *et al.*, 2010).

En este trabajo observamos que EFV reduce la proliferación y viabilidad de células Hep3B a través de un efecto mitotóxico agudo. Este efecto fue rápido y dependiente de la concentración, como se pudo ver EFV 10  $\mu\text{M}$  indujo algunos cambios sobre las células y EFV 50  $\mu\text{M}$  mostró ser extremadamente tóxico. Los efectos inhibitorios de EFV sobre la proliferación y la viabilidad celular no fueron específicos de las células hepáticas ya que en las otras dos líneas celulares evaluadas (HeLa y HUVEC) su efecto fue incluso más pronunciado. Estos resultados indican que los efectos terapéuticos de EFV son manifestados dentro de un estrecho rango de concentraciones y sugiere que los fármacos pueden ser peligrosos para otros tejidos.

Nuestros resultados contribuyen a ampliar la limitada y a veces contradictoria información acerca de los efectos de EFV sobre la toxicidad celular. Por ejemplo, se ha descrito que la incubación con EFV 12,4  $\mu\text{M}$  durante varias semanas no reduce la proliferación de células HepG2 (Walker *et al.*, 2002). La discrepancia entre estos estudios y los resultados obtenidos en el presente trabajo con células Hep3B, puede ser debida a las diferencias metabólicas

entre las dos líneas celulares tales como la ausencia del citocromo P450 activo en las células HepG2 (Zhu *et al.*, 2007). Por el contrario, 7 días en presencia de EFV 10 o 20  $\mu\text{M}$ , resultó en una disminución significativa en el crecimiento celular de las líneas ARO y FRO de carcinoma de tiroides, disminución que fue atribuida a cambios en el ciclo celular (Landriscina *et al.*, 2005). Además, también se ha descrito que EFV induce apoptosis dependiente de la mitocondria y de caspasas en células Jurkat T y células mononucleares de sangre periférica humana en diferentes franjas de tiempo (Pilon *et al.*, 2002).

Debido a que se ha descrito una relación directa entre apoptosis y hepatotoxicidad (Labbe *et al.*, 2008; Malhi and Gores, 2008; Walters *et al.*, 2009), y a que hay una amplia lista de compuestos proapoptóticos asociados con enfermedades hepáticas (Labbe *et al.*, 2008; Malhi and Gores, 2008); es relevante la evaluación de la relación entre EFV y apoptosis. En nuestro estudio, las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$ , desplegaron rasgos claros de apoptosis, tales como la exposición de fosfatidilserinas en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la traslocación de las proteínas mitocondriales relacionadas con apoptosis (Cyt c, AIF y Smac/DIABLO). Además, también presentaron modificaciones del ciclo celular características de apoptosis, como un incremento en la población subG1 aparte la detención del ciclo en G2M. La activación de las casp-3 y casp-9 pero no de la casp-8 en las células tratadas con EFV sugieren la activación de la vía intrínseca de apoptosis (Danial and Korsmeyer, 2004; Li and Yuan, 2008).

Se ha descrito que las alteraciones en la fisiología mitocondrial y el estrés oxidativo inducidos por daño celular constituyen un evento central en la apoptosis (Murphy, 2009; Valko *et al.*, 2006). En nuestro caso, observamos un incremento en la producción de superóxido mitocondrial dependiente del tiempo y de la concentración que se daba de forma paralela a una caída del  $\Delta\psi_m$  y era seguida por una reducción en el contenido de GSH intracelular. Es de especial relevancia, el hecho de que el tratamiento con el antioxidante

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Trolox, mejorara la supervivencia celular. Todo esto sugiere que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la toxicidad celular inducida por EFV.

Recientemente, en un estudio realizado en el mismo modelo, células Hep3B y hepatocitos primarios, se ha descrito que EFV produce un efecto inhibitorio directo sobre la respiración mitocondrial a nivel del complejo I de la CTE acompañado de un incremento en la producción de ERO y una disminución de los niveles de ATP. Debido a que estos cambios ocurrieron después de una corta exposición al fármaco (1 h) no se relacionaron con variaciones en la expresión de genes o con el número de mitocondrias ya que estos aparecen después de periodos de tiempo mucho más largos. Hasta ahora, se pensaba que estos eran los únicos mecanismos de toxicidad mitocondrial de fármacos antirretrovirales (Blas-Garcia *et al.*, 2010). Ésta hipótesis es reforzada por el hecho de que las modificaciones en la función mitocondrial observada por nosotros, fueron revertidas después de la remoción del fármaco.

Es interesante el hecho de que algunos efectos mitocondriales inducidos por EFV, fueran obtenidos con concentraciones que no provocan la muerte celular dentro del rango de tiempo empleado en nuestros experimentos. Es posible que el efecto de las concentraciones más bajas de EFV empleadas por nosotros, sea acumulativo y que por lo tanto sea necesario monitorearlas durante un periodo de tiempo mayor para que el daño sea visible. Sin embargo, también es factible que estos efectos puedan representar niveles de estrés inferiores a los necesarios para inducir apoptosis, pero que se convierten en proapoptóticos en presencia de otros estímulos que comprometan también la mitocondria. Esto puede ser relevante, ya que la mayoría de los casos de hepatotoxicidad relacionados con EFV cursan con comorbilidades que al igual que EFV, interfieren con la función mitocondrial. El umbral de concentraciones en el cual EFV induce estrés mitocondrial puede variar también dependiendo del tipo celular en el cual sea evaluado. El hecho

de que el efecto del EFV fuera más pronunciado en hepatocitos primarios humanos que en células Hep3B es de especial relevancia clínica.

Se podría pensar que el incremento de la masa mitocondrial (sugerido por el aumento en el contenido de cardiolipina en Hep3B, el incremento en la expresión de la proteína mtdsRed en HeLa y el incremento de la expresión de proteínas mitocondriales en Hep3B) inducido por EFV 50  $\mu\text{M}$ , fuera una respuesta al estrés, para cubrir los requerimientos energéticos de la célula y para reparar daños celulares (Lee and Wei, 2005). Sin embargo, el hecho de que dicho incremento no se correlacionara con un aumento en el ratio del número de copias de mtADN/nADN y de que el análisis de la morfología mitocondrial por MET mostrara una gran afectación en la estructura así como una reducción del número de las mitocondrias dependiente de la concentración de EFV, es un claro indicativo de que no se trata de una verdadera biogénesis mitocondrial. De hecho, el incremento de la masa mitocondrial fue acompañado por un aumento de la apoptosis, indicando que en nuestro modelo, este incremento no es completamente funcional.

El incremento en los niveles de las proteínas Beclina 1 y LC3-II, así como la evaluación de la formación de autofagolisosoma, sugieren que EFV induce autofagia y que esta es dependiente de la concentración. Sin embargo, es importante anotar que el aumento de los niveles de LC3-II, no solo ha sido asociado con un incremento en la síntesis del autofagosoma, sino también con una degradación reducida del mismo. El análisis morfológico por MET reveló que las mitocondrias de las células tratadas con EFV 25 y 50  $\mu\text{M}$ , se encontraban rodeadas por una doble membrana, lo que podría indicar mitofagia. La inducción de mitofagia fue confirmada al evaluar la colocalización de la señal del lisosoma con la de la mitocondria. Curiosamente, esta respuesta no fue dependiente de la concentración ya que las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$  presentaban una menor colocalización. Es interesante además el hecho de que en estas células, la señal del lisosoma estuviera incrementada. Todo esto podría ser un indicador de un bloqueo de

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

la autofagia en las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$ . Efectivamente, un análisis del flujo autofágico reveló que las células tratadas con EFV 50  $\mu\text{M}$ , presentaban un retraso o inhibición en el flujo autofágico, una condición que también es conocida como “estrés autofágico”. Este efecto puede ser debido a una fusión reducida entre compartimentos y/o impedimento de la proteólisis mitocondrial. Este resultado también puede explicar el incremento en la masa mitocondrial observado con EFV 50  $\mu\text{M}$ , ya que la remoción defectuosa de mitocondrias puede resultar en un aparente incremento de la masa de estas organelas.

Se sabe que la autofagia se relaciona con la muerte celular, pero aun no está muy bien establecido como funciona esta relación. Estrés o algunas señales de daño pueden activar tanto autofagia como vías de muerte celular, en las cuales el papel de la autofagia puede variar dependiendo del contexto (Kondo *et al.*, 2005; Lum *et al.*, 2005; Reggiori and Klionsky, 2005). Es importante recordar que EFV 50  $\mu\text{M}$ , además de producir autofagia, también induce apoptosis en células Hep3B. Aún no está completamente claro como se relaciona la apoptosis con el estrés autofágico en nuestro modelo, sin embargo, podemos especular que ambos fenómenos están fuertemente asociados, ya que la inhibición farmacológica de la autofagia incrementa la actividad apoptótica de EFV, sugiriendo que la autofagia podría actuar como un mecanismo de supervivencia celular. En varios trabajos se ha sugerido la existencia de una compleja relación entre autofagia y apoptosis inducidas por varios xenobióticos como imiquimod en células basales de carcinoma (Huang *et al.*, 2010) u oridonid en células HeLa (Cui *et al.*, 2007) y es de anotar, que en ambos casos, la inhibición de la autofagia promueve apoptosis, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Aun no se conoce muy bien el papel que juega la autofagia en la patofisiología del hígado, especialmente relacionada con la hepatotoxicidad inducida por xenobióticos (Rautou *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha documentado que en hepatocitos bajo diversas condiciones, se da el secuestro



de varios compartimentos subcelulares. Así pues, la autofagia puede jugar un papel en tres importantes aspectos de la fisiopatología hepática: degradación de organelas, balance de nutrientes y energía, y remoción de proteínas dañadas o mal plegadas (Yin *et al.*, 2008), y ha sido recientemente implicada en condiciones tales como daño hepático por isquemia-reperfusión, daño hepático relacionado con alcohol, infección por VHB/VHC, carcinoma hepatocelular y enfermedad hepática no alcohólica (Rautou *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2008). Además, existen evidencias recientes que sugieren que la autofagia facilita la supervivencia celular en varias condiciones de daño hepático, incluyendo toxicidad por xenobióticos (Rautou *et al.*, 2010). En cuanto a la mitofagia, se ha descrito que reduce la hepatotoxicidad y la esteatosis en el caso de la exposición aguda a etanol (Ding *et al.*, 2010). Además la autofagia confiere resistencia al daño inducido por estrés oxidativo generado por menadione (Wang *et al.*, 2010) y promueve la supervivencia de células HepG2 contra la apoptosis inducida por el ginsenósido Rk1 (Ko *et al.*, 2009). Los fallos de este mecanismo adaptativo pueden conducir a la muerte celular autofágica. Nuestros resultados dan peso a esta hipótesis, ya que la degradación mitocondrial detectada en nuestro modelo ocurre como un mecanismo de rescate que promueve la supervivencia celular hepática, como se muestra por el hecho de que su inhibición farmacológica conduce a un incremento del daño celular inducido por EFV. Sin embargo, cuando se induce una respuesta autofágica masiva, la capacidad de degradación de la célula es excedida y se produce “estrés autofágico”.

Recientes estudios indican que la autofagia desempeña un papel complejo en infecciones virales incluyendo VIH (Dinkins *et al.*, 2010) y VHB/VHC (Rautou *et al.*, 2010). Esto es de especial relevancia a la luz de nuestros resultados ya que las coinfecciones con el virus de la hepatitis son muy comunes entre pacientes con VIH e incrementan enormemente la toxicidad hepática de EFV (Healy *et al.*, 2013; Hernandez and Sherman, 2011; Joshi *et al.*, 2011; Núñez, 2010). También hay evidencias de que la autofagia es inducida por varios

### *Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

inhibidores de proteasa (Gills *et al.*, 2007; McLean *et al.*, 2009; You *et al.*, 2010). Además, pacientes con VIH habitualmente reciben medicación concurrente que puede ser potencialmente hepatotóxica (Joshi *et al.*, 2011). Todo esto da una imagen de la señalización / inducción de la autofagia en la cual podrían tomar lugar complejas interacciones entre EFV y condiciones concomitantes de influencia hepática. Ésta hipótesis puede tener gran importancia terapéutica y merece futuros estudios.

Nuestros resultados refuerzan la idea de que la alteración de la función mitocondrial induce autofagia y evidencian que este proceso promueve la supervivencia celular en células hepáticas. Sin embargo, el hecho de sobrepasar el umbral de disfunción mitocondrial, está asociado con sobrecarga autofágica o estrés autofágico, lo cual limita severamente la viabilidad de las células. Este complejo efecto puede estar involucrado en la toxicidad hepática asociada no solo con EFV sino también con otros fármacos que interfieren con la función mitocondrial y así puede constituir un nuevo mecanismo implicado en el daño hepático.

Para expandir los hallazgos realizados en cuanto a la respuesta al estrés, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, analizamos los efectos del EFV sobre el perfil de expresión de algunos genes relevantes de estrés y toxicidad en células Hep3B. La modificación de los niveles de mRNA es considerada un buen indicador de “tendencia” en la expresión génica, particularmente cuando se consideran grupos de genes seleccionados involucrados en funciones específicas. Sin embargo, es importante señalar que tales “tendencias” no siempre pueden ser correlacionadas con la expresión o función de proteínas. En términos generales, nuestros resultados revelaron modificaciones sustanciales en varios de los genes relacionados con la respuesta temprana a estrés oxidativo y daño celular. Esto refuerza claramente nuestros resultados en cuanto a la alteración de la función mitocondrial y el incremento de ERO después de tratamiento con EFV.

En primer lugar, detectamos un incremento en la expresión de *MT2A*, un miembro de la familia de las metalotioneínas, que son pequeñas proteínas (6-7kDa) ricas en cisteínas. El incremento en la expresión de *MT2A* es inducido por estrés y es considerado un mecanismo adaptativo que se correlaciona directamente con la magnitud y progresión de daño toxicológico en el hígado (Kurowska and Bal, 2010). Las metalotioneínas participan en la homeostasis de iones por la unión con metales y en la prevención de estrés oxidativo, ya que contribuyen a la eliminación de las ERO de una manera similar a la del GSH (Chen *et al.*, 2012; Chubatsu and Meneghini, 1993; Thornalley and Vasák, 1985). Se ha descrito que la expresión de *MT2A* se incrementa bajo la presencia de estrés oxidativo en diversos modelos celulares, tales como células de linfoma humano expuestas a nitrato de galio, un agente antineoplásico (Yang and Chitambar, 2008) o en células HeLa tratadas con rotenona, un inhibidor del CI (Reinecke *et al.*, 2006). Esto último es de especial relevancia ya que también se ha descrito que células hepáticas tratadas con EFV exhiben una disminución en la respiración atribuida a un defecto en el CI mitocondrial, acompañado por un incremento de ERO (Blas-García *et al.*, 2010). Es importante destacar además, que el incremento en la expresión de *MT2A* ha sido relacionada positivamente con el mantenimiento de los niveles de ATP celular, el  $\Delta\psi_m$  y la viabilidad en células HeLa tratadas con rotenona (Reinecke *et al.*, 2006). Pero *MT2A* no fue el único gen modificado; también detectamos una leve disminución en otros genes relacionados con estrés oxidativo, tales como *PTGS1*. La reducción de genes involucrados en estrés oxidativo podría parecer paradójica, ya que hemos demostrado que el tratamiento con EFV induce este tipo de estrés. Sin embargo, un trabajo previo, ha descrito una reducción de este tipo, formando parte de una respuesta celular específica a un desequilibrio redox y relacionada con la duración del estímulo generador del estrés o los mecanismos de retroalimentación. Específicamente, se ha descrito una disminución de 6 veces en los niveles del mRNA de *PTGS1* en fibroblastomas

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

embrionarios humanos IMR-90 después de estar sometidos a estrés oxidativo moderado durante seis días (Faraonio *et al.*, 2002).

En relación con los genes de respuesta a estrés y a daño celular, el tratamiento con EFV indujo un incremento de los niveles de *HSPA6*, una chaperona de la familia Hsp70 propia de primates. *HSPA6* es un gen inducible estrictamente bajo condiciones de estrés. Se ha descrito que la acumulación de sustratos del proteasoma y condiciones proteotóxicas son potentes inductores de este gen. Además, Hsp70B', la proteína producto de *HSPA6*, brinda resistencia a la muerte celular en condiciones patológicas de acumulación incrementada de proteínas dañadas. Sin embargo, dado que el incremento de *HSPA6* es temporal, altos niveles de esta proteína pueden ser nocivos si son mantenidos en el tiempo (Noonan *et al.*, 2007). Además *HSPA6* es una proteína de choque térmico (HSP) inusual, ya que no contiene las propiedades tipo chaperonas de otras HSP70 y pueden haber evolucionado para mantener funciones críticas específicas bajo condiciones de estrés severo (Hageman *et al.*, 2011).

Nuestros resultados también revelaron cierto incremento en los niveles de *ATM*, un gen relacionado con el daño de ADN, que codifica una quinasa serina/treonina y cuya actividad es aumentada por rupturas en el ADN de doble cadena. *ATM* también participa en la defensa oxidativa (Ditch and Paull, 2012) incrementando el nivel de las principales enzimas antioxidantes, incluyendo SOD, catalasa, GPX y glutatión reductasa (Barzilai *et al.*, 2002). Además, la deficiencia de *Atm* ha sido relacionada a respuestas específicas de estrés oxidativo, tales como estrés de RE y UPR (Ditch and Paull, 2012; Guo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008).

También observamos alteraciones en la expresión de varios genes involucrados en la proliferación, detención del crecimiento y senescencia. En particular hubo un incremento sustancial en la expresión de *GDF15*, un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) implicada en

la homeostasis, diferenciación, remodelación y reparación de tejidos a través de la regulación de vías inflamatorias y apoptóticas. Específicamente, el incremento de *GDF15* ha sido observado durante condiciones patológicas tales como hipoxia de tejidos y estrés oxidativo (Wollert and Kempf, 2012; Zimmers *et al.*, 2006) y ha sido ligada a la prevención de apoptosis y reducción de los niveles de ERO (Subramaniam *et al.*, 2003). Otro gen que presentó incremento en su expresión fue *DDIT3* que codifica el factor de transcripción CHOP/GADD153. Además de su rol en estrés de RE que ya hemos descrito previamente y que forma parte de la respuesta a estrés de RE inducido por EFV, *DDIT3* es inducido transcripcionalmente en respuesta a estrés oxidativo relacionado con la mitocondria y forma parte de la vía de señalización de UPR mitocondrial a través de la transregulación de varias chaperonas mitocondriales y proteasas (Haynes and Ron, 2010). La UPR mitocondrial es iniciada por la acumulación de proteínas mal plegadas en la matriz mitocondrial, lo cual ocurre como resultado de i) disfunción mitocondrial; ii) un incremento en la biogénesis mitocondrial e importación de proteínas; o iii) la presencia de moléculas dañinas como ERO o algunos xenobióticos. Aunque nuestros esfuerzos en la investigación de la UPR se centraron en la respuesta del RE, no se puede descartar que también se pueda dar acumulación de proteínas y UPR a nivel mitocondrial, pero esto merecería un estudio independiente ya que la señalización de las dos respuestas es independiente. Otro de los genes involucrados en la proliferación, detención del crecimiento y senescencia cuya expresión fue alterada por el tratamiento con EFV fue *EGR-1*. Este gen es un miembro de la familia de genes de expresión rápida (IEG) que actúa como un supresor de tumor y está involucrado en el crecimiento y diferenciación celular en respuesta a una larga lista de señales, entre las que se incluye estrés. En un estudio realizado en células U937, se encontró que la expresión de *EGR-1* se incrementaba en un escenario similar al presentado por nosotros. El tratamiento de estas células con platicodina D, una saponina triterpenoide natural con propiedades antiinflamatorias, inducía disfunción mitocondrial e incremento en la generación de ERO y además

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

provocaba un incremento en la expresión de *EGR-1*. En dicho estudio, la activación de *EGR-1* dependiente de ERO fue considerada esencial para la regulación de la apoptosis inducida por platicodina D (Shin *et al.*, 2009).

Con respecto a los genes involucrados en estrés metabólico, observamos un incremento en la expresión del citocromo *P450 CYP1A1*, uno de los tres miembros de la familia CYP1. Esta enzima participa en el metabolismo de xenobióticos y algunos sustratos endógenos y es activada transcripcionalmente por ligandos exógenos, principalmente fármacos y contaminantes ambientales. La función de *CYP1A1* es mucho más compleja de lo que se creía inicialmente, y al parecer, su papel va más allá del meramente toxicológico. Por ejemplo, recientes investigaciones sugieren que funciona como una enzima de detoxificación de carcinógenos y su papel en la activación de compuestos naturales de la dieta con actividad quimiopreventiva, apunta a un rol protector en cáncer (Androutsopoulos *et al.*, 2009). A diferencia de otros miembros de la misma familia, *CYP1A1* no se encuentra exclusivamente en el RE, sino que dependiendo del tejido o del tratamiento inductor, se puede localizar también en la MIM tal y como se ha descrito en hígados de rata pre-tratados con  $\beta$ -naftoflavinona. Es interesante también, que el *CYP1A1* mitocondrial presente distinta especificidad de sustratos a la presentada por el *CYP1A1* de RE y que dicha especificidad se relacione con la presencia de otras coenzimas en la mitocondria (Androutsopoulos *et al.*, 2009).

Dentro de los genes relacionados con inflamación, encontramos variaciones significativas en la expresión de dos de ellos: la citoquina *SERPINA1* que presentó un incremento en los niveles de mARN, mientras la quimioquina *CXCL10* exhibió una disminución de los mismos después del tratamiento con EFV. El incremento en el mARN de *SERPINA1*, ha sido asociado con diversas patologías como el daño hepático presente en la enfermedad alcohólica hepática, el shock hemorrágico, la ligación de conductos biliares y la hepatotoxicidad producida por acetaminofén (Dimova and Kietzmann, 2008). La disminución observada en los niveles de *CXCL10* es llamativa, ya que el

incremento en la expresión de este gen ha sido asociado con daño hepático, incluyendo infección por hepatitis. Sin embargo, también se ha descrito que la reducción de sus niveles por uso de agentes farmacológicos tiene un papel protector en modelos de daño hepático por isquemia-reperfusión (Shen *et al.*, 2007; Tsuchihashi *et al.*, 2006).

Después de realizar un análisis global, validamos seis genes representativos de la micromatriz por RT-PCR individuales, y también evaluamos la expresión a nivel de proteína de dos de ellos. Además, para evaluar la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos en células Hep3B, se validaron los genes también en hepatocitos primarios humanos. La mayoría de los genes analizados en hepatocitos primarios humanos siguieron los patrones observados en células Hep3B, excepto *CXCL10* que presentó solo una leve tendencia a la disminución. La diferencia observada entre los dos tipos celulares puede ser debida al tiempo de tratamiento empleado en este experimento (24 h) y es posible que el efecto observado en hepatocitos primarios pueda volverse más pronunciado si este tiempo es prolongado.

Los cambios en la expresión de los genes evaluados pueden ser relevantes para comprender los eventos adversos hepáticos asociados con el uso clínico de EFV. Los genes que encontramos alterados por EFV están implicados en el metabolismo de xenobióticos y están relacionados con modificaciones en el estatus redox/estrés oxidativo. Esto concuerda y refuerza nuestros hallazgos en cuanto a la alteración de la función mitocondrial y el incremento de los niveles de ERO.

Además de los genes de la micromatriz que fueron validados, también encontramos interesante el indicio que esta misma nos presentaba a cerca de la posible implicación del estrés de RE en la respuesta al tratamiento con EFV reflejada por la alteración en los niveles de los genes *DDIT3*, *DNAJB4*, *HSPA6* y *HSPD1*.

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

Evaluamos los marcadores más típicos de estrés de RE y encontramos que EFV induce un incremento en la regulación de CHOP, GRP78 y p-eIF2 $\alpha$  y que esta es dependiente de la concentración. La expresión de *XBP1* también fue incrementada, tanto en su forma sin procesar como después de su procesamiento. Es importante destacar que además de su papel en la respuesta al estrés de RE, *XBP1* regula la lipogénesis en el hígado (Lee *et al.*, 2008), un hecho de particular relevancia, teniendo en cuenta que en células hepáticas tratadas con EFV se ha descrito un incremento en la acumulación de lípidos intracelulares (Blas-Garcia *et al.*, 2010). También encontramos que EFV altera la morfología del RE e incrementa la concentración de calcio citosólico. Todos estos indicadores de la presencia de estrés de RE son en principio similares a los producidos por el típico inductor de estrés de RE, TG. Sin embargo, una evaluación más minuciosa reveló un patrón diferencial sugiriendo que las dos sustancias provocan estrés de RE a través de diferentes mecanismos. Esto fue evidenciado inicialmente por el análisis de la activación de las casp-7, que fue claramente activada por el tratamiento con TG pero no con EFV.

CHOP, es uno de los genes con mayor incremento de la expresión durante el estrés de RE prolongado y es considerado un regulador crucial tanto de la apoptosis asociada con estrés de RE como de las señales de supervivencia. El silenciamiento transitorio de CHOP incrementó significativamente el efecto de la TG sobre la intensidad de la señal del RE y la generación de ERO, mientras que no se detectaron diferencias en células tratadas con EFV. Sin embargo, para nuestra sorpresa, el silenciamiento de CHOP no tuvo influencia en la reducción del número de células inducida por EFV y TG, con varias posibles explicaciones: i) el 20% residual de expresión proteica de CHOP después del silenciamiento podría ser suficiente para mantener baja la viabilidad celular después de 24 h, ii) la posibilidad de una resistencia específica de células hepáticas a tal disminución en la expresión de CHOP y iii) se ha descrito que la presencia de estrés de RE puede inducir una detención del ciclo celular



independiente de CHOP; ya que se ha encontrado que la activación de la vía de PERK y la subsiguiente fosforilación de eIF2 $\alpha$ , disminuye el nivel de la ciclina D1, bloqueando así el ciclo celular en G1 (Brewer and Diehl, 2000; Lundemo *et al.*, 2011).

Aunque el incremento en la concentración de calcio citosólico inducido por EFV y TG pareciera similar, los mecanismos involucrados son diferentes. Esto tiene importantes implicaciones para la interacción entre la mitocondria y el RE en el daño celular inducido por fármacos. TG induce estrés de RE por la inhibición de SERCA, esto hace que se vacíe el calcio contenido en el RE y que se incremente la concentración de calcio citosólico (Costa *et al.*, 2010), afectando así a la mitocondria después de su acción en el RE. Por el contrario, el principal blanco de EFV es la mitocondria (Blas-Garcia *et al.*, 2010), y su acción sobre el RE parece ser secundaria. El calcio es un importante regulador de la función mitocondrial (Brookes *et al.*, 2004; Giorgi *et al.*, 2008; Patergnani *et al.*, 2011), y su entrada a la mitocondria ocurre principalmente a través de una gran capacidad “uniporte” localizada en la MIM cuya función depende del  $\Delta\psi_m$  (Patergnani *et al.*, 2011). La disrupción del  $\Delta\psi_m$  se asocia con la liberación del calcio mitocondrial (Gonzalez *et al.*, 2005; Patergnani *et al.*, 2011); el incremento del calcio citosólico como una consecuencia de la disfunción mitocondrial ha sido demostrado en diferentes modelos celulares (Lim *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2006). Es relevante el hecho de que las mismas concentraciones de EFV inducen tanto la caída del  $\Delta\psi_m$  como una disminución en el calcio mitocondrial y un incremento en el calcio citosólico. La diferencia en el efecto sobre los niveles de calcio producida por TG o EFV, también fue apoyada por otro experimento. Las células que habían sido tratadas con TG, en las cuales se asume que todo el calcio contenido en el RE había salido al citosol, al ser sometidas a una segunda exposición a TG, no se observó ningún cambio en los niveles de calcio citosólico. En cambio en las células tratadas con EFV, en las que ya se había producido un incremento en los niveles de

### Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

calcio citosólico, al ser sometidas a la adición de TG, el calcio citosólico se incrementó enormemente, mostrando un perfil muy diferente.

La participación de la mitocondria en el estrés de RE inducido por EFV fue confirmado usando células Rho<sup>0</sup>, cuya característica principal es que sus mitocondrias no son funcionales. Al analizar los niveles de mRNA y proteína de CHOP y GRP78 y la dilatación de las membranas del RE en las células Rho<sup>0</sup>, encontramos una notable reducción en los niveles de estos parámetros en comparación con las células Rho<sup>+</sup>.

Hasta ahora solo estamos empezando a entender la compleja relación entre estrés de RE y mitocondria en la patofisiología hepática. El acoplamiento de la disfunción mitocondrial al estrés de RE ha sido mostrado en hígados de ratas con esteatosis (Ben, I *et al.*, 2010), la línea celular hepática humana skHep1, apuntando a un papel en el desarrollo de resistencia hepática a insulina (Lim *et al.*, 2009), o en la reacción de células HepG2 a capsaicina (Huang *et al.*, 2009). Sin embargo, en muchas de estas situaciones, es difícil determinar la causa o consecuencia de este acoplamiento, ya que la mitocondria y el RE están inevitablemente interconectados, por medio de la señalización de calcio, la fosforilación oxidativa y el estrés oxidativo.

Varios mecanismos pueden explicar el efecto dual sobre RE/mitocondria del EFV. Por ejemplo, se ha visto que la enfermedad alcohólica hepática, el estrés oxidativo y el incremento del ratio NADH/NAD<sup>+</sup> inducen estrés de RE (Ji, 2008). De manera similar, la función de RE puede ser alterada como consecuencia de alteración en la homeostasis de los lípidos celulares. Ambas acciones son de relevancia considerando que las células hepáticas tratadas con EFV presentan alteraciones mitocondriales similares (estrés oxidativo y disminución de la respiración) y aumento en el contenido de ácidos grasos (Blas-Garcia *et al.*, 2010). Otra área de interacción potencial involucra proteínas específicas, como el citocromo P4502E1 (CYP2E1), presente tanto en la mitocondria como en el RE. Se ha reportado que CYP2E1, disminuye

durante la isquemia-reperfusión hepática, una condición caracterizada por estrés oxidativo y función de RE alterada (Ji, 2008) la expresión de este gen también se encuentra disminuida en nuestro modelo, tal y como lo observamos en la micromatriz.

En conclusión, este estudio demuestra que el tratamiento de células hepáticas con EFV genera una compleja respuesta celular, que depende de la concentración y del tiempo de exposición al fármaco. Esta respuesta se caracteriza por presentar, a concentraciones moderadas, un cuadro de disfunción mitocondrial, acompañado de un proceso de mitofagia que promueve la supervivencia celular y de una respuesta a estrés de RE que involucra la mitocondria. Sin embargo, concentraciones elevadas de EFV producen un bloqueo del flujo autofágico seguido de un incremento en la muerte celular por apoptosis (Fig. V.1.) Dado que el EFV es un fármaco que es ampliamente utilizado en la TARGA y además se toma de por vida, este nuevo mecanismo de respuesta celular al estrés inducido por él puede ayudar a entender las toxicidades hepáticas que acompañan los pacientes con HIV tratadas con EFV.

Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz

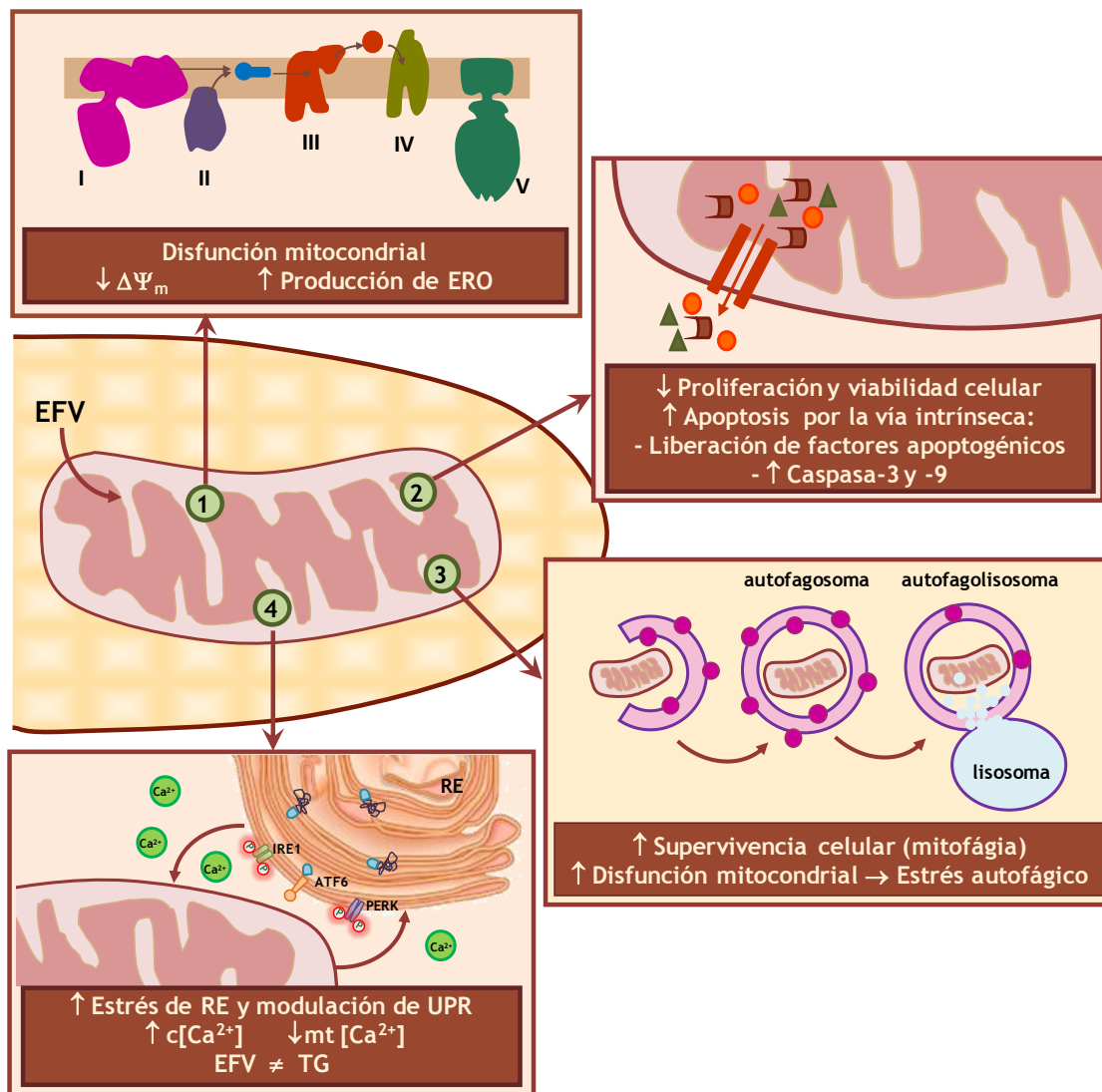


Fig. V.1. Representación esquemática del efecto mitotóxico inducido por EFV en células hepáticas. (1) EFV produce un incremento de la producción de ERO mitocondriales y provoca una pérdida del  $\Delta\Psi_m$  llevando a la disfunción mitocondrial. (2) El tratamiento con EFV reduce la viabilidad y proliferación celular, induciendo muerte celular por apoptosis, claramente visible con la concentración de EFV 50  $\mu\text{M}$ , la cual ocurre por la vía intrínseca (mitocondrial). (3) Además EFV induce la degradación autofágica de la mitocondrias (mitofagia) como un mecanismo de rescate que promueve la supervivencia celular, pero cuando se supera un límite de disfunción mitocondrial y citotoxicidad, se genera estrés autofágico. (4) El tratamiento con EFV también induce estrés de RE y UPR con activación de los principales marcadores de estos procesos; además este fenómeno ocurre con participación de la mitocondria, presentandose un incremento en la

concentración de calcio citosólico ( $c[Ca^{2+}]$ ) y una disminución del mitocondrial ( $mt [Ca^{2+}]$ ), resaltando así el hecho de que el estrés de RE inducido por EFV sigue un mecanismo diferente al inducido por TG, un inductor clásico de este típico de estrés.



## **VI. CONCLUSIONES**





1. Efavirenz ejerce un efecto citotóxico sobre células hepáticas, dependiente de la concentración, que se manifiesta como disminución de la viabilidad y la proliferación celular.
2. Las células expuestas a efavirenz sufren alteraciones en la función mitocondrial como pérdida del  $\Delta\psi_m$ , incremento en la producción de ERO de origen mitocondrial y reducción del contenido de glutatión, factores que contribuyen a la mitotoxicidad.
3. El tratamiento de células Hep3B induce los programas de muerte celular por apoptosis, activada por la vía intrínseca, que se observa claramente con efavirenz 50  $\mu\text{M}$ .
4. Concentraciones clínicas de efavirenz, inducen autofagia, específicamente mitofagia en células hepáticas. La activación de este proceso, promueve la supervivencia celular; sin embargo, cuando se excede cierto límite de disfunción mitocondrial y citotoxicidad, se produce un bloqueo en el flujo autofágico, conduciendo a una sobrecarga autofágica o estrés autofágico, efecto que limita severamente la viabilidad celular.
5. En tratamiento con efavirenz modifica la expresión de genes relacionados con estrés metabólico, con estrés oxidativo y daño, y con inflamación.
6. Efavirenz induce estrés de RE y UPR en células hepáticas, respuesta en la que también participa la mitocondria.
7. El perfil del estrés de RE y UPR desplegado por efavirenz, difiere de la respuesta generada por la TG, un inductor típico de estrés de RE, sugiriendo que actúan por mecanismos diferentes.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdul-Ghani, M.A., DeFronzo, R.A., 2008.** Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.* 8, 173-178.
- Abrescia, N., D'Abbraccio, M., Figoni, M., Busto, A., Maddaloni, A., De, M.M., 2005.** Hepatotoxicity of antiretroviral drugs. *Curr. Pharm. Des* 11, 3697-3710.
- Amacher, D.E., 2005.** Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. *Curr. Med. Chem.* 12, 1829-1839.
- Anderson, R.M., May, R.M., 1988.** Epidemiological parameters of HIV transmission. *Nature* 333, 514-519.
- Androutsopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2009.** Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC. Cancer* 9, 187.
- Apostolova, N., Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., 2011.** Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol-gamma inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 715-725.
- Auman, J.T., Chou, J., Gerrish, K., Huang, Q., Jayadev, S., Blanchard, K., Paules, R.S., 2007.** Identification of genes implicated in methapyrilene-induced hepatotoxicity by comparing differential gene expression in target and nontarget tissue. *Environ. Health Perspect.* 115, 572-578.
- Bailey, A.C., Fisher, M., 2008.** Current use of antiretroviral treatment. *Br. Med. Bull.* 87, 175-192.
- Balzarini, J., 1994.** Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives. *Pharm. World Sci.* 16, 113-126.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983.** Isolation of a T-lymphotropic

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

**Barth, S., Glick, D., Macleod, K.F., 2010.** Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221, 117-124.

**Barzilai, A., Rotman, G., Shiloh, Y., 2002.** ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 1, 3-25.

**Ben, M., I, Alfany-Fernandez, I., Martel, C., Zaouali, M.A., Bintanel-Morcillo, M., Rimola, A., Rodes, J., Brenner, C., Rosello-Catafau, J., Peralta, C., 2010.** Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death. Dis.* 1, e52.

**Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006.** Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS. Biol.* 4, e423.

**Bianchi, K., Vandecasteele, G., Carli, C., Romagnoli, A., Szabadkai, G., Rizzuto, R., 2006.** Regulation of Ca<sup>2+</sup> signalling and Ca<sup>2+</sup>-mediated cell death by the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . *Cell Death. Differ.* 13, 586-596.

**Blas-Garcia, A., Apostolova, N., Ballesteros, D., Monleon, D., Morales, J.M., Rocha, M., Victor, V.M., Esplugues, J.V., 2010.** Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. *Hepatology* 52, 115-125.

**Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., Apostolova, N., 2011.** Twenty years of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: time to reevaluate their toxicity. *Curr. Med. Chem.* 18, 2186-2195.

**Brewer, J.W., Diehl, J.A., 2000.** PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12625-12630.

**Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S.S., 2004.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287, C817-C833.

**Brück, S., Witte, S., Brust, J., Schuster, D., Mosthaf, F., Procaccianti, M., Rump, J.A., Klinker, H., Petzold, D., Hartmann, M., 2008.** Hepatotoxicity in patients prescribed efavirenz or nevirapine. *Eur. J. Med. Res.* 13, 343-348.

**Bumpus, N.N., Kent, U.M., Hollenberg, P.F., 2006.** Metabolism of efavirenz and 8-hydroxyefavirenz by P450 2B6 leads to inactivation by two distinct mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 345-351.

**Burger, D., van, d.H., I, la, P.C., van der Ende, M., Groeneveld, P., Richter, C., Koopmans, P., Kroon, F., Sprenger, H., Lindemans, J., Schenk, P., van, S.R., 2006.** Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61, 148-154.

**Caron, M., Auclair, M., Vissian, A., Vigouroux, C., Capeau, J., 2008.** Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir. Ther.* 13, 27-38.

**Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C., Capeau, J., 2010.** HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol. Med.* 16, 218-229.

**Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2003.** Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell Proteomics.* 2, 117-126.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

Chen, Z., Li, J., Zhao, T.J., Li, X.H., Meng, F.G., Mu, H., Yan, Y.B., Zhou, H.M., 2012. Metallothioneins protect cytosolic creatine kinases against stress induced by nitrogen-based oxidants. *Biochem. J.* 441, 623-632.

Chiao, S.K., Romero, D.L., Johnson, D.E., 2009. Current HIV therapeutics: mechanistic and chemical determinants of toxicity. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 53-60.

Chubatsu, L.S., Meneghini, R., 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem. J.* 291 ( Pt 1), 193-198.

Clumeck, N., Pozniak, A., Raffi, F., 2008. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV. Med.* 9, 65-71.

Cnop, M., Foufelle, F., Velloso, L.A., 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* 18, 59-68.

Colgan, S.M., Hashimi, A.A., Austin, R.C., 2011. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert. Rev. Mol. Med.* 13, e4.

Cookson, B.T., Brennan, M.A., 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9, 113-114.

Costa, R.O., Ferreiro, E., Cardoso, S.M., Oliveira, C.R., Pereira, C.M., 2010. ER stress-mediated apoptotic pathway induced by Abeta peptide requires the presence of functional mitochondria. *J. Alzheimers. Dis.* 20, 625-636.

Craig, A., Sidaway, J., Holmes, E., Orton, T., Jackson, D., Rowlinson, R., Nickson, J., Tonge, R., Wilson, I., Nicholson, J., 2006. Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabonomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat. *J. Proteome. Res.* 5, 1586-1601.



Crandall, K.A., 2001. Human Immunodeficiency Viruses (HIV). In: eLS-John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi:10. 1038/npg. els. 0000417].

Cui, H., Kong, Y., Zhang, H., 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J. Signal. Transduct.* 2012, 646354.

Cui, Q., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T., 2007. [Mechanism of downregulation of apoptosis by autophagy induced by oridonin in HeLa cells]. *Yao Xue. Xue. Bao.* 42, 35-39.

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Dara, L., Ji, C., Kaplowitz, N., 2011. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology* 53, 1752-1763.

Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., Kroemer, G., 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14, 729-739.

de Bethune, M.P., 2010. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res.* 85, 75-90.

De Clercq, E., 2002. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 13-25.

De Clercq, E., 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 307-320.

De Cock, K.M., Adjorlolo, G., Ekpini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K.M., Doorly, R., Gayle, H.D., 1993.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. JAMA 270, 2083-2086.

Debnath, J., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2005. Does autophagy contribute to cell death? Autophagy. 1, 66-74.

Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A.M., Samali, A., 2012. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. Cell Mol. Life Sci.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat. Chem. Biol. 1, 112-119.

Degterev, A., Yuan, J., 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 378-390.

Deng, W., Baki, L., Yin, J., Zhou, H., Baumgarten, C.M., 2010. HIV protease inhibitors elicit volume-sensitive Cl<sup>-</sup> current in cardiac myocytes via mitochondrial ROS. J Mol. Cell Cardiol. 49, 746-752.

Desta, Z., Saussele, T., Ward, B., Blievernicht, J., Li, L., Klein, K., Flockhart, D.A., Zanger, U.M., 2007. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. Pharmacogenomics. 8, 547-558.

Ding, W.X., Li, M., Chen, X., Ni, H.M., Lin, C.W., Gao, W., Lu, B., Stolz, D.B., Clemens, D.L., Yin, X.M., 2010. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. Gastroenterology 139, 1740-1752.

Dinkins, C., Arko-Mensah, J., Deretic, V., 2010. Autophagy and HIV. Semin. Cell Dev. Biol. 21, 712-718.

Ditch, S., Paull, T.T., 2012. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem. Sci.* 37, 15-22.

Domingo, P., Lozano, F., 2011. [Management of antiretroviral drug toxicity]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 535-544.

Dominguez, S., Ghosn, J., Peytavin, G., Guiguet, M., Tubiana, R., Valantin, M.A., Murphy, R., Bricaire, F., Benhamou, Y., Katlama, C., 2010. Impact of hepatitis C and liver fibrosis on antiretroviral plasma drug concentrations in HIV-HCV co-infected patients: the HEPADOSE study. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2445-2449.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-95.

Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., Braun, H.P., 2008. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 419-424.

Dunn, W.A.Jr., Cregg, J.M., Kiel, J.A., van der Klei, I.J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A.A., Stasyk, O.V., Veenhuis, M., 2005. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy.* 1, 75-83.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes. Infect.* 11, 1050-1062.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.

Evans, W.E., McLeod, H.L., 2003. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* 348, 538-549.

Fadok, V.A., de, C.A., Daleke, D.L., Henson, P.M., Bratton, D.L., 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 1071-1077.

Faraonio, R., Pane, F., Intrieri, M., Russo, T., Cimino, F., 2002. In vitro acquired cellular senescence and aging-specific phenotype can be distinguished on the basis of specific mRNA expression. *Cell Death. Differ.* 9, 862-864.

Feeney, E.R., Mallon, P.W., 2010. Impact of mitochondrial toxicity of HIV-1 antiretroviral drugs on lipodystrophy and metabolic dysregulation. *Curr. Pharm. Des* 16, 3339-3351.

Feeney, E.R., Mallon, P.W., 2011. HIV and HAART-Associated Dyslipidemia. *Open. Cardiovasc. Med. J.* 5, 49-63.

Ferreiro, E., Costa, R., Marques, S., Cardoso, S.M., Oliveira, C.R., Pereira, C.M., 2008. Involvement of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death pathway triggered by the prion peptide PrP(106-126). *J. Neurochem.* 104, 766-776.

Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T., 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 317, 185-191.

Flamment, M., Kammoun, H.L., Hainault, I., Ferre, P., Foufelle, F., 2010. Endoplasmic reticulum stress: a new actor in the development of hepatic steatosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 21, 239-246.

Flint, O.P., Noor, M.A., Hruz, P.W., Hylemon, P.B., Yarasheski, K., Kotler, D.P., Parker, R.A., Bellamine, A., 2009. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. *Toxicol. Pathol.* 37, 65-77.

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201-232.

Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G., 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ. Res.* 111, 1198-1207.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death. Differ.* 14, 1237-1243.

Galluzzi, L., Vicencio, J.M., Kepp, O., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Kroemer, G., 2008. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr. Mol. Med.* 8, 78-91.

Gerlier, D., Thomasset, N., 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94, 57-63.

Gesida, 2012. [Consensus document of Gesida and Spanish Secretariat for the National Plan on AIDS (SPNS) regarding combined antiretroviral treatment in adults infected by the human immunodeficiency virus (January 2012)]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30, e1-89.

Ghebremedhin, B., 2012. Maraviroc in Antiretroviral-Naïve HIV-1 Patients. *Infectious Diseases: Research and Treatment* 5, 1-13.

Gibellini, L., De, B.S., Pinti, M., Nasi, M., Riccio, M., Carnevale, G., Cavallini, G.M., Sala de Oyanguren, F.J., O'Connor, J.E., Mussini, C., De, P.A., Cossarizza, A., 2012. The protease inhibitor atazanavir triggers autophagy and mitophagy in human preadipocytes. *AIDS* 26, 2017-2026.

Gills, J.J., Lopiccolo, J., Tsurutani, J., Shoemaker, R.H., Best, C.J., Abu-Asab, M.S., Borojerdi, J., Warfel, N.A., Gardner, E.R., Danish, M., Hollander, M.C., Kawabata, S., Tsokos, M., Figg, W.D., Steeg, P.S., Dennis, P.A., 2007. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum,

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 13, 5183-5194.

Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008. Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 119-130.

Gonzalez, A., Granados, M.P., Salido, G.M., Pariente, J.A., 2005. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Mol. Cell Biochem.* 269, 165-173.

Guo, Z., Deshpande, R., Paull, T.T., 2010. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle* 9, 4805-4811.

Gutierrez, F., Navarro, A., Padilla, S., Anton, R., Masia, M., Borrás, J., Martín-Hidalgo, A., 2005. Prediction of neuropsychiatric adverse events associated with long-term efavirenz therapy, using plasma drug level monitoring. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1648-1653.

Hageman, J., van Waarde, M.A., Zylicz, A., Walerych, D., Kampinga, H.H., 2011. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochem. J.* 435, 127-142.

Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 10, 5-12.

Hammer, S.M., Eron, J.J., Jr., Reiss, P., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M.A., Gatell, J.M., Hirsch, M.S., Jacobsen, D.M., Montaner, J.S., Richman, D.D., Yeni, P.G., Volberding, P.A., 2008. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 300, 555-570.

Hao, Z., Cooney, D.A., Farquhar, D., Perno, C.F., Zhang, K., Masood, R., Wilson, Y., Hartman, N.R., Balzarini, J., Johns, D.G., 1990. Potent DNA chain termination activity and selective inhibition of human

immunodeficiency virus reverse transcriptase by 2',3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate. *Mol. Pharmacol.* 37, 157-163.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619-633.

Haynes, C.M., Ron, D., 2010. The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* 123, 3849-3855.

He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67-93.

Healy, S.A., Gupta, S., Melvin, A.J., 2013. HIV/HBV coinfection in children and antiviral therapy. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 11, 251-263.

Hernandez, M.D., Sherman, K.E., 2011. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr. Opin. HIV. AIDS* 6, 478-482.

Hofman, P., Nelson, A.M., 2006. The pathology induced by highly active antiretroviral therapy against human immunodeficiency virus: an update. *Curr. Med. Chem.* 13, 3121-3132.

Hooker, D.J., Cherry, C.L., 2009. Apoptosis: a clinically useful measure of antiretroviral drug toxicity? *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* 5, 1543-1553.

Hooker, D.J., Gorry, P.R., Ellett, A.M., Wesselingh, S.L., Cherry, C.L., 2009. Measuring and monitoring apoptosis and drug toxicity in HIV patients by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J. Cell Mol. Med.* 13, 948-958.

Huang, S.P., Chen, J.C., Wu, C.C., Chen, C.T., Tang, N.Y., Ho, Y.T., Lo, C., Lin, J.P., Chung, J.G., Lin, J.G., 2009. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res.* 29, 165-174.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Huang, S.W., Liu, K.T., Chang, C.C., Chen, Y.J., Wu, C.Y., Tsai, J.J., Lu, W.C., Wang, Y.T., Liu, C.M., Shieh, J.J., 2010. Imiquimod simultaneously induces autophagy and apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *Br. J. Dermatol.* 163, 310-320.

Hussain, S.G., Ramaiah, K.V., 2007. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Current science* 93, 1684-1696.

Iser, D.M., Avihingsanon, A., Wisedopas, N., Thompson, A.J., Boyd, A., Matthews, G.V., Locarnini, S.A., Slavin, J., Desmond, P.V., Lewin, S.R., 2011. Increased intrahepatic apoptosis but reduced immune activation in HIV-HBV co-infected patients with advanced immunosuppression. *AIDS* 25, 197-205.

Ji, C., 2008. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 Suppl 1, S16-S24.

Jin, Z., El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 4, 139-163.

Jones, M., Núñez, M., 2012. Liver toxicity of antiretroviral drugs. *Semin. Liver Dis.* 32, 167-176.

Joshi, D., O'Grady, J., Dieterich, D., Gazzard, B., Agarwal, K., 2011. Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* 377, 1198-1209.

Kang, J., Pervaiz, S., 2012. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. *Biochem. Res. Int.* 2012, 896751.

Kapoor, A., Sanyal, A.J., 2009. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin. Liver Dis.* 13, 581-590.

Kappelhoff, B.S., van, L.F., Robinson, P.A., MacGregor, T.R., Baraldi, E., Montella, F., Uip, D.E., Thompson, M.A., Russell, D.B., Lange, J.M.,



**Beijnen, J.H., Huitema, A.D., 2005.** Are adverse events of nevirapine and efavirenz related to plasma concentrations? *Antivir. Ther.* 10, 489-498.

**Karamchand, L., Dawood, H., Chuturgoon, A.A., 2008.** Lymphocyte mitochondrial depolarization and apoptosis in HIV-1-infected HAART patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 48, 381-388.

**Kashou, A., Agarwal, A., 2011.** Oxidants and Antioxidants in the Pathogenesis of HIV/AIDS. *The Open Reproductive Science Journal* 3, 154-161.

**Kaufman, R.J., 2002.** Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest* 110, 1389-1398.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

**Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., Lemasters, J.J., 2007.** Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245-253.

**Kim, I., Xu, W., Reed, J.C., 2008.** Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 1013-1030.

**King, J., Aberg, J.A., 2008.** Clinical impact of patient population differences and genomic variation in efavirenz therapy. *AIDS* 22, 1709-1717.

**Kirkinezos, I.G., Moraes, C.T., 2001.** Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 449-457.

**Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Jr., Levine, B., van, d.K., I, Seglen, P.O., 2007.** How shall I eat thee? *Autophagy.* 3, 413-416.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Ko, H., Kim, Y.J., Park, J.S., Park, J.H., Yang, H.O., 2009. Autophagy inhibition enhances apoptosis induced by ginsenoside Rk1 in hepatocellular carcinoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2183-2189.

Kohler, J.J., Lewis, W., 2007. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 166-172.

Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., Kondo, S., 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5, 726-734.

Korolev, S.P., Agapkina, Y.Y., Gottikh, M.B., 2011. Clinical Use of Inhibitors of HIV-1 Integration: Problems and Prospects. *Acta Naturae.* 3, 12-28.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* 10, 602-610.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87, 99-163.

Kroemer, G., Marino, G., Levine, B., 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40, 280-293.

Kumar V., Abbas AK., Fausto N., Mitchell RN., 2012. *Robbins Basic Pathology.*

Kurowska, E., Bal, W., 2010. Recent advances in molecular toxicology of cadmium and nickel. In: *Advances in Molecular Toxicology.* Elsevier, pp. 85-126.

Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B., 2008. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 335-353.

Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology. (Bethesda. )* 22, 193-201.

Landriscina, M., Fabiano, A., Altamura, S., Bagala, C., Piscazzi, A., Cassano, A., Spadafora, C., Giorgino, F., Barone, C., Cignarelli, M., 2005. Reverse transcriptase inhibitors down-regulate cell proliferation in vitro and in vivo and restore thyrotropin signaling and iodine uptake in human thyroid anaplastic carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 5663-5671.

Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest* 115, 2665-2672.

Lee, A.H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., Glimcher, L.H., 2008. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492-1496.

Lee, H.C., Wei, Y.H., 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 37, 822-834.

Lefevre, C., Auclair, M., Boccarda, F., Bastard, J.P., Capeau, J., Vigouroux, C., Caron-Debarle, M., 2010. Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2611-2620.

Lemasters, J.J., 1999. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am. J. Physiol* 276, G1-G6.

Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Levine, B., Yuan, J., 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest 115, 2679-2688.

Lewis, W., Day, B.J., Copeland, W.C., 2003. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 812-822.

Lewis, W., Kohler, J.J., Hosseini, S.H., Haase, C.P., Copeland, W.C., Bienstock, R.J., Ludaway, T., McNaught, J., Russ, R., Stuart, T., Santoianni, R., 2006. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. AIDS 20, 675-684.

Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene 27, 6194-6206.

Lim, J.H., Lee, H.J., Ho, J.M., Song, J., 2009. Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. Cell Signal. 21, 169-177.

Lim, J.H., Lee, J.I., Suh, Y.H., Kim, W., Song, J.H., Jung, M.H., 2006. Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. Diabetologia 49, 1924-1936.

Liu, N., Stoica, G., Yan, M., Scofield, V.L., Qiang, W., Lynn, W.S., Wong, P.K., 2005. ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. Lab Invest 85, 1471-1480.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., Zipursky L., 2003. Molecular Cell Biology. New York.

Logue, S.E., Gustafsson, A.B., Samali, A., Gottlieb, R.A., 2005. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. J. Mol. Cell Cardiol. 38, 21-33.

**Loko, M.A., Bani-Sadr, F., Winnock, M., Lacombe, K., Carrieri, P., Neau, D., Morlat, P., Serfaty, L., Dabis, F., Salmon, D., 2011.** Impact of HAART exposure and associated lipodystrophy on advanced liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J. Viral Hepat.* 18, e307-e314.

**Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell Mol. Med.* 14, 840-860.

**Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Thompson, C.B., 2005.** Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 439-448.

**Lundemo, A.G., Pettersen, C.H., Berge, K., Berge, R.K., Schonberg, S.A., 2011.** Tetradecylthioacetic acid inhibits proliferation of human SW620 colon cancer cells--gene expression profiling implies endoplasmic reticulum stress. *Lipids Health Dis.* 10, 190.

**Maagaard, A., Kvale, D., 2009.** Long term adverse effects related to nucleoside reverse transcriptase inhibitors: clinical impact of mitochondrial toxicity. *Scand. J. Infect. Dis.* 41, 808-817.

**Maggiolo, F., 2009.** Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 910-928.

**Majno, G., Joris, I., 1995.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15.

**Malhi, H., Gores, G.J., 2008.** Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134, 1641-1654.

**Malhi, H., Kaufman, R.J., 2011.** Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol.* 54, 795-809.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

**Mandas, A., Iorio, E.L., Congiu, M.G., Balestrieri, C., Mereu, A., Cau, D., Dessi, S., Curreli, N., 2009. Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. J Biomed. Biotechnol. 2009, 749575.**

**Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., Simon, M.C., 2005. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. Cell Metab 1, 393-399.**

**Martin, J.L., Brown, C.E., Matthews-Davis, N., Reardon, J.E., 1994. Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 2743-2749.**

**Martinon, F., Tschopp, J., 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. Cell 117, 561-574.**

**Marzolini, C., Telenti, A., Decosterd, L.A., Greub, G., Biollaz, J., Buclin, T., 2001. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. AIDS 15, 71-75.**

**Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R., Bolognesi, D., 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. Nat. Rev. Drug Discov. 3, 215-225.**

**McLean, K., VanDeVen, N.A., Sorenson, D.R., Daudi, S., Liu, J.R., 2009. The HIV protease inhibitor saquinavir induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in ovarian cancer cells. Gynecol. Oncol. 112, 623-630.**

**Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P., 2010. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. Am. J. Physiol Cell Physiol 298, C776-C785.**

**Meijer, A.J., Codogno, P., 2009.** Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 46, 210-240.

**Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005.** ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7, 766-772.

**Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2012.** The intriguing life of autophagosomes. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3618-3635.

**Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., St Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., Broder, S., 1985.** 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 7096-7100.

**Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008.** Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.

**Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B., 2010.** Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.

**Mocroft, A., Ledergerber, B., Katlama, C., Kirk, O., Reiss, P., d'Arminio, M.A., Knysz, B., Dietrich, M., Phillips, A.N., Lundgren, J.D., 2003.** Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 362, 22-29.

**Mohamad, N., Gutierrez, A., Nunez, M., Cocca, C., Martin, G., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., Bergoc, R., 2005.** Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* 29, 149-161.

**Mosmann, T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

**Muñoz-Pinedo, C., 2012.** Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* 738, 124-143.

**Murphy, M.P., 2009.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13.

**Nagy, G., Kardon, T., Wunderlich, L., Szarka, A., Kiss, A., Schaff, Z., Banhegyi, G., Mandl, J., 2007.** Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 273-279.

**Nagy, G., Szarka, A., Lotz, G., Doczi, J., Wunderlich, L., Kiss, A., Jemnitz, K., Veres, Z., Banhegyi, G., Schaff, Z., Sumegi, B., Mandl, J., 2010.** BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 96-103.

**Noonan, E.J., Place, R.F., Giardina, C., Hightower, L.E., 2007.** Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress. Chaperones.* 12, 393-402.

**Norbury, C.J., Hickson, I.D., 2001.** Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 367-401.

**Novo, E., Parola, M., 2008.** Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis. Tissue Repair* 1, 5.

**Núñez, M., 2010.** Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. *Hepatology* 52, 1143-1155.

**OMS, UNISIDA, 2012.** In <http://www.who.int/features/qa/71/es/index.html>.

**Ortona, E., Margutti, P., Matarrese, P., Franconi, F., Malorni, W., 2008.** Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. *Autoimmun. Rev.* 7, 579-584.

**Pandey, K.K., 2011.** Raltegravir in HIV-1 infection: Safety and Efficacy in Treatment-naive Patients. *Clin. Med. Rev. Ther.* 2012, 13-30.



- Pandit, A., Sachdeva, T., Bafna, P., 2012. Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2, 233-243.
- Panos, G., Samonis, G., Alexiou, V.G., Kavarnou, G.A., Charatsis, G., Falagas, M.E., 2008. Mortality and morbidity of HIV infected patients receiving HAART: a cohort study. *Curr. HIV. Res.* 6, 257-260.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S., 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328, 327-335.
- Parker, R.A., Flint, O.P., Mulvey, R., Elosua, C., Wang, F., Fenderson, W., Wang, S., Yang, W.P., Noor, M.A., 2005. Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 67, 1909-1919.
- Patergnani, S., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De, M.E., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2011. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun. Signal.* 9, 19.
- Petit, F., Fromenty, B., Owen, A., Estaquier, J., 2005. Mitochondria are sensors for HIV drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 258-264.
- Pichard, L., Raulet, E., Fabre, G., Ferrini, J.B., Ourlin, J.C., Maurel, P., 2006. Human hepatocyte culture. *Methods Mol. Biol.* 320, 283-293.
- Pilon, A.A., Lum, J.J., Sanchez-Dardon, J., Phenix, B.N., Douglas, R., Badley, A.D., 2002. Induction of apoptosis by a nonnucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2687-2691.
- Pineda, J.A., Macias, J., Mira, J.A., Merchante, N., del, V.J., Neukam, K.I., 2010. HAART and the liver: friend or foe? *Eur. J. Med. Res.* 15, 93-96.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Poyton, R.O., Ball, K.A., Castello, P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab* 20, 332-340.

Price, J.C., Thio, C.L., 2010. Liver disease in the HIV-infected individual. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 1002-1012.

Rao, R.V., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death. Differ.* 11, 372-380.

Rasheva, V.I., Domingos, P.M., 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 14, 996-1007.

Rastogi, R.P., Sinha, R., Sinha R.P., 2009. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 8, 155-181.

Rautou, P.E., Mansouri, A., Lebrech, D., Durand, F., Valla, D., Moreau, R., 2010. Autophagy in liver diseases. *J. Hepatol.* 53, 1123-1134.

Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Narayanan, U., Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., Underwood, B., Winslow, A., Rubinsztein, D.C., 2009. Mammalian macroautophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 1707-1711.

Reggiori, F., Klionsky, D.J., 2005. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 415-422.

Reinecke, F., Levanets, O., Olivier, Y., Louw, R., Semete, B., Grobler, A., Hidalgo, J., Smeitink, J., Olckers, A., Van der Westhuizen, F.H., 2006. Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells. *Biochem. J.* 395, 405-415.

Rich, P.R., Marechal, A., 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47, 1-23.

- Rodriguez-Novoa, S., Barreiro, P., Jimenez-Nacher, I., Rendon, A., Soriano, V., 2005. Pharmacogenetics in HIV therapy. *AIDS Rev.* 7, 103-112.
- Roy, S.S., Ehrlich, A.M., Craigen, W.J., Hajnoczky, G., 2009. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* 10, 1341-1347.
- Russo, A., Terrasi, M., Agnese, V., Santini, D., Bazan, V., 2006. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann. Oncol.* 17 Suppl 7, vii115-vii123.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande, W.L., van, G.M., van, L.G., Vandenameele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sanchez, A., Cabrera, S., Santos, D., Valverde, M.P., Fuertes, A., Dominguez-Gil, A., Garcia, M.J., 2011. Population pharmacokinetic / pharmacogenetic model for optimization of efavirenz therapy in Caucasian HIV-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5314-5324.
- Sato, N., 2007. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22 Suppl 1, S1-S6.
- Schroder, M., Kaufman, R.J., 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29-63.
- Sebastia, J., Cristofol, R., Martin, M., Rodriguez-Farre, E., Sanfeliu, C., 2003. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry A* 51, 16-25.
- Shen, H.M., Codogno, P., 2011. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy.* 7, 457-465.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

Shen, X.D., Ke, B., Zhai, Y., Tsuchihashi, S.I., Gao, F., Duarte, S., Coito, A., Busuttil, R.W., Allison, A.C., Kupiec-Weglinski, J.W., 2007. Diannexin, a novel annexin V homodimer, protects rat liver transplants against cold ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Transplant.* 7, 2463-2471.

Shin, D.Y., Kim, G.Y., Li, W., Choi, B.T., Kim, N.D., Kang, H.S., Choi, Y.H., 2009. Implication of intracellular ROS formation, caspase-3 activation and Egr-1 induction in platycodon D-induced apoptosis of U937 human leukemia cells. *Biomed. Pharmacother.* 63, 86-94.

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320-7326.

Smith, J.A., Daniel, R., 2006. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem. Biol.* 1, 217-226.

Smith, P.F., Dicenzo, R., Morse, G.D., 2001. Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 893-905.

Smith, R.A., Hartley, R.C., Cocheme, H.M., Murphy, M.P., 2012a. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 341-352.

Smith, R.L., de, B.R., Brul, S., Budovskaya, Y., van, S.H., 2012b. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Front Genet.* 3, 328.

Soriano, V., Puoti, M., Garcia-Gasco, P., Rockstroh, J.K., Benhamou, Y., Barreiro, P., McGovern, B., 2008. Antiretroviral drugs and liver injury. *AIDS* 22, 1-13.

Spinardi, L., Witke, W., 2007. Gelsolin and diseases. *Subcell. Biochem.* 45, 55-69.

Stankov, M.V., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M., Vondran, F.W., Bauerfeind, R., Binz, A., Behrens, G.M., 2012. Autophagy inhibition due to thymidine analogues as novel mechanism leading to hepatocyte dysfunction and lipid accumulation. *AIDS* 26, 1995-2006.

Starr, S.E., Fletcher, C.V., Spector, S.A., Yong, F.H., Fenton, T., Brundage, R.C., Manion, D., Ruiz, N., Gersten, M., Becker, M., McNamara, J., Mofenson, L.M., Purdue, L., Siminski, S., Graham, B., Kornhauser, D.M., Fiske, W., Vincent, C., Lischner, H.W., Dankner, W.M., Flynn, P.M., 1999. Combination therapy with efavirenz, nelfinavir, and nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in children infected with human immunodeficiency virus type 1. Pediatric AIDS Clinical Trials Group 382 Team. *N. Engl. J. Med.* 341, 1874-1881.

Staszewski, S., Morales-Ramirez, J., Tashima, K.T., Rachlis, A., Skiest, D., Stanford, J., Stryker, R., Johnson, P., Labriola, D.F., Farina, D., Manion, D.J., Ruiz, N.M., 1999. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N. Engl. J. Med.* 341, 1865-1873.

Subramaniam, S., Strelau, J., Unsicker, K., 2003. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 8904-8912.

Sue, C.M., Schon, E.A., 2000. Mitochondrial respiratory chain diseases and mutations in nuclear DNA: a promising start? *Brain Pathol.* 10, 442-450.

Sun, Y., Peng, Z.L., 2009. Programmed cell death and cancer. *Postgrad. Med. J.* 85, 134-140.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880-885.

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

**Tabas, I., Ron, D., 2011.** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184-190.

**Tang, S.W., Ducroux, A., Jeang, K.T., Neuveut, C., 2012.** Impact of cellular autophagy on viruses: Insights from hepatitis B virus and human retroviruses. *J. Biomed. Sci.* 19, 92.

**Tashima, K.T., Bausserman, L., Alt, E.N., Aznar, E., Flanigan, T.P., 2003.** Lipid changes in patients initiating efavirenz- and indinavir-based antiretroviral regimens. *HIV. Clin. Trials* 4, 29-36.

**Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231-241.

**Taylor, S., Reynolds, H., Sabin, C.A., Drake, S.M., White, D.J., Back, D.J., Pillay, D., 2001.** Penetration of efavirenz into the male genital tract: drug concentrations and antiviral activity in semen and blood of HIV-1-infected men. *AIDS* 15, 2051-2053.

**Thornalley, P.J., Vasák, M., 1985.** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827, 36-44.

**Tsuchihashi, S., Kaldas, F., Chida, N., Sudo, Y., Tamura, K., Zhai, Y., Qiao, B., Busuttil, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., 2006.** FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 6, 2013-2022.

**Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2008.** Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433-446.

- Vakkila, J., Lotze, M.T., 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 641-648.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D.V., Festjens, N., Vandenabeele, P., 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 207-220.
- Vila, M., Przedborski, S., 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365-375.
- Walker, U.A., Setzer, B., Venhoff, N., 2002. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS* 16, 2165-2173.
- Wallace, D.C., Fan, W., Procaccio, V., 2010. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 297-348.
- Walters, K.A., Syder, A.J., Lederer, S.L., Diamond, D.L., Paeper, B., Rice, C.M., Katze, M.G., 2009. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS. Pathog.* 5, e1000269.
- Wang, Y., Singh, R., Xiang, Y., Czaja, M.J., 2010. Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology* 52, 266-277.
- Ward, B.A., Gorski, J.C., Jones, D.R., Hall, S.D., Flockhart, D.A., Desta, Z., 2003. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 287-300.

*Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz*

Weber, R., Sabin, C.A., Friis-Moller, N., Reiss, P., El-Sadr, W.M., Kirk, O., Dabis, F., Law, M.G., Pradier, C., De, W.S., Akerlund, B., Calvo, G., Monforte, A., Rickenbach, M., Ledergerber, B., Phillips, A.N., Lundgren, J.D., 2006. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. Arch. Intern. Med. 166, 1632-1641.

Wensing, A.M., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., 2010. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. Antiviral Res. 85, 59-74.

Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P., Vandenabeele, P., 2012. Autophagy: for better or for worse. Cell Res. 22, 43-61.

Wollert, K.C., Kempf, T., 2012. Growth differentiation factor 15 in heart failure: an update. Curr. Heart Fail. Rep. 9, 337-345.

Wong, R.S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J. Exp. Clin. Cancer Res. 30, 87.

Wu, C.W., Ping, Y.H., Yen, J.C., Chang, C.Y., Wang, S.F., Yeh, C.L., Chi, C.W., Lee, H.C., 2007. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 220, 243-251.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J.C., 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. J. Clin. Invest 115, 2656-2664.

Yamaguchi, T., Katoh, I., Kurata, S., 2002. Azidothymidine causes functional and structural destruction of mitochondria, glutathione deficiency and HIV-1 promoter sensitization. Eur J Biochem 269, 2782-2788.

Yan, M., Shen, J., Person, M.D., Kuang, X., Lynn, W.S., Atlas, D., Wong, P.K., 2008. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in Atm-deficient thymocytes and thymic lymphoma cells are attributable to oxidative stress. Neoplasia. 10, 160-167.



- Yang, M., Chitambar, C.R., 2008. Role of oxidative stress in the induction of metallothionein-2A and heme oxygenase-1 gene expression by the antineoplastic agent gallium nitrate in human lymphoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 763-772.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814-822.
- Yin, X.M., Ding, W.X., Gao, W., 2008. Autophagy in the liver. *Hepatology* 47, 1773-1785.
- You, J., He, Z., Chen, L., Deng, G., Liu, W., Qin, L., Qiu, F., Chen, X., 2010. CH05-10, a novel indinavir analog, is a broad-spectrum antitumor agent that induces cell cycle arrest, apoptosis, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cancer Sci.* 101, 2644-2651.
- Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47-59.
- Yuan, J., Kroemer, G., 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev.* 24, 2592-2602.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G., 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183, 1533-1544.
- Zeviani, M., Di, D.S., 2004. Mitochondrial disorders. *Brain* 127, 2153-2172.
- Zhang, K., Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.
- Zheng, Y.H., Lovsin, N., Peterlin, B.M., 2005. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol. Lett.* 97, 225-234.
- Zhou, H., Gurley, E.C., Jarujaron, S., Ding, H., Fang, Y., Xu, Z., Pandak, W.M., Jr., Hylemon, P.B., 2006. HIV protease inhibitors activate the unfolded

**Papel central de la mitocondria en la hepatotoxicidad inducida por efavirenz**

protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol 291, G1071-G1080.

Zhu, X.H., Wang, C.H., Tong, Y.W., 2007. Growing tissue-like constructs with Hep3B/HepG2 liver cells on PHBV microspheres of different sizes. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 82, 7-16.

Ziegler, U., Groscurth, P., 2004. Morphological features of cell death. News Physiol Sci. 19, 124-128.

Zimmers, T.A., Jin, X., Hsiao, E.C., Perez, E.A., Pierce, R.H., Chavin, K.D., Koniaris, L.G., 2006. Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms. J. Surg. Res. 130, 45-51.

Zong, W.X., Thompson, C.B., 2006. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev. 20, 1-15.

**ANEXO**

## PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

Nadezda Apostolova, **Leysa J. Gomez-Sucerquia**, Fernando Alegre, Haryes A. Funes, Victor M. Victor, Maria D. Barrachina, Juan Vicente Esplugues. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again en revisión. *Journal of Hepatology*.

Apostolova, N., **Gomez-Sucerquia, L.J.**, Gortat, A., Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., 2011. Autophagy as a rescue mechanism in efavirenz-induced mitochondrial dysfunction: a lesson from hepatic cells. *Autophagy*. 7, 1402-1404.

Apostolova, N., **Gomez-Sucerquia, L.J.**, Gortat, A., Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., 2011. Compromising mitochondrial function with the antiretroviral drug efavirenz induces cell survival-promoting autophagy. *Hepatology* 54, 1009-1019.

Apostolova, N., **Gomez-Sucerquia, L.J.**, Moran, A., Alvarez, A., Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., 2010. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br. J Pharmacol.* 160, 2069-2084.

**Gomez-Sucerquia, L.J.**, Blas-Garcia, A., Marti-Cabrera, M., Esplugues, J.V., Apostolova, N., 2012. Profile of stress and toxicity gene expression in human hepatic cells treated with Efavirenz. *Antiviral Res.* 94, 232-241.