







**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

**EFAVIRENZ INDUCE UNA RESPUESTA DIFERENCIAL EN  
LA BIOENERGÉTICA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE  
NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES**

**Tesis doctoral**  
**HARYES ALFREDO FUNES MAGAÑA**

**Directores:**

**Dr. Juan Vicente Esplugues Mota**  
**Dra. Nadezda Apostolova**

**Valencia, 2014**





**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

El Dr. **JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA**, Catedrático de la Universitat de València y la  
Dra. **NADEZDA APOSTOLOVA**, Profesor Ayudante Doctor de la Universitat Jaume I de  
Castellón,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado "Efavirenz induce una respuesta diferencial en la bioenergética y función mitocondrial de neuronas y células gliales", presentado por el Licenciado en Farmacia **Haryes Alfredo Funes Magaña**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departament de Farmacologia de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de la Tesis Doctoral.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 1 de Septiembre de 2014.

**Fdo. Dr. Juan Vicente Esplugues Mota**

**Fdo. Dra. Nadezda Apostolova**



Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de las siguientes becas y proyectos:

- Beca pre-doctoral Programa Santiago Grisolia para la formación de personal investigador en centros de investigación de la Comunitat Valenciana. GRISOLIA/2010/40. Generalitat Valenciana, Conselleria de Educació Cultura y Deporte. 2010 – 2013.
- Beca pre-doctoral de actuación local. Fundación Dr. Juan Esplugues. Facultad de Medicina de Valencia. 2013 – 2014.
- “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.
- “Farmacología experimental del tracto digestivo”. PROMETEO/2010/060. Programa de ayudas para el desarrollo de actuaciones de I+D por grupos de investigación de excelencia. Entidad financiera: Consellería de Educación, Generalitat Valenciana. Duración: 5 años.
- “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.



***“Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios”***

- ***Simón Bolívar***

***A DIOS  
y a mi familia***







# AGRADECIMIENTOS

Mientras realizaba mis estudios universitarios en mi querido país El Salvador siempre tuve la ilusión de poder estudiar un post-grado en el extranjero y le pedía con mucha fe en mis oraciones a Dios que me diera esa oportunidad, ya que sabía que en mi país son pocos los elegidos y afortunados que tienen este tipo de oportunidades. Cuando recibí la invitación a participar por la beca no lo dude en ningún instante y en el momento que me dieron la noticia de que yo era el elegido para gozar de esta gran oportunidad, mi ser se llenó de una alegría inmensa y a la vez que abrazaba a mis padres lloraba de felicidad por que Dios me había escuchado y mi sueño se iba hacer realidad. Recuerdo muy bien el instante en que me despedí de mi familia, mi madre más tarde me dijo “se me quito el deseo de seguir llorando cuando te vi lo decidido, contento e ilusionado que ibas a realizar tu sueño”, palabras que serán muy difíciles de olvidar. Ahora casi 4 años y medio después estoy culminando mi sueño, un reto que me llena de mucho orgullo y placer el poder decir “LO HE LOGRADO”, a pesar de los momentos difíciles, esfuerzos, sacrificios y vueltas que te da la vida “LO HE LOGRADO”.

El realizar esta tesis doctoral ha sido para mí una experiencia maravillosa, tanto en lo académico como en lo cotidiano, llena de momentos difíciles pero sin lugar a duda muchas más satisfacciones, no tengo palabras para poder explicar cómo me ha enriquecido como persona esta gran experiencia. Durante el desarrollo de la tesis he aprendido a trabajar duro, a exigirme, a no perder la esperanza, a confiar más en mí, a defender mis ideas y también hacer criticado, a trabajar en equipo y sobre todo apreciar la suerte que he tenido de trabajar en algo que me gusta y que con el paso del tiempo me ha terminado gustando más. En definitiva, el mérito de este triunfo tengo que compartirlo con todas esas personas que en todo este tiempo tuve el placer de conocer y que sin duda alguna han influido durante este largo recorrido.

Primeramente quiero agradecer a Dios, mi padre celestial, ya que sin El yo nada hubiera podido hacer, gracias por estar conmigo siempre, escuchar mis oraciones, cuidar de mi

familia y de mí, por llenarme de fuerzas cuando más lo necesitaba, y sobre todo por darme día a día esa alegría por vivir y la sabiduría necesaria para poder culminar esta gran aventura, denominada tesis doctoral. Dar las gracias de una manera especial al Dr. Juan Vicente Esplugues y a la Dra. Nadezda Apostolova por la dirección y asesoramiento de esta tesis. Juan Vicente muchas gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por confiar en mí, por apoyarme y ayudarme siempre durante todo este tiempo. Quiero agradecerle a Nade por todo el trabajo y tiempo empleado en la planificación, desarrollo y finalización de esta tesis, además por toda su experiencia y conocimientos aportados, por ser tan exigente y perfeccionista conmigo y por confiar en mí siempre, me has ayudado a crecer como profesional y como persona. Nade no tengo palabras para expresarte lo agradecido que estoy, ha sido un placer aprender de ti y trabajar contigo MUCHÍSIMAS GRACIAS. También agradecer de una forma particular a Will, por ser uno de los responsables de que yo pudiera iniciar este camino, gracias por estar conmigo al inicio de esta aventura, por integrarme al grupo y por abrirme las puertas de tu casa, lo pase de maravilla al lado de Irma y de Alfredito, gracias por darme ese calor de familia que necesitaba al principio.

La travesía de esta tesis doctoral me ha dado la oportunidad de estar rodeado de personas muy buenas, inteligentes y capaces, con sueños como yo y con una chispa tan llena de vida. Muchísimas gracias a todos mis compañeros de laboratorio, cada uno de ustedes me ha aportado algo, gracias por sufrir, vivir, pero sobre todo disfrutar de la ciencia, del trabajo en el laboratorio y fuera de este: a "Gómez" (Jackie) infinitas gracias por acogerme desde el primer momento, por enseñarme, apoyarme, por tu paciencia y tolerancia en mis comienzos, también agradecerte por ayudarme a conocer personas en Valencia que me ayudaron mucho a que yo me sintiera cómodo y querido. A Ana por sus consejos, apoyo y por mostrarme siempre con una sonrisa su dedicación a la ciencia. A Dolo por ir siempre de frente conmigo y por enseñarme que uno puede lograr cualquier cosa, siempre y cuando te lo propongas de verdad. A Miri por estar siempre dispuesta a ayudar, por demostrarme tu alegría y buen rollo y por hacerme sentir parte del grupo desde el primer momento. Víctor "crack" gracias por toda tu ayuda y por estar siempre pendiente de mí, no sé lo que

extrañare más, si nuestros grandes análisis sobre fútbol o sobre el funcionamiento del electrodo de Clarck (jejejeje). Gracias Annia por mostrarme siempre ese cariño y calidez humana, verte sonreír le da fuerzas a cualquiera. A Irene por irradiar de alegría el laboratorio, gracias por los consejos que me diste recién llegado al laboratorio, me han ayudado a ver las cosas con mucha inteligencia y tranquilidad. A Nando y Miriam, chicos mil gracias por estar apoyándome y ayudándome durante todo el tiempo que hemos estado juntos, por su sinceridad, por darme ese aliento cuando más lo necesitaba, por las dificultades y satisfacciones vividas, y de manera especial por estar pendientes de mi familia, son unos personas estupendas!!!!

Agradecer a Alberto por tu genial compañía y honestidad, chaval nunca cambies, “eres el yerno que todo padre quisiera tener” jejeje. A Lara por su manera incansable y desinteresada de ayudar. A Carmen, Jesús, Samu y César por todos los momentos de dispersión vividos fuera del laboratorio. A Brian por su paciencia y por hacernos las cosas del laboratorio mucho más fáciles. También agradecer a Loles, Sara, Ángeles, Elsa, Carlos, M<sup>a</sup> Ángeles y Miguel Martí, el compromiso y dedicación que nos demuestran a la ciencia son motivos de inspiración, gracias por sus consejos, observaciones y disposición de ayudar. Desearles lo mejor a los más nuevos, Víctor, Dulce, Nicol y Jorge que todo les vaya muy pero muy bien. No me podía olvidar de Mario, Antonio, Sonia y Edu, que a pesar de estar un corto tiempo en el laboratorio, me demostraron su apoyo, alegría y buen humor, su buena compañía me hicieron pasar mucho mejor el día a día. A todas las personas que componen el departamento de farmacología, agradecerles por estar siempre cuando se les necesita.

Quiero dar las gracias al Dr. Juan Esplugues Requena Q.E.P.D., fundador de este grupo de investigación, por mostrarnos el buen camino a seguir en la ciencia, por estar siempre pendiente de las necesidades del personal investigador; como becario de la Fundación Juan Esplugues agradezco inmensamente su aportación a la realización de esta tesis.

También quiero agradecer a mis amigos Gassan, Paula, Antonio y Luis, ya que a pesar de no pertenecer al mismo laboratorio me han demostrado su amistad y cariño, gracias chicos por estar conmigo en todo momento, por escuchar mis inquietudes y problemas y por darme

ese apoyo moral que sin duda me ayudo a coger fuerzas y a seguir adelante. Lo he pasado genial con su compañía y sí que nos hemos divertido eh. A mis amigos en El Salvador, David, Oscar, Juan, Ever, Arnoldo, Laura, Walter, Clemente, Armando, etc., infinitas gracias por siempre animarme y estar pendientes de mí en todo momento a pesar de la distancia, se les aprecia de corazón. Además, quiero agradecer de manera muy pero muy especial a Alex, Jesús, Rubén, Mau y Diego, por apoyarme en los momentos difíciles, aguantarme, escucharme, por hacerme sentir como en casa y por todas esas fiestas y rumbas míticas que nos dimos; solo siento alegría al recordarme de todos los momentos vividos. Al “team mestalla”, chicos no tengo palabras para describir lo geniales que son, jamás olvidare todo lo que compartimos (risas, anécdotas, barbacoas, fiestas, partidos del Valencia CF) mil gracias por ser tan especiales y cuidar de mí.

Con estas palabras, aunque me he quedado corto, he querido dar las gracias a TODOS porque directa o indirectamente han participado de este logro, gracias por conseguir que en ningún momento perdiera la ilusión ni las ganas de seguir, por hacerme sentir querido y respetado, y sobre todo por ser unos seres maravillosos, este triunfo lo comparto con todos ustedes, los llevaré siempre en mi mente y mi corazón. Estaré ETERNAMENTE AGRADECIDO!!!!

Para finalizar, quiero agradecer a mi familia, a los que dedico esta tesis: a mis padres por apoyar mi sueño, por sus oraciones, por estar siempre pendientes de mí durante todo este recorrido y creer siempre en mí. A mis hermanos Odir y Byron por buscar que yo siempre estuviera contento, tranquilo y que hubiera una sonrisa en mi rostro. Gracias hermanos por cuidar de nuestra familia ante mi ausencia. Agradecer a la familia de mi esposa, por su paciencia, comprensión, apoyo y confianza. A mis grandes amores Jessica y Mateo, son mi fuerza y el motivo de mi vida, Jessica sin tu apoyo esto no sería realidad, sin duda alguna Dios me ha puesto una gran mujer a mi lado. Mateo “mi chelito guapo”, eres el mejor regalo que me ha dado Dios, tu sonrisa, el verte crecer y tus ganas de vivir son motivos suficientes para llenar mi vida de felicidad, LOS AMO con todo mi ser, gracias por existir.

## ***ABREVIATURAS***



$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\Delta p$	Potencial de gradiente electroquímico de protones
4-AF	4-aminofenazona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
Akt	Proteína quinasa B
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANI	Deterioro neurocognitivo asintomático
AP-1	Factor de transcripción de la proteína activadora 1
APC/C-CDH1	Complejo promotor de la anafase activado por CDH1
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
AZT	Zidovudina
BCA	Ácido bicinconínico
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
$Ca^{2+}$	Calcio
CAT	Catalasa
CcO	Citocromo c oxidasa
$CO_2$	Dióxido de carbono
CoQ <sub>1</sub>	Coenzima Q <sub>1</sub>
CTE	Cadena transportadora de electrones
$Cu^{2+}$	Cobre
$Cu_2SO_4$	Sulfato de cobre

<b>CYP</b>	<b>Citocromo P450</b>
<b>d4T</b>	<b>Estavudina</b>
<b>DAR-4M</b>	<b>Diaminorodamina-4M AM</b>
<b>db-cAMP</b>	<b>N (6), 2'-O-dibutiril-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico</b>
<b>DBH<sub>2</sub></b>	<b>Decilubiquinona reducida</b>
<b>DCPIP</b>	<b>2,6-diclorofenol-indofenol</b>
<b>ddC</b>	<b>Zalcitabina</b>
<b>ddl</b>	<b>Didanosina</b>
<b>DETA-NO</b>	<b>(Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil)amino]diazén-1-ium-1,2-diolato</b>
<b>DHR 123</b>	<b>Dihidrorodamina 123</b>
<b>DMEM</b>	<b><i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i></b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetil sulfóxido</b>
<b>DNasa</b>	<b>Desoxirribonucleasa</b>
<b>DRV</b>	<b>Darunavir</b>
<b>DTT</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>EBSS</b>	<b><i>Earle's Balanced Salt Solution</i></b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etildiamino tetraacético</b>
<b>EFV</b>	<b>Efavirenz</b>
<b>ERO</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>ERON</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno</b>
<b>ERN</b>	<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>
<b>F2,6P<sub>2</sub></b>	<b>Fructosa-2,6-bifosfato</b>
<b>FBS</b>	<b>Suero fetal bovino</b>
<b>FCCP</b>	<b>Cianuro de 4-carbonil-(trifluorometoxi) fenilhidrazona</b>
<b>GAPDH</b>	<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</b>
<b>GLUT</b>	<b>Transportador facilitador de glucosa independiente de la</b>

	energía
<b>GMPc</b>	<b>Guanosín monofosfato cíclico</b>
<b>Gpx</b>	<b>Glutación peroxidasas</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutación</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>HAD</b>	<b>Demencia asociada al VIH</b>
<b>HAND</b>	<b>Trastornos neurocognitivos asociados al VIH</b>
<b>HBSS</b>	<b><i>Hank's Balanced Salt Solution</i></b>
<b>HCl</b>	<b>Ácido clorhídrico</b>
<b>HCAEC</b>	<b>Células humanas endoteliales de la arteria coronaria</b>
<b>HEPES</b>	<b>Ácido 4 (2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico</b>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>Factor inducible por hipoxia 1 alfa</b>
<b>HIVE</b>	<b>Encefalitis por el VIH</b>
<b>Hoechst 33342</b>	<b>bisBenzimida H33342 trihidrocloruro</b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografía líquida de alta eficiencia</b>
<b>HRP</b>	<b>Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)</b>
<b>HS</b>	<b>Suero de caballo</b>
<b>IF</b>	<b>Inhibidores de la fusión</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>II</b>	<b>Inhibidores de la integrasa</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gamma</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleucina-1</b>
<b>IP</b>	<b>Inhibidores de la proteasa</b>
<b>IP</b>	<b>Ioduro de propidio</b>
<b>ITIAN</b>	<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nuclósidos/nucleótidos</b>
<b>ITINAN</b>	<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de</b>

	nucleósidos
$K_2HPO_4$	Fosfato dibásico de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
$KH_2PO_4$	Fosfato monobásico de potasio
L-Arg	L-Arginina
LB	Línea base
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster
L-PGDS	L-prostaglandina D sintasa
LO	Lactato oxidasa
LPS	Lipopolisacárido
LPS ck	Cóctel de LPS
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MND	Trastorno neurocognitivo leve
MTT	Bromuro de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
$N_2O_3$	Trióxido de dinitrógeno
$N_2O_4$	Tetróxido de dinitrógeno
$NaN_3$	Azida sódica
$Na_2S_2O_4$	Ditionito sódico
$Na_2MoO_4$	Molibdato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

<b>NADH</b>	<b>Dinucleótido de nicotinamida y adenina</b>
<b>NADPH</b>	<b>NAD fosfato reducido</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Factor nuclear kappa B</b>
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	<b>Dióxido de nitrógeno</b>
<b>NO•</b>	<b>Radical de óxido nítrico</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>NOS</b>	<b>Óxido nítrico sintasa</b>
<b>NOSc</b>	<b>Óxido nítrico sintasa dependiente del calcio</b>
<b>NOSe o NOS3</b>	<b>Óxido nítrico sintasa endotelial</b>
<b>NOSi o NOS2</b>	<b>Óxido nítrico sintasa inducible</b>
<b>NOSmt</b>	<b>Óxido nítrico sintasa mitocondrial</b>
<b>NOSn o NOS1</b>	<b>Óxido nítrico sintasa neuronal</b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno</b>
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b>	<b>Superóxido</b>
<b>OCR</b>	<b>Tasa de consumo de oxígeno</b>
<b>OH•</b>	<b>Hidroxilo</b>
<b>ONOO•<sup>-</sup></b>	<b>Peroxinitrito</b>
<b>ONOOH</b>	<b>Ácido peroxinitroso</b>
<b>OXPHOS</b>	<b>Fosforilación oxidativa</b>
<b>PARP</b>	<b>Poli-ADP-ribosa polimerasa</b>
<b>Pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampón fosfato salino</b>
<b>PFK1</b>	<b>6-fosfofructo-1-quinasa</b>
<b>PFKFB</b>	<b>6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa</b>
<b>PHOX</b>	<b>NADH oxidasa de los fagocitos</b>
<b>P<sub>i</sub></b>	<b>Fosfato inorgánico</b>
<b>PI-3K</b>	<b>Fosfoinositol 3-quinasa</b>

<b>PKG</b>	<b>Proteína quinasa G</b>
<b>POD</b>	<b>Peroxidasa</b>
<b>PPP</b>	<b>Vía pentosa fosfato</b>
<b>Prx</b>	<b>Peroxirredoxinas</b>
<b>PTIO</b>	<b>2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxilo 3-óxido</b>
<b>PTP</b>	<b>Poro de transición de permeabilidad</b>
<b>QH•</b>	<b>Ubisemiquinona</b>
<b>RAL</b>	<b>Raltegravir</b>
<b>RE</b>	<b>Retículo endoplasmático</b>
<b>rNMDA</b>	<b>receptor <i>N</i>-metil-D-aspartato</b>
<b>RO•</b>	<b>Radical alcoxilo</b>
<b>ROO•</b>	<b>Radical peroxilo</b>
<b>ROT</b>	<b>Rotenona</b>
<b>RPMI</b>	<b><i>Roswell Park Memorial Institute</i></b>
<b>RPV</b>	<b>Rilpivirina</b>
<b>sCD40L</b>	<b>Ligando CD40 soluble</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil sulfato sódico</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS</b>
<b>SEM</b>	<b>Error estándar de la media</b>
<b>SIDA</b>	<b>Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida</b>
<b>SIN-1</b>	<b>Clorhidrato de 3-morfolinosisidnonimina</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervioso central</b>
<b>STS</b>	<b>Estaurosporina</b>
<b>(Cu/ZnSOD o SOD1)</b>	<b>Cobre/Zinc superóxido dismutasa</b>
<b>(MnSOD o SOD2)</b>	<b>Manganeso superóxido dismutasa</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>TARc</b>	<b>Terapia Antirretroviral Combinada</b>

<b>TARGA</b>	<b>Terapia Antirretroviral de Gran Actividad</b>
<b>TBS</b>	<b>Tampón tris salino</b>
<b>TBS-T</b>	<b>Tampón tris salino - Tween</b>
<b>TCA</b>	<b>Ácido tricarboxílico</b>
<b>TDO</b>	<b>Triptófano-2-3-dioxigenasa</b>
<b>TEMED</b>	<b>N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina</b>
<b>TMRM</b>	<b>Tetrametilrodamina</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral-alfa</b>
<b>Tris</b>	<b>2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol</b>
<b>UCP</b>	<b>Proteínas de desacoplamiento</b>
<b>UQ<math>\bullet^-</math></b>	<b>Ubisemiquinona</b>
<b>UQ</b>	<b>Ubiquinona</b>
<b>VDAC</b>	<b>Canal aniónico dependiente de voltaje</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de la inmunodeficiencia humana</b>
<b>WB</b>	<b>Western blot</b>

# LISTA DE FIGURAS

	Pág.
I.1. Representación esquemática del ciclo de vida del VIH	4
I.2. Estructura química de EFV	18
I.3. Esquema representativo de la estructura de la mitocondria con sus principales componentes.	21
I.4. Representación esquemática de la generación de ERO en la CTE mitocondrial	26
I.5. Representación simplificada de los principales sistemas enzimáticos de detoxificación de ERO mitocondriales	28
I.6. Representación esquemática del mecanismo de la disfunción mitocondrial	32
I.7. Representación de las vías del metabolismo de la glucosa en las células nerviosas	38
I.8. Esquema de la utilización diferencial de la glucosa en astrocitos y neuronas	40
I.9. Esquema de la síntesis de NO	43
I.10. Representación esquemática de la síntesis de NO en las células cerebrales	45
I.11. Principales objetivos del NO y peroxinitrito en la CTE mitocondrial	51
III.1. Reacciones electroquímicas que tienen lugar en el electrodo de O <sub>2</sub> tipo Clark	68
III.2. Componentes y montaje del electrodo de oxígeno tipo Clark	68

<b>III.3. Oxidación de la luciferina a oxiluciferina mediada por la enzima luciferasa</b>	<b>70</b>
<b>III.4. Reacciones acopladas que muestran la oxidación del L-lactato a piruvato mediada por la enzima lactato oxidasa</b>	<b>71</b>
<b>III.5. Analizador de flujo extracelular Seahorse XF24, acoplado a un ordenador con el software XF y una microplaca con su cartucho e inyectores</b>	<b>81</b>
<b>IV.1. Análisis del consumo de O<sub>2</sub> tras la administración directa de EFV a neuronas diferenciadas (SH-SY5Y) y células gliales (U-251MG)</b>	<b>92</b>
<b>IV.2. Análisis del efecto de EFV sobre la producción de ERO mitocondriales en neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>94</b>
<b>IV.3. Efecto de EFV sobre la producción de ERO mitocondrial en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata</b>	<b>95</b>
<b>IV.4. Análisis del efecto de EFV sobre el <math>\Delta\psi_m</math> en neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>96</b>
<b>IV.5. Análisis del efecto de EFV sobre el <math>\Delta\psi_m</math> en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata</b>	<b>97</b>
<b>IV.6. Efecto del tratamiento de EFV sobre el número de células en neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>98</b>
<b>IV.7. Análisis del efecto de EFV sobre la viabilidad celular</b>	<b>100</b>
<b>IV.8. Impacto de EFV sobre la actividad individual de los complejos de la CTE en las células gliales</b>	<b>102</b>
<b>IV.9. Impacto de EFV sobre la actividad individual de los complejos de la CTE en las neuronas diferenciadas</b>	<b>103</b>
<b>IV.10. Esquema del perfil bioenergético utilizado para evaluar el efecto agudo de EFV sobre la función mitocondrial.</b>	<b>104</b>

<b>IV.11. Análisis del OCR tras tratamiento con EFV en las neuronas diferenciadas</b>	<b>106</b>
<b>IV.12. Análisis del OCR tras tratamiento con EFV en las células gliales</b>	<b>107</b>
<b>IV.13. Capacidad respiratoria de reserva y capacidad respiratoria máxima, expresadas respecto a la respiración basal</b>	<b>109</b>
<b>IV.14. Análisis en co-cultivo celular de la función mitocondrial y recuento de células en presencia de EFV</b>	<b>111</b>
<b>IV.15. Efecto de DRV, RPV y RAL sobre la función mitocondrial de neuronas primarias de córtex de rata</b>	<b>113</b>
<b>IV.16. Efecto de DRV, RPV y RAL sobre la viabilidad celular de neuronas primarias de córtex de rata</b>	<b>114</b>
<b>IV.17. Análisis del efecto de EFV sobre la expresión de la AMPK-P por WB</b>	<b>115</b>
<b>IV.18. Determinación de la concentración de ATP intracelular tras el tratamiento con EFV</b>	<b>116</b>
<b>IV.19. Determinación de la concentración de lactato en el medio extracelular de neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>117</b>
<b>IV.20. Determinación de la concentración de lactato en el medio extracelular de neuronas y astrocitos primarios corticales de rata</b>	<b>118</b>
<b>IV.21. Determinación de la concentración de lactato en el medio extracelular de las células gliales tratadas con EFV + CC</b>	<b>119</b>
<b>IV.22. Análisis del consumo de O<sub>2</sub> en neuronas diferenciadas y células gliales intactas co-tratadas con EFV y DETA-NO</b>	<b>121</b>
<b>IV.23. Efecto de EFV sobre la función mitocondrial en neuronas diferenciadas y células gliales en presencia de DETA-NO</b>	<b>122</b>

<b>IV.24. Análisis de los niveles de ATP intracelular y producción de lactato en neuronas diferenciadas y células gliales co-tratadas con EFV y DETA-NO</b>	<b>123</b>
<b>IV.25. Análisis de los niveles de ATP intracelular y producción de lactato en neuronas y astrocitos primarios de córtex de rata co-tratados con EFV y DETA-NO</b>	<b>124</b>
<b>IV.26. Efecto de EFV sobre el número de células en presencia de NO exógeno (DETA-NO)</b>	<b>125</b>
<b>IV.27. Efecto de PTIO en la producción de ERO mitocondriales y en el número de células de neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>126</b>
<b>IV.28. Determinación de la activación de apoptosis en neuronas diferenciadas y células gliales</b>	<b>128</b>
<b>IV.29. Determinación de la activación de apoptosis en neuronas y astrocitos primarios corticales de rata</b>	<b>129</b>
<b>IV.30. Efecto de EFV sobre la proliferación celular (72 h) en células gliales</b>	<b>130</b>
<b>IV.31. Análisis del efecto de EFV sobre la expresión de las isoformas de la NOS por WB</b>	<b>132</b>
<b>IV.32. Determinación de la producción de NO en las células gliales y neuronas diferenciadas tras tratamiento con EFV</b>	<b>134</b>
<b>IV.33. Determinación de la producción de NO en astrocitos y neuronas primarias corticales de rata tras tratamiento con EFV</b>	<b>135</b>
<b>IV.34. Interferencia del NO en el consumo de O<sub>2</sub> celular de las células gliales y neuronas diferenciadas</b>	<b>137</b>
<b>IV.35. Interferencia del NO en la función mitocondrial de células gliales y neuronas diferenciadas</b>	<b>138</b>
<b>IV.36. Intervención del NO en la bioenergética de las células gliales</b>	<b>139</b>

<b>IV.37. Impacto de EFV sobre la actividad del CIV de la CTE mitocondrial</b>	<b>140</b>
<b>IV.38. Efecto de EFV sobre la producción de peroxinitrito intracelular en las células gliales</b>	<b>141</b>
<b>IV.39. Comparación entre los niveles de NO inducidos por EFV y el donante DETA-NO</b>	<b>142</b>
<b>V.1. Representación esquemática del efecto de EFV en la bioenergética de las células gliales y las neuronas</b>	<b>153</b>
<b>V.2. Representación esquemática de los efectos de EFV sobre las células gliales y neuronas en presencia de un estímulo pro-inflamatorio</b>	<b>158</b>
<b>V.3. Representación de como el NO inducido por EFV interfiere con la función mitocondrial y la bioenergética en las células gliales.</b>	<b>161</b>

## **LISTA DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
<b>I.1. Familias de fármacos antirretrovirales utilizadas para tratar la infección por VIH</b>	<b>8</b>
<b>I.2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas para la triple terapia en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Principales efectos adversos asociados al uso de los distintos fármacos antirretrovirales</b>	<b>12</b>
<b>I.4. Eventos adversos neuropsiquiátricos selectivos asociados con los fármacos antirretrovirales</b>	<b>16</b>
<b>III.1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los análisis de WB</b>	<b>76</b>
<b>IV.1. Parámetros mitocondriales obtenidos del análisis por OCR en las células gliales y neuronas diferenciadas expresados como % respecto a la respiración basal</b>	<b>108</b>



***RESUMEN***



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 de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Durante muchos años ha contribuido significativamente a la evolución de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y a pesar de ser considerado un fármaco seguro y bien tolerado, existe una creciente preocupación debido a que los regímenes que lo contienen han sido asociados con efectos adversos. La reacción adversa más notable asociada a EFV son los trastornos neuropsiquiátricos siendo un importante factor de riesgo para el fracaso de la terapia. Los mecanismos responsables no han sido todavía caracterizados, aunque algunos trabajos recientes vinculan su toxicidad con la disfunción del metabolismo energético del cerebro.

En el presente trabajo, utilizando un modelo *in vitro* hemos evaluado los efectos de concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes de este fármaco en la función mitocondrial y en la bioenergética celular en los dos tipos de células con mayor presencia en el SNC: neuronas y células gliales. Así mismo, se determinó como la presencia de un estímulo pro-inflamatorio, como lo es la presencia del óxido nítrico (NO), interviene en las acciones provocadas por EFV.

El tratamiento con EFV afectó directamente la función mitocondrial de ambos tipos celulares, disminuyendo la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, el consumo total de oxígeno ( $O_2$ ) y el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Como consecuencia de esta disfunción mitocondrial, una reducción en la viabilidad y número de células en las neuronas fue provocada después de 24 h de tratamiento con EFV, efecto que fue menor en las células gliales. La excelencia de EFV ha sido cuestionada ante la llegada de los antirretrovirales de última generación, tales como la rilpirvirina (RPV), otro ITINAN, el inhibidor de la integrasa (II) raltegravir (RAL) y el inhibidor de la proteasa (IP) darunavir (DRV). La pretensión principal de estos nuevos fármacos es obtener un perfil toxicológico más seguro mientras mantienen una eficacia y supresión virológica similar a las de EFV. Análisis realizados con concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes de estos anti-VIH demostraron que no afectan a la función mitocondrial o ponen en riesgo la viabilidad celular de las neuronas, a diferencia de lo observado con EFV. Además en este estudio se

demonstró que EFV, provoca una respuesta diferencial en la bioenergética de las células gliales y de las neuronas, manifestada por la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK) de una forma dependiente de la concentración en las células gliales, dando lugar a la regulación al alza de la glucólisis y en consecuencia al incremento de los niveles de ATP intracelular, respuestas que no se observaron en las neuronas. La incubación con un inhibidor de la activación de este complejo enzimático previno la regulación al alza de la glucólisis, confirmando la implicación de la AMPK. En esta tesis, también se pudo determinar que los efectos mitocondriales producidos por EFV en las células gliales y neuronas fueron agravados en presencia del NO, mientras que los efectos sobre la bioenergética de las células gliales se ven potenciados. Además, se observó que el tratamiento con EFV fue capaz de inducir la síntesis de NO en las células gliales pero no en las neuronas, y en consecuencia, el NO generado de esta manera parece ser relevante en la interferencia mitocondrial y en los efectos bioenergéticos generados por EFV en las células gliales.

En conclusión, el presente trabajo describe que EFV produce una disfunción mitocondrial en neuronas y células gliales, provocando una respuesta diferencial en su bioenergética celular, efectos se ven potenciados en presencia del NO. Dichas respuestas celulares a la exposición a EFV pueden ayudar a entender los mecanismos responsables de los síntomas neuropsiquiátricos generados por este fármaco, ya que a veces son acompañados de la neuroinflamación, y de efectos a largo plazo, como lo es HAND

## ***ÍNDICE***



<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. GENERALIDADES DEL VIRUS DE LA 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) .....	7
2.3. Inhibidores de la proteasa (IP) .....	7
2.4. Inhibidores de la integrasa (II) .....	7
2.5. Inhibidor de la fusión (IF) .....	8
2.6. Inhibidor del correceptor CCR5 .....	8
2.7. Pautas en la terapia antirretroviral .....	8
<b>3. EFECTOS ADVERSOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL</b> .....	<b>11</b>
3.1. Neurotoxicidad asociada a la terapia antirretroviral .....	14
<b>4. EFAVIRENZ</b> .....	<b>17</b>
<b>5. MITOCONDRIA</b> .....	<b>19</b>
5.1. Estructura mitocondrial.....	19
5.2. Función de la mitocondria .....	20
5.3. Toxicidad mitocondrial .....	22
5.4. Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).....	23
<b>6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)</b> .....	<b>25</b>
6.1. Detoxificación de especies reactivas de oxígeno .....	27
<b>7. ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	<b>29</b>
7.1. El estrés oxidativo induce apoptosis .....	29
7.2. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en enfermedades humanas .....	31
7.3. Estrés oxidativo y su relación con los efectos neuropsiquiátricos.....	32

7.4. El estrés oxidativo y los eventos adversos asociados con la terapia antirretroviral.....	33
7.5. El VIH induce estrés oxidativo .....	34
<b>8. BIOENERGETICA CELULAR .....</b>	<b>35</b>
8.1. Metabolismo de la glucosa en el cerebro .....	36
8.2. La glucólisis en las células nerviosas.....	38
<b>9. ÓXIDO NÍTRICO (NO) .....</b>	<b>41</b>
9.1. Generación de óxido nítrico en las células nerviosas.....	43
9.2. Metabolismo de óxido nítrico y oxígeno .....	46
9.3. Efecto del óxido nítrico y de las especies reactivas de nitrógeno sobre la viabilidad celular .....	47
9.3.1. Inducción de necrosis .....	48
9.3.2. Inducción de apoptosis .....	48
9.4. Inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial por óxido nítrico .....	49
<b>10. NEURODEGENERACIÓN INFLAMATORIA .....</b>	<b>52</b>
10.1. El óxido nítrico y la neurodegeneración inflamatoria .....	53
10.2. EL VIH y la persistente inflamación del SNC.....	54
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>1. REACTIVOS .....</b>	<b>63</b>
1.1. Obtención de Efavirenz .....	63
1.2. Reactivos químicos generales .....	63
1.3. Reactivos para el cultivo celular .....	64
<b>2. CULTIVO CELULAR.....</b>	<b>64</b>
2.1. Líneas celulares.....	64
2.2. Cultivos primarios de rata .....	65

2.3. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	66
<b>3. TRATAMIENTOS .....</b>	<b>66</b>
<b>4. MEDICIÓN ELECTROQUÍMICA DE CONSUMO DE OXÍGENO.....</b>	<b>67</b>
<b>5. NIVELES DE ATP INTRACELULAR.....</b>	<b>70</b>
<b>6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LACTATO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. VIABILIDAD CELULAR.....</b>	<b>72</b>
<b>8. EXPRESION PROTEICA.....</b>	<b>72</b>
8.1. Obtención de las muestras .....	72
8.1.1. Obtención de extractos proteicos totales .....	73
8.1.2. Obtención de extractos proteicos totales protegiendo las fosforilaciones .....	73
8.2. Cuantificación de proteína: ensayo del ácido bicinonínico (BCA) .....	73
8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western blot (WB).....	74
8.3.1. Geles de poliacrilamida.....	74
8.3.2. Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa.....	75
8.4. Detección por quimioluminiscencia .....	76
8.5. Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa .....	77
<b>9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CITOMETRIA ESTÁTICA .....</b>	<b>77</b>
9.1. Proliferación celular y supervivencia.....	78
9.2. Detección del ion superóxido mitocondrial .....	78
9.3. Detección del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	78
9.4. Detección de óxido nítrico (NO) .....	79
9.5. Detección de peroxinitrito.....	79
9.6. Apoptosis .....	79
9.6.1. Análisis bivariado de Anexina V/IP .....	79
9.7. Eliminación de óxido nítrico en tratamientos con DETA-NO .....	80

<b>10. CO-CULTIVO .....</b>	<b>80</b>
<b>11. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL UTILIZANDO EL ANALIZADOR DE FLUJO EXTRACELULAR “SEAHORSE XF24” .....</b>	<b>80</b>
<b>12. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL .....</b>	<b>82</b>
12.1. Reactivos para el análisis de los complejos mitocondriales.....	82
12.2. Preparación de homogenizado celular.....	82
12.3. Análisis de la actividad enzimática de los complejos mitocondriales a partir del homogenado celular.....	83
12.3.1. Complejo I (NADH-Ubiquinona Oxidoreductasa) .....	83
12.3.2. Complejo II (Succinato deshidrogenasa) .....	84
12.3.3. Complejo III (Citocromo bc1).....	85
12.3.4. Complejo IV (Citocromo c oxidasa).....	86
<b>13. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>87</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
<b>BLOQUE 1: CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES.....</b>	<b>91</b>
<b>1. EFAVIRENZ ALTERA LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y COMPROMETE LA VIABILIDAD CELULAR.....</b>	<b>91</b>
1.1. Análisis del consumo de oxígeno.....	91
1.2. Determinación de los niveles de ion superóxido de origen mitocondrial .....	93
1.3. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	95
1.4. Análisis de la proliferación y supervivencia celular .....	98
1.5. Análisis de la viabilidad celular .....	99
1.6. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	101
1.7. Determinación de la función mitocondrial con el analizador de flujo extracelular XF24.....	104

1.8. Efecto de EFV en co-cultivos de células gliales – neuronas .....	110
1.9. Análisis de los efectos de darunavir, rilpivirina y raltegravir sobre la función mitocondrial y viabilidad celular en neuronas.....	112
<b>BLOQUE 2: DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE LA BIOENERGÉTICA EN NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES .....</b>	<b>114</b>
<b>2. EFAVIRENZ AFECTA A LA BIOENERGÉTICA DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES DE MANERA DIFERENTE.....</b>	<b>115</b>
2.1. Evaluación de la expresión proteica de AMPK-P.....	115
2.2. Determinación de los niveles de ATP intracelular.....	116
2.3. Análisis de la producción de lactato extracelular.....	117
<b>BLOQUE 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES BAJO LA PRESENCIA DE UN ESTÍMULO PRO-INFLAMATORIO .....</b>	<b>119</b>
<b>3. LOS EFECTOS DE EFV SE EXACERBAN EN PRESENCIA DE UN ESTÍMULO PRO-INFLAMATORIO.....</b>	<b>120</b>
3.1. Análisis del consumo de oxígeno.....	120
3.2. Producción de ion superóxido mitocondrial y $\Delta\psi_m$ .....	120
3.3. Análisis de la activación de la glucólisis.....	123
3.4. Análisis sobre el número de células .....	124
3.5. Análisis de la activación de la apoptosis.....	128
<b>BLOQUE 4: DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO INDUCIDA POR EFAVIRENZ EN CÉLULAS GLIALES Y NEURONAS.....</b>	<b>131</b>
<b>4. EFV INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS GLIALES PERO NO EN NEURONAS .....</b>	<b>131</b>
4.1. EFV activa la óxido nítrico sintasa en su isoforma inducible.....	131
4.2. Detección del óxido nítrico producido por EFV .....	133
4.3. Determinación de la participación del óxido nítrico inducido por EFV en la función mitocondrial y bioenergética de las células nerviosas.....	135

4.4. Impacto de EFV sobre la actividad del complejo IV de la CTE.....	139
4.5. Determinación de peroxinitrito intracelular .....	141
4.6. Comparación de los niveles de óxido nítrico inducido por EFV y el donante exógeno, DETA-NO.....	142
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>143</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>165</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>211</b>
<b>PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA DERIVADA DE ESTA TESIS .....</b>	<b>213</b>

## ***I. INTRODUCCIÓN***



## 1. GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se clasifica dentro de la familia *Retroviridae* y pertenece al género *Lentivirus*. Es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi F. *et al.*, 1983). Se han descrito dos tipos de VIH genéticamente distintos, VIH-1 y VIH-2 que tienen características epidemiológicas similares; si bien el VIH-1 está más extendido y es el responsable de la mayor parte de los casos de infección, el VIH-2 es menos transmisible y patogénico, y se encuentra fundamentalmente en África occidental (De Cock K.M. *et al.*, 1993). Según la OMS y ONUSIDA, a finales de 2012 había en el mundo unos 35,3 millones de personas infectadas por el VIH. Ese mismo año, contrajeron la infección aproximadamente 2,3 millones de personas y alrededor de 1,6 millones murieron por causas relacionadas con el SIDA (OMS and ONUSIDA, 2013).

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

Las células que el VIH invade son esencialmente los linfocitos T CD4+, pero también en menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro. La replicación viral tiene lugar en tejidos diversos, pero como todos los virus, el VIH no se puede replicar por sí mismo, sino lo hace dentro de una célula hospedera. Los retrovirus como el VIH tienen el material genético en forma de ácido ribonucleico (ARN), que se convierte en ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la utilización de la enzima transcriptasa inversa del propio virus. Este ADN vírico es incorporado en el genoma humano y utiliza la maquinaria celular para su expresión (Smith J.A. and Daniel R., 2006).

El ciclo de vida del VIH está compuesto por varios pasos (Figura I.1.). Empieza mediante la asociación del virus con un receptor CD4 y uno de dos correceptores en la superficie de un linfocito T CD4+, fusionándose con la célula hospedera y permitiendo la liberación del contenido de la cápside viral dentro de ella. Tras la retrotranscripción del ARN vírico en ADN

vírico por la transcriptasa inversa del VIH, el ADN vírico entra al núcleo de la célula anfitriona donde con ayuda de la enzima integrasa del VIH, integra al ADN vírico en el ADN de la célula anfitriona. Después de la transcripción y traducción, y con la acción de la proteasa vírica, se producen nuevos virus ensamblados que “brotan” de la célula anfitriona (Zheng Y.H. *et al.*, 2005; Smith J.A. and Daniel R., 2006).

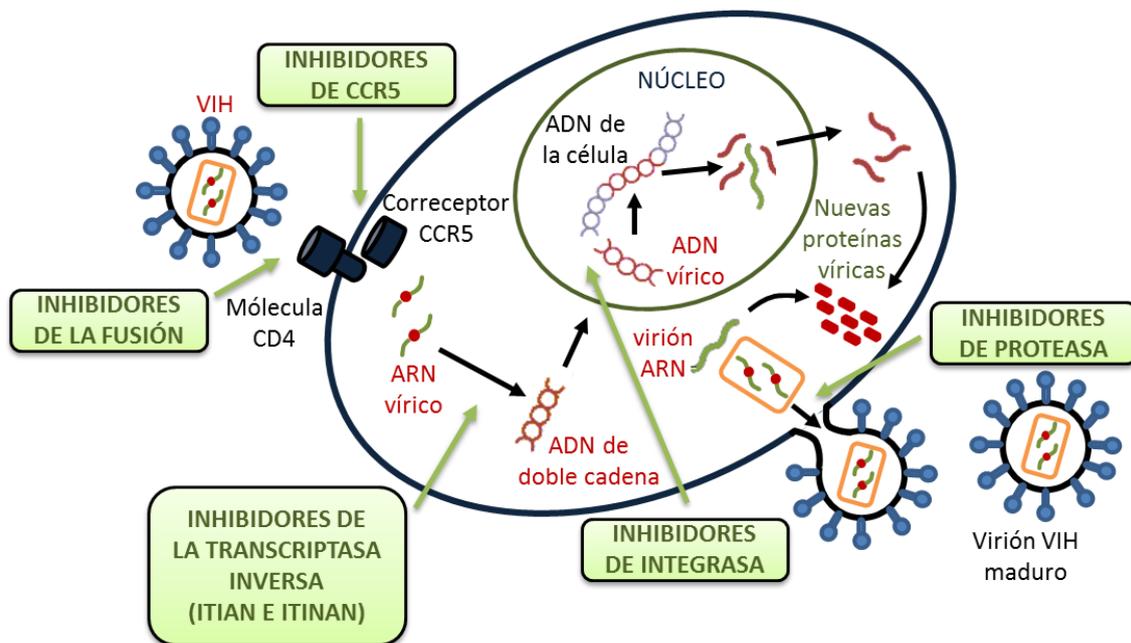


Figura I.1. Representación esquemática del ciclo de vida del VIH. El texto en rojo muestra las estructuras del virus involucradas en la replicación celular. Los cuadros verdes representan las diferentes familias de fármacos antirretrovirales y las flechas en verde muestran el sitio del ciclo del virus sobre el cual actúan.

La transmisión del VIH solo se puede realizar a través del contacto entre fluidos corporales que poseen una alta concentración viral, y puede ser a través de contacto sexual, 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 (Crandall K.A., 2001).

La infección por el VIH se presenta en diversas etapas identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos, y aunque pueda ser muy variable entre los pacientes, se caracteriza por presentar una fase aguda breve asociada con altos niveles de la carga viral que suele ser clínicamente asintomática; le sigue una fase de latencia en la cual se produce

un deterioro gradual del sistema inmune por una gran producción de nuevas partículas virales y una disminución en el número de linfocitos T CD4+, acabando por último en el desarrollo del SIDA. Esta última es la fase crítica de la infección por VIH, en la que el sistema inmunológico del portador del VIH es incapaz de reponer los linfocitos T CD4+ que pierde bajo el ataque del virus, por lo que los niveles plasmáticos de estas células llegan a alcanzar niveles menores a 200 células/ $\mu$ L. Este fenómeno coincide con el aumento en las tasas de replicación del virus, que merma la capacidad de reacción del anfitrión ante otros agentes causantes de enfermedades. De esta manera, el portador del virus es presa potencial de numerosas infecciones oportunistas que pueden conducir a la muerte (Pantaleo G. *et al.*, 1993).

## 2. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

El primer fármaco antirretroviral empleado en la lucha contra el VIH fue zidovudina (AZT), sintetizada por Hortwitz en 1964 como un falso nucleósido para ser utilizado como antineoplásico. En 1985 se observó que AZT era un agente efectivo contra el VIH *in vitro* (Mitsuya H. *et al.*, 1985) y en 1987 se aprobó su uso para el tratamiento de esta infección (Fischl M.A. *et al.*, 1987).

La introducción a mediados de los 90 de los primeros compuestos de nuevas familias farmacológicas 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 utilización de combinaciones de varios fármacos antirretrovirales. Estos tratamientos combinados actúan incrementando el número de obstáculos para la mutación viral y mantienen bajo el número de copias virales. Los agentes antirretrovirales individualmente no suprimen la infección por el VIH a largo plazo, por lo cual deben usarse en el régimen de combinación para lograr el mayor beneficio posible, la mejor tolerabilidad y cumplimiento, y disminuir el riesgo del desarrollo de resistencia (De Clercq E., 2009). La TARGA ha conseguido prolongar la supervivencia en los pacientes infectados, debido a la restauración y preservación de sus funciones inmunológicas que conlleva a la reducción de la mortalidad y morbilidad, mejorando así su calidad de vida (Mocroft A. *et al.*, 2003; Panos G.

*et al.*, 2008). El inconveniente es que no se puede erradicar el genoma viral de los tejidos, suponiendo esto un deterioro inmunológico y clínico de las personas infectadas.

Actualmente se emplean 27 fármacos antivirales en el tratamiento de la infección por el VIH (Tabla I.1.) clasificados en seis familias según el mecanismo por el cual interfieren en el ciclo replicativo del virus (Figura I.1.) (de Bethune M.P., 2010):

- Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIAN)
- Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)
- Inhibidores de la proteasa (IP)
- Inhibidores de la integrasa (II)
- Inhibidores de la fusión (IF)
- Inhibidores del correceptor CCR5

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

Los ITIAN fueron los primeros fármacos anti-VIH aprobados y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la actividad de la transcriptasa inversa del VIH (Balzarini J., 1994). Son moléculas derivadas de los nucleósidos adenosina, citidina, guanosina y timidina, y una vez dentro de la célula, deben de ser activados (fosforilados) para generar la forma 5'-trifosfato que es incorporada en el ADN celular como sustrato alternativo, a excepción del tenofovir, que al ser un análogo de nucleótido no requiere este proceso químico, dado que al poseer un grupo fosfato en su estructura química está activado. La incorporación de los ITIAN conduce a la terminación de la cadena de ADN ya que carecen del extremo 3'OH y evitan la incorporación de más nucleótidos (Hao Z. *et al.*, 1990; De Clercq E., 2002).

## **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 inhiben su actividad (De Clercq E., 2009). 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-García A. *et al.*, 2011a).

## **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 e impidiendo de esta manera 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, ya que se encarga de cortar las nuevas poliproteínas sintetizadas para generar proteínas víricas maduras y funcionales (Wensing A.M. *et al.*, 2010).

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

Este grupo de fármacos inhibe la actividad catalítica de la integrasa del VIH evitando así la inserción del genoma del VIH en el ADN de la célula huésped, un paso esencial en el ciclo de replicación del VIH (Pandey K.K., 2011). Raltegravir era el único II utilizado comercialmente, pero elvitegravir, un nuevo II, actualmente está siendo utilizado en EE.UU. como parte de una combinación a dosis fija (Mills A. *et al.*, 2014). Además, se están realizando estudios con otros fármacos similares (Korolev S.P. *et al.*, 2011; Wu G. *et al.*, 2014).

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	RAL	Raltegravir
	EVG	Elvitegravir
IF	ENF	Enfuvirtida
Inhibidor CCR5	MRC	Maraviroc

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

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

La enfurvirtida es el único fármaco 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 la realización de los cambios conformacionales necesarios para que se lleve a cabo la fusión de la cubierta del virus con la membrana de la célula, y por tanto, la entrada del virus (Matthews T. *et al.*, 2004).

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

El único inhibidor del correceptor CCR5 disponible es el maraviroc. Es únicamente activo contra el VIH que tiene tropismo por este receptor, y no contra el VIH que tiene tropismo con el receptor CXR4 o el que tiene tropismo mixto (CCR5/CXR4). Este fármaco actúa al inicio del ciclo del virus, evitando la entrada del VIH en la célula hospedera mediante el bloqueo de la actividad del correceptor CCR5 que facilita la entrada de algunas cepas del VIH (Ghebremedhin B., 2012).

## **2.7. Pautas en la terapia antirretroviral**

Desde el logro de la terapia TARGA en 1996, la multiterapia antirretroviral se ha convertido cada vez más eficaz en la inhibición de la replicación del VIH y en la limitación a la resistencia viral, haciéndola ampliamente aceptada. Esta terapia tiene 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 E., 2009).

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. Son varias las estrategias de la TARGA que varían con el estado de la infección y las características del paciente, y son frecuentemente actualizadas. De acuerdo con las directrices actuales (Tabla

I.2.), el tratamiento de elección de la infección por el VIH-1 consiste en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociados a un ITINAN, un IP o un II. Con estas combinaciones se puede conseguir una carga viral plasmática inferior a 50 copias/mL en más del 75% de los casos a las 48 semanas (Gesida, 2014; Clumeck N. *et al.*, 2008).

Recomendaciones	Pauta antirretroviral		
	ITIAN	ITIAN	3 <sup>er</sup> Fármaco
<b>Preferentes</b>	Tenofovir Abacavir	Emtricitabina Lamivudina	<b>ITINAN</b> Efavirenz Ralpivirina  <b>IP</b> Atazanavir Darunavir  <b>II</b> Raltegravir Elvitegravir
<b>Alternativas</b>	Tenofovir Abacavir	Emtricitabina Lamivudina	<b>ITINAN</b> Efavirenz Nevirapina  <b>IP</b> Darunavir Lopinavir

Tabla I.2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas para la triple terapia en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH, según GESIDA en 2014.

En la última década, se han producido mejoras importantes en el tratamiento y el cuidado de los pacientes con el VIH. Entre ellas se incluye la llegada de nuevos fármacos más eficaces, menos tóxicos y más fáciles de tomar que, con frecuencia, tienen actividad frente a virus resistentes a fármacos, por lo que muchos pacientes han sido capaces de recibir

nuevos regímenes antirretrovirales capaces de controlar la replicación viral. La TARGA no erradica el VIH, pero la enfermedad puede ser controlada, por lo que el tratamiento debe continuar durante toda la vida del paciente. La exposición crónica 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 han adquirido gran importancia los efectos adversos asociados a la terapia y los mecanismos de toxicidad producidos por los fármacos presentes en ella (Blas-García A. *et al.*, 2011a).

### **3. EFECTOS ADVERSOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

Los efectos adversos inmediatos están bien definidos, en algunos casos pueden anticiparse y suelen ser fáciles de controlar. Afectan principalmente a la esfera digestiva, cutánea, o neuropsicológica y su incidencia y factores asociados son conocidos. Muchos de estos efectos desaparecen en algunas semanas y la mayoría de los pacientes los superan. Sin embargo, si los síntomas persisten a largo plazo, éstos son más difíciles de prever y controlar. También, potencian los síntomas de las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento y afectan al funcionamiento de órganos y sistemas. Entre los efectos adversos más comunes generados por la TARGA a largo plazo destacan: síndrome metabólico, lipodistrofia, hiperlipidemia, resistencia a insulina y toxicidades a nivel hepático, cardíacas, de riñón, medula ósea, retina, oído y piel (Hofman P. and Nelson A.M., 2006). Si bien es cierto, algunos de estos efectos adversos se han descrito de manera general para la TARGA, también hay ciertas toxicidades relacionadas con las familias farmacológicas y otras más específicas de cada compuesto en particular (Maggiolo F., 2009; Blas-García A. *et al.*, 2010; Caron-Debarle M. *et al.*, 2010; Apostolova N. *et al.*, 2011). En la Tabla I.3., se describen los principales efectos adversos asociados a cada fármaco antirretroviral.

Existen diversos factores que influyen en la presencia/ausencia de toxicidad asociada a los fármacos antirretrovirales, entre ellos: la adherencia a la terapia, enfermedades concurrentes, las interacciones entre fármacos así como las variaciones entre individuos provocadas por la edad, el sexo, el estatus nutricional y de forma especial la variación genética, responsable en gran parte de la variabilidad en la respuesta a la terapia (Evans W.E. and McLeod H.L., 2003; Rodriguez-Novoa S. *et al.*, 2005).

En general, el riesgo absoluto de efectos secundarios tardíos con los fármacos antirretrovirales actualmente recomendados es muy pequeño y el beneficio en términos de salud global de una pauta de la TARGA efectiva respecto a la opción de no tratar está fuera de duda. Sin embargo, en pacientes en alto riesgo o con enfermedades crónicas ya diagnosticadas, el efecto de determinados antirretrovirales puede contribuir por sí mismo a desencadenar o hacer progresar, respectivamente, tales enfermedades crónicas.

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

<b>ITINAN</b>		
<b>EFV</b>	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
<b>ETR</b>	Reacciones cutáneas	Nauseas
<b>NVP</b>	Reacciones cutáneas, síndrome de Stevens-Johnson, reacciones de hipersensibilidad, hepatotoxicidad	Incremento de los niveles plasmáticos de transaminasas
<b>DLV</b>	Reacciones cutáneas	–
<b>RPV</b>	Reacciones cutáneas	–
<b>IP</b>		
<b>RTV</b>	Riesgo cardiovascular, hepatotoxicidad, resistencia a la insulina, dislipidemia	–
<b>ATV</b>	Bloqueo atrioventricular de primer grado, nefrolitiasis	Hiperbilirrubinemia indirecta
<b>DRV</b>	Síndrome de Stevens-Johnson, eritema multiforme, hepatotoxicidad	Reacciones cutáneas, náuseas, diarrea
<b>fAPV</b>	Dislipidemia	Reacciones cutáneas, náuseas, diarrea
<b>IDV</b>	Nefrolitiasis, riesgo cardiovascular, hiperbilirrubinemia	Piel seca, uñas encarnadas, hipertrigliceridemia, astenia, náuseas, diarrea
<b>SQV</b>	Riesgo cardiovascular	Dolor de cabeza, diarrea
<b>TPV</b>	Hemorragias cerebrales, riesgo cardiovascular, hepatotoxicidad	Náuseas, diarrea
<b>NFV</b>	Riesgo cardiovascular, dislipidemia	–
<b>LPV</b>	Riesgo cardiovascular, resistencia a la insulina, dislipidemia	–
<b>APV</b>	Riesgo cardiovascular, dislipidemia	–
<b>II</b>		
<b>RGV</b>	–	Dolor de cabeza, diarrea, fiebre

IF		
ENF	Hipersensibilidad	Infección local en el sitio de reacción, incremento del riesgo de neumonía bacterial
Inhibidores CCR5		
MRC	Posible linfoma, hepatotoxicidad	Vértigo, reacciones cutáneas, hipotensión ortostática, infecciones en el trato respiratorio superior

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

### 3.1. Neurotoxicidad asociada a la terapia antirretroviral

Es esencial que los fármacos antirretrovirales atraviesen la barrera hematoencefálica, ya que es conocido que el SNC es un potencial reservorio de la infección por el VIH. Sin embargo, estos fármacos son asociados con una variedad de efectos adversos sobre el sistema nervioso central y periférico. La frecuencia y severidad de los eventos adversos neuropsiquiátricos es muy variable, con diferencias entre las clases de antirretrovirales y entre los fármacos individuales en cada clase. En la Tabla I.4., se describen los principales efectos neuropsiquiátricos asociados a los fármacos antirretrovirales.

La neuropatía periférica es un efecto secundario común y limitante de la dosis de los ITIAN, que se llega a manifestar en hasta un tercio de los pacientes (Lipsky J.J., 1993; Moore R.D. *et al.*, 2000), y se ha sugerido que la neuropatía periférica inducida por los ITIAN es causada por toxicidad acumulativa (Phan V., 2012). La ddi, d4T y ddC claramente desempeñan un papel en la neuropatía periférica inducida por los antirretrovirales, son considerados agentes neurotóxicos al nivel periférico y rara vez se utilizan como agentes de primera línea cuando existen otras opciones (Robbins G.K., 2003; Hulgán T. *et al.*, 2005). El mecanismo de la neurotoxicidad por ITIAN es conocido e implica la inhibición del ADN mitocondrial (ADNmt) polimerasa  $\gamma$ , en axones y células de Schwann, resultando en el agotamiento del ADNmt (véase apartado 5.3. Toxicidad mitocondrial), además, otras enzimas mitocondriales están

también involucrados (Brinkman K. *et al.*, 1998; Dalakas M.C. *et al.*, 2001; Keswani S.C. *et al.*, 2002).

De los ITINAN, efavirenz (EFV) es el agente antirretroviral más prescrito y más comúnmente asociado con neurotoxicidad, caracterizada por síntomas neuropsiquiátricos específicos que ocurren en un 60 - 90% de los pacientes y en algunos casos, estos efectos son tan graves que la terapia se debe interrumpir (Fumaz C.R. *et al.*, 2005; Cavalcante G.I. *et al.*, 2010). Los síntomas incluyen mareos, dolor de cabeza, confusión, problemas de concentración, agitación, amnesia, síntomas psicóticos, alteraciones del sueño como sueños anormales e insomnio. Otros trastornos que se han reportado en menor medida (0,4 – 1,6%) de pacientes que toman EFV son los casos de depresión, ilusiones, ideaciones suicidas y paranoia (Jena A. *et al.*, 2009). Todos estos síntomas por lo general aparecen durante los primeros días de tratamiento y dan lugar a la interrupción temprana de EFV en aproximadamente 4 - 10% de los pacientes (Muñoz-Moreno J.A. *et al.*, 2009), aunque algunos investigadores han descrito altas tasas de interrupción que varían entre un 16 - 24% de los pacientes (Faggian F. *et al.*, 2005). La prevalencia de la mayoría de los síntomas neuropsiquiátricos declina en pocas semanas y permite la continuación con la terapia, sin embargo, en una minoría de los pacientes, se ha observado que los trastornos neuropsiquiátricos persisten durante períodos más largos (48 semanas) (Gazzard B. *et al.*, 2011), o aparecen por primera vez después de varios meses de tratamiento con EFV (Perez-Molina J.A. *et al.*, 2002; Arendt G. *et al.*, 2007; Kenedi C.A. and Goforth H.W., 2011). Es de destacar que EFV ha sido asociado con el deterioro neurocognitivo incluso en pacientes asintomáticos infectados por el VIH (Cicarelli N. *et al.*, 2011). Además, un estudio reciente ha informado que recibir tratamiento con EFV durante un período largo de tiempo puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos neurocognitivos asociados al VIH (HAND) (Wang Z. *et al.*, 2013).

A pesar del hecho de que los IP tienen escasa penetración en la barrera hematoencefálica (BHE), hay pruebas que sugieren que éstos son inherentemente neurotóxicos y potencian la neuropatía periférica inducida por ITIAN (Ellis R.J. *et al.*, 2008; Evans S.R. *et al.*, 2011). Dada la tendencia de los IP para influir en el metabolismo de fármacos, hay que considerar los fármacos administrados conjuntamente como una causa potencial de toxicidad en el SNC.

Ritonavir ha mostrado ser consistentemente el de mayor potencial neurotóxico de todos los IP (Bonfanti P. *et al.*, 2000) y aunque los mecanismos causantes de la neurotoxicidad por IP aún no se han descrito, se ha observado que indinavir induce citotoxicidad en macrófagos agotando la liberación de factores de crecimiento neurotróficos disponibles para las neuronas, pudiendo llegar a resultar en neuropatía sensorial (Pettersen J. *et al.*, 2006). Con respecto a las otras familias de antirretrovirales, es muy poca la evidencia de efectos neuropsiquiátricos causados por estos fármacos. Cabe mencionar la posible toxicidad sobre el SNC que pueda tener el raltegravir, un II al que se le han atribuido en un bajo porcentaje de pacientes ciertos efectos adversos neuropsiquiátricos (Tepler H. *et al.*, 2011).

Los efectos adversos generados por los antirretrovirales en el SNC y periférico pueden ser también potenciados por la presencia de factores de riesgo como el abuso del alcohol y drogas (Ferrari L.F. and Levine J.D., 2010; Gaskill P.J. *et al.*, 2013) y en cierta medida por la presencia de HAND, ya que esta enfermedad se encuentra presente hasta en un 70% de las personas infectadas con el virus (Heaton R.K. *et al.*, 2010). HAND puede llegar a generar un aumento en la permeabilidad de la BHE y por tanto, favorecer el paso de los fármacos antirretrovirales al SNC, alcanzando una concentración tóxica en esa estructura biológica (Marra C.M. *et al.*, 2009; Davidson D.C. *et al.*, 2012).

<b>Fármaco antirretroviral</b>	<b>Efecto adverso</b>
<b>Común (&gt;10%)</b>	
Efavirenz	Mareos, insomnio, sueños vívidos, problemas de concentración, dolor de cabeza, comportamiento agresivo, ansiedad
Zidovudina	Miopatía
ITIAN	Neuropatía periférica
Ritonavir	Parestesia peribucal
Raltegravir	Miopatía
<b>Ocasional (1 a &lt;10%)</b>	
Efavirenz	Pérdida de memoria, alucinaciones, depresión
Ritonavir	Neuropatía periférica, disgeusia
Enfuvirtide	Neuropatía periférica

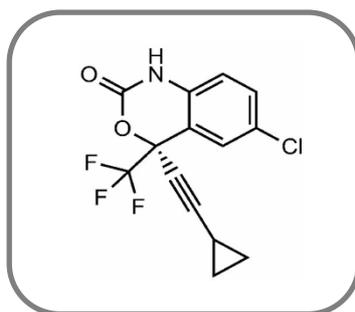
Raltegravir	Dolor de cabeza, mareos, tendencias suicidas, pesadillas
<b>Raro (&lt;1%)</b>	
Efavirenz	Manía
ITIAN	Cefaleas, insomnio

**Tabla I.4. Eventos adversos neuropsiquiátricos selectivos asociados con los fármacos antirretrovirales (Abers M.S. *et al.*, 2014).**

#### 4. EFAVIRENZ (EFV)

Efavirenz ((S)-6-cloro-4-ciclopropiletinil-4-trifluorometil-1, 4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona) (Figura I.2.), un ITIAN, que durante los últimos 10 años ha sido un componente importante del tratamiento de la infección por el VIH y ha contribuido significativamente a la evolución de la TARGA. Actualmente, EFV es una opción recomendada para la terapia inicial y generalmente es considerado como el ITIAN preferido (Clumeck N. *et al.*, 2008; Gazzard B.G., 2008). Gracias a su larga vida media plasmática (44 – 55 h) permite un efecto de larga duración en la reducción del ARN viral con una dosis diaria (600 mg), lo que le permite tener una gran eficacia (Smith P.F. *et al.*, 2001; Maggiolo F., 2009). Se convierte en metabolitos inactivos hidroxilados por el sistema del citocromo P450 (CYP). CYP2B6 es una de las principales isoenzimas responsables del metabolismo de EFV aunque también están involucradas CYP3A4 y CYP2A6 (Ward B.A. *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 marcadas diferencias en las concentraciones plasmáticas del fármaco dependientes de la genética del individuo (Bumpus N.N. *et al.*, 2006; Desta Z. *et al.*, 2007; King and Aberg., 2008).



**Figura I.2. Estructura química de efavirenz (EFV, C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>), el ITIAN más utilizado para el tratamiento de la infección por el VIH.**

Aunque EFV se considera un fármaco seguro y bien tolerado, existe una creciente preocupación debido a que las terapias que lo contienen han sido asociadas con efectos adversos como reacciones cutáneas, disturbios neuropsiquiátricos, alteraciones metabólicas particularmente a nivel de los lípidos y hepatotoxicidad (Maggiolo F., 2009; Loko M.A. *et al.*, 2011; Apostolova N. *et al.*, 2013; Abers M.S. *et al.*, 2014). 4% - 16% de los pacientes tratados con EFV más dos ITIAN han discontinuado el tratamiento debido a los eventos adversos. Las reacciones adversas más notables asociadas a EFV son la erupción cutánea y los trastornos neuropsiquiátricos. Estos últimos se han reportado en aproximadamente el 60 - 90% de los pacientes que recibieron EFV (Fumaz C.R. *et al.*, 2002). Está bien demostrado que los efectos adversos en el SNC son un importante factor de riesgo para el fracaso de la terapia. Sin embargo, los mecanismos responsables de estos trastornos no han sido completamente determinados, aunque la disfunción del metabolismo energético del cerebro podría estar implicada (Streck E.L. *et al.*, 2008; Streck E.L. *et al.*, 2011). Además, 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 (Landriscina M. *et al.*, 2005; Karamchand L. *et al.*, 2008). Informes recientes sugieren una aguda y directa toxicidad mitocondrial inducida por EFV en células hepáticas humanas *in vitro* que se manifiesta por disminución de la respiración mitocondrial con la inhibición específica del complejo I de la cadena transportadora de electrones, provocando reducción del  $\Delta\psi_m$  y una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas acciones comprometen la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la generación de adenosín trifosfato (ATP), lo que lleva al incremento de la expresión de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), el principal

sensor celular de estrés energético. Estos rápidos cambios fueron seguidos por un incremento en la masa mitocondrial en ausencia de un aumento de la biogénesis mitocondrial. Además, en este modelo concentraciones mayores de EFV indujeron un efecto tóxico sobre la viabilidad y proliferación celular, promoviendo la apoptosis, que fue parcialmente causada por el estrés oxidativo mitocondrial generado (Apostolova N. *et al.*, 2010; Blas-García A. *et al.*, 2010).

## 5. MITOCONDRIA

### 5.1. Estructura mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos presentes en casi todas las células eucarióticas (excepto en eritrocitos maduros). Su morfología es difícil de definir, suelen describirse como cilindros alargados, su tamaño oscila entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud. En términos generales las mitocondrias pueden ocupar hasta un 25% del volumen de la célula y su forma, número, tamaño y ubicación subcelular dependen de las necesidades energéticas de la célula (Lodish H. *et al.*, 2003).

La estructura de este orgánulo (Figura I.3.) consiste en dos membranas, una externa (MME) que cubre a la mitocondria y una interna (MMI) que se pliega sobre si misma formando invaginaciones que reciben el nombre de crestas. La MME es permeable a iones y solutos de hasta 14 kDa, debido a que contiene proteínas que forman poros, denominadas porinas o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). La segunda membrana, sin embargo, no es permeable y contiene proteínas de membrana cuya función es el transporte de metabolitos. 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. La morfología y tamaño de estos orgánulos, así como su comportamiento y localización en la célula, son variables y dependen de interacciones entre proteínas de la superficie externa y componentes del citoesqueleto, sugiriendo que las mitocondrias son estructuras dinámicas que responden a señales ambientales y de desarrollo para satisfacer las necesidades celulares.

La mitocondria es un orgánulo semiautónomo, ya que para su biogénesis además de su propio genoma requiere también el genoma nuclear, de hecho la mayoría de los constituyentes necesarios para los sistemas metabólicos y la estructura molecular provienen de genes nucleares. El genoma mitocondrial (ADNmt) es constituido de ADN circular de doble cadena compuesto de 16569 pares de bases (pb), predominantemente exones, que codifica para 22 ARN de transferencia, 2 ARN ribosómicos y 13 proteínas. La replicación del ADNmt se produce por un mecanismo no ligado al ciclo celular. Cada mitocondria contiene 2 – 10 copias de ADNmt 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 cerebro, hígado, músculo cardiaco y esquelético tienen un alto contenido de mitocondrias (Amacher D.E., 2005).

### 5.2. Función de la mitocondria

La mitocondria es la principal fuente de obtención de energía química en forma de ATP en presencia de oxígeno ( $O_2$ ), por medio de un proceso denominado fosforilación oxidativa (Figura 1.3.). Este proceso se lleva a cabo por un conjunto de cinco grandes complejos proteicos (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 (Smith R.A. *et al.*, 2012). La actividad de estos complejos esta modulada en función de los requerimientos energéticos de las células, a corto y largo plazo (Rich P.R. *et al.*, 2010).

El Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa cataliza la transferencia de electrones desde el NADH, generado principalmente en la oxidación de glúcidos y lípidos, hacia el coenzima Q o ubiquinona. Este flujo de electrones provoca el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. La ubiquinona es también el receptor de los electrones que proceden de la oxidación del succinato en el ciclo de Krebs y que le son cedidos por el Complejo II o succinato-ubiquinona reductasa, actuando como un punto de entrada alternativo de electrones a la CTE. Esta transferencia de electrones no está acoplada a translocación 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. La tercera bomba de protones es el CIV o citocromo *c* oxidasa (Cco) que oxida al citocromo *c* y cede los electrones al O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O (Poyton R.O. *et al.*, 2009). Los complejos del I al IV aprovechan la energía derivada del transporte de electrones desde el NADH y FADH<sub>2</sub> hasta el O<sub>2</sub> para generar un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. La energía potencial acumulada en este gradiente es utilizada por el CV o ATP sintasa (ATPasa) para sintetizar ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) y P<sub>i</sub> (fosfato inorgánico) (Poyton R.O. *et al.*, 2009).

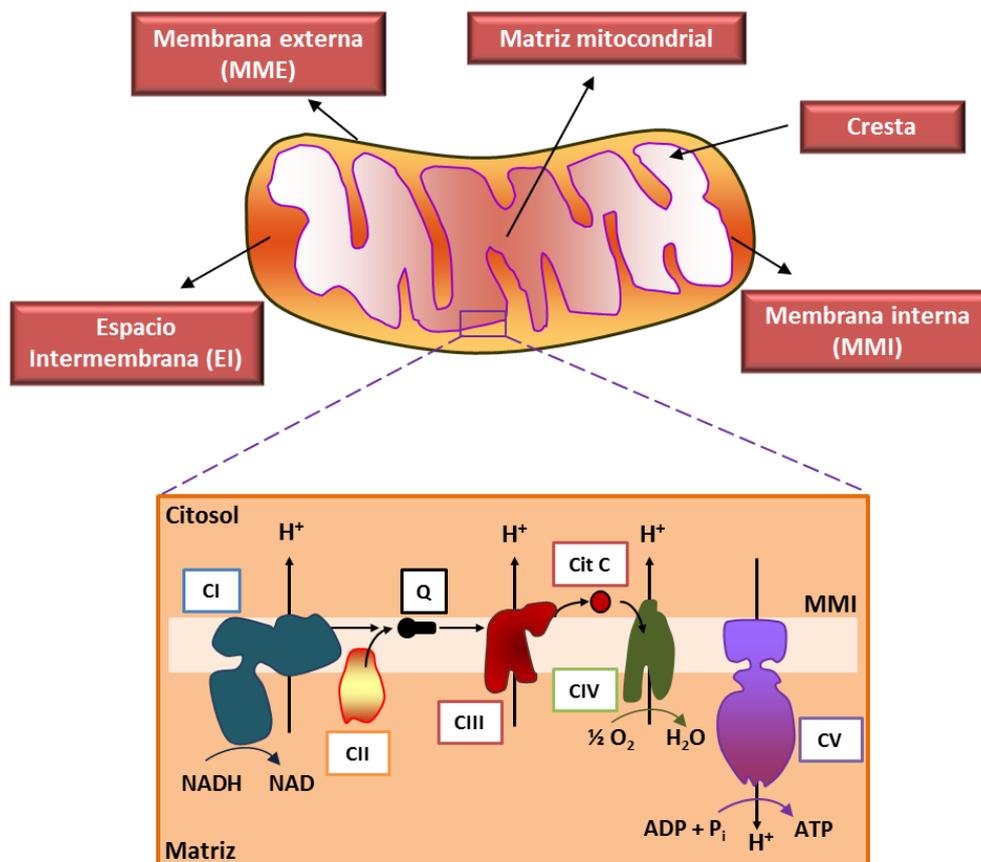


Figura 1.3. Esquema representativo de la estructura de la mitocondria con sus principales componentes. En el recuadro se destacan los complejos proteicos que componen a la CTE: complejo I al V (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo *c* reductasa, citocromo *c* oxidasa y ATP sintasa).

### 5.3. Toxicidad mitocondrial

La disfunción mitocondrial es un mecanismo fundamental en la patogénesis de varias toxicidades significativas en mamíferos, especialmente las asociadas con el hígado, músculo cardiaco y esquelético, y en el SNC, ya que sus células presentan un número particularmente elevado de mitocondrias y por lo tanto tienden a ser susceptibles a las sustancias químicas que afecten a las mitocondrias pudiendo conducir a hepatotoxicidad, miopatías y síndromes neurológicos (Amacher D.E., 2005).

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 OXPHOS, el estrés oxidativo y/o apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Labbe G. *et al.*, 2008). Muchos efectos adversos importantes asociados a la TARGA son consecuencia de la toxicidad mitocondrial, pero estos han sido principalmente atribuidos a los ITIAN y han sido explicados por la “hipótesis de la ADN polimerasa mitocondrial (ADN pol- $\gamma$ )” (Martin J.L. *et al.*, 1994; Walker U.A. *et al.*, 2002; Apostolova N. *et al.*, 2011).

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 S.K. *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 la depleción del ADNmt (Lewis W. *et al.*, 2003; Lewis W. *et al.*, 2006). Puesto que el ADNmt codifica varios polipéptidos involucrados en la CTE, la disminución de los niveles de ADNmt y de los polipéptidos codificados por él lleva en últimas a la disminución de la OXPHOS provocando así disfunción mitocondrial (Kohler and Lewis, 2007; Chiao S.K. *et al.*, 2009).

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 (Sato N., 2007; Abdul-Ghani and DeFronzo, 2008). La evidencia reciente (*in vitro*) sugiere una interacción de este grupo de fármacos con dianas mitocondriales implicadas en la regulación de la bioenergética y la apoptosis (Apostolova N. *et al.*, 2011). Aunque la repercusión clínica de esta interacción no se ha determinado, puede ser relevante en el contexto de las enfermedades presentes en los pacientes con TARGA a largo plazo.

Habitualmente, la toxicidad mitocondrial afecta a tejidos que tienen una alta demanda energética, y se manifiesta mayormente como miopatía, neuropatía periférica, hepatotoxicidad, hiperlactatemia y acidosis láctica; también se ha descrito otras alteraciones relacionadas con la disfunción mitocondrial tales como disturbios en el metabolismo lipídico (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 (Petit F. *et al.*, 2005; Hammer S.M. *et al.*, 2008; Maagaard and Kvale, 2009; Feeney and Mallon 2010; Feeney and Mallon, 2011).

#### **5.4. Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

Es un parámetro fisiológico mitocondrial fundamental ya que controla tres procesos celulares fundamentales: la síntesis de ATP, el secuestro del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mitocondrial, y la generación de ERO, por lo que representa un indicador clave de la salud celular (Perry S.W. *et al.*, 2011). La cadena respiratoria mitocondrial comprende tres bombas de protones (CI, CIII y CIV), en serie con respecto al transporte de electrones y en paralelo con respecto al circuito de los protones, que puede ser considerada como análoga a un equivalente circuito eléctrico. El  $\Delta\psi_m$ , sufre cambios característicos en respuesta a la generación o el uso del circuito de protones. Las mitocondrias generan ATP mediante la utilización de un potencial de gradiente electroquímico de protones, o fuerza motriz de protones electroquímicos ( $\Delta p$ ), generado por el paso de electrones a través de la CTE. La fuerza total de conducción de

protones en las mitocondrias (es decir,  $\Delta p$ ), es una combinación de ambos, el  $\Delta\psi_m$  (una carga o gradiente eléctrico) y el gradiente de pH mitocondrial. Bajo la mayoría de circunstancias, el  $\Delta\psi_m$  es el componente dominante del  $\Delta p$ , lo que representa 150 - 180 mV de la fuerza motriz total del protón que va de 200 a 220 mV (Nicholls D.G. and Budd S.L., 2000). La transferencia reductora de electrones a través de la CTE (complejos I-IV) proporciona la energía para conducir protones en contra de su gradiente de concentración a través de la MMI (fuera del citoplasma mitocondrial). Esto resulta en una acumulación neta de  $H^+$  fuera de la membrana, que luego fluyen hacia dentro de la mitocondria a través de la generación de ATP en el complejo V ( $F_1/F_0$  ATP-sintasa); este ATP es transportado dentro de la matriz en intercambio con ADP por el transportador ADP/ATP translocasa. Este proceso no sólo genera la energía necesaria para mantener el metabolismo celular a través de la producción de ATP, sino que modera el mantenimiento del propio metabolismo mitocondrial mediante procesos asociados al mismo gradiente protónico que generan la fosforilación. Bajo circunstancias normales, la acumulación de los protones puede ser disipada por la síntesis de ATP o a través de las proteínas de desacoplamiento (UCP), que pueden modular la pérdida de protones a través de la MMI, disminuyendo el potencial electroquímico y conduciendo a la disipación del calor (Argilés J.M. *et al.*, 2002). El desacoplamiento de la OXPHOS hace que los protones pasen libremente a través del CV y vayan directamente de vuelta a la matriz mitocondrial produciendo calor pero no ATP (Amacher D.E., 2005).

El colapso rápido del  $\Delta\psi_m$  ocurre con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, después de la exposición a los tóxicos mitocondriales o a condiciones que incrementan las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intramitocondrial, especialmente si van acompañados de factores adicionales como es el estrés oxidativo u otros (Lecoeur H. *et al.*, 2004). Además, la disipación del  $\Delta\psi_m$  asociada con la alteración de la integridad de la mitocondria, lleva a la permeabilización de la MME y a la translocación de proteínas proapoptóticas al citosol, conduciendo a la célula a la muerte por apoptosis (Novo E. and Parola M., 2008). La pérdida del  $\Delta\psi_m$  puede ser un evento temprano en algunos procesos de

apoptosis, o, dependiendo del modelo de apoptosis, también consecuencia de la vía de señalización de la apoptosis y no un evento temprano (Ly J.D. *et al.*, 2003).

## 6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

La mitocondria además de su función bioenergética, está implicada en otros muchos procesos de la fisiología celular. Estos orgánulos consumen >90% del O<sub>2</sub> celular y son la fuente endógena más importantes de la generación de ERO en la mayoría de las células eucarióticas, tanto en condiciones fisiológicas y patológicas, pero también son el blanco principal de las acciones nocivas de estas (Kang J. and Pervaiz S., 2012). Las ERO son moléculas pequeñas, de vida corta y altamente reactivas, formadas por la reducción de un electrón incompleto de O<sub>2</sub>; incluyen moléculas tales como el superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), el hidroxilo (OH•), radicales peroxilo (ROO•) y radical alcoxilo (RO•), y al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que según su composición química no es un radical (Halliwell B. and Cross C.E., 1994). Estos son generados por las células aerobias como subproductos de numerosas reacciones metabólicas y están presentes en diferentes compartimentos celulares y situaciones. Las fuentes celulares de ERO incluyen a la CTE mitocondrial, NADPH oxidasa, peroxisomas, CYP, la glucosa oxidasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, así como varios procesos de autooxidación no enzimáticos (Sauer H. *et al.*, 2001). Además, varios estímulos exógenos son capaces de inducir la generación de ERO, tales como la hiperoxia, el humo, la anoxia/reoxigenación, polvos minerales, toxinas y la radiación ionizante (Turrens J.F., 2003). Bajos a moderados niveles de ERO realizan un papel importante en distintas funciones fisiológicas, como expresión génica, la señalización celular, apoptosis, crecimiento celular, transporte de iones o defensa contra infecciones (Droge W., 2002), sin embargo, cantidades excesivas, pueden tener efectos deletéreos en muchas moléculas incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Lü J.M. *et al.*, 2010).

Las ERO mitocondriales se producen principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial, se estima que el 1 – 5% de los electrones que pasan por la cadena respiratoria pueden ser desviados para formar ERO (Novo E. and Parola M., 2008). La reducción incompleta del oxígeno durante la respiración genera O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, que se puede convertir en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el altamente

reactivo radical  $\text{OH}\cdot$ . Aunque una gran variedad de reacciones mitocondriales pueden producir  $\text{O}_2\cdot^-$ , los dos sitios principales para la producción de  $\text{O}_2\cdot^-$  son los complejos I y III de la cadena respiratoria (Kang J. and Pervaiz S., 2012) (Figura I.4.). Se cree que la fuente molecular de  $\text{O}_2\cdot^-$  en el Complejo III es el radical intermedio ubisemiquinona ( $\text{QH}\cdot$ ), formada durante el ciclo de Q en el sitio  $\text{Q}_0$  del Complejo III. En el caso del Complejo I, los mecanismos responsables no son claros y han sido sugeridos varios dominios como el sitio de la generación de ERO. Parece que el Complejo I y III en realidad generan dos suministros diferentes de  $\text{O}_2\cdot^-$ , con el Complejo I lanzándolo en la matriz, y el Complejo III lanzándolo en el espacio intermembrana (Jezek P. *et al.*, 2005). Sin embargo, se han descrito muchos estímulos que incrementan la producción de ERO en las mitocondrias, incluyendo la interrupción de la CTE, alteraciones en la concentración de  $\text{O}_2$  y en el  $\Delta\psi_m$ , un incremento en la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , la descompartimentación de  $\text{Ca}^{2+}$ , la falta de ADP, así como la presencia de algunas moléculas endógenas y exógenas como las citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$ ) y fármacos (rotenona, cianida, antimicina A, mixotiazol, etc.) (Cataldi A., 2010). Aun así, una serie de vías de señalización implicadas en la activación de la producción de ERO mitocondrial siguen siendo ampliamente desconocidas.

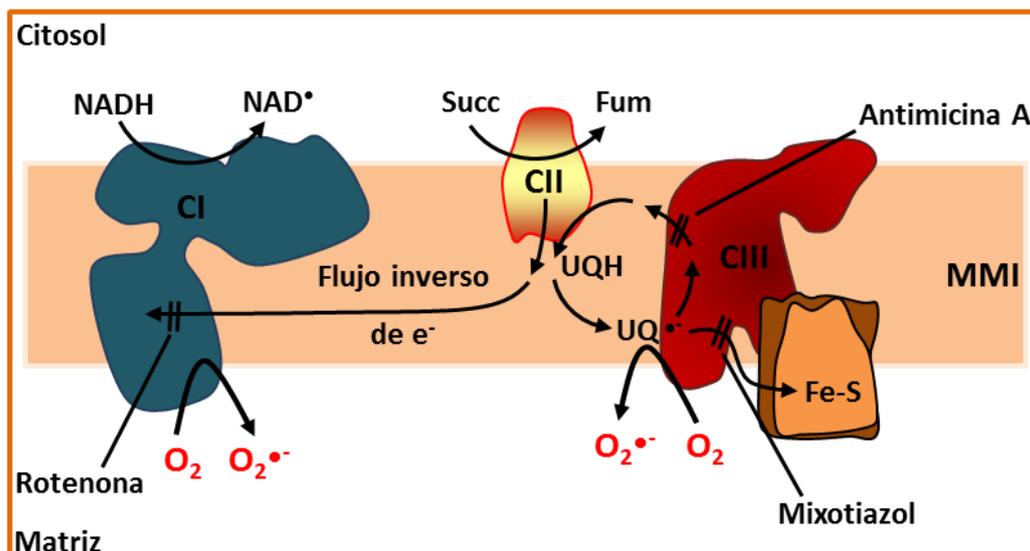


Figura I.4. Representación esquemática de parte de la CTE mitocondrial, mostrando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). El superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) es generado en los complejos I y III. (Succ: succinato; Fum: fumarato; UQ: ubiquinona;  $\text{UQ}\cdot^-$ : ubisemiquinona)(Modificado de Nohl H. *et al.*, 2005).

## 6.1. Detoxificación de especies reactivas de oxígeno

La detoxificación de ROS es uno de los pre-requisitos para todas las formas de vida aerobias, por lo tanto múltiples sistemas de defensa antioxidante han evolucionado. Un desequilibrio entre estos mecanismos de defensa y la generación de ERO llevo a un estado determinado estrés oxidativo (véase apartado 7. Estrés oxidativo). Los antioxidantes son moléculas que combaten al estrés oxidativo por la directa eliminación de las ERO, actúan previniendo la formación de ERO o reparando el daño celular o tisular causado por este estrés.

Las defensas antioxidantes de las células eucariotas engloban sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Las defensas antioxidantes no enzimáticas comprenden moléculas versátiles de bajo peso molecular como lo son las vitaminas (vitamina A, C y E), la coenzima Q, el citocromo *c*, el glutati6n (GSH), NADPH, la melatonina, el 6cido 6rico, los  $\alpha$ -keto 6cidos, la bilirrubina, los carotenoides, as6 como prote6nas de uni6n a metales (transferina, ferritina, etc.) (Birben E. *et al.*, 2012).

Las enzimas antioxidantes son principalmente: la super6xido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y los miembros del sistema tiol-reducci6n: glutati6n peroxidasas (Gpx) y peroxirredoxinas (Prx) (Birben E. *et al.*, 2012).

La SOD es una metaloprote6na que se encuentra de dos formas dentro de las c6lulas eucariotas: Cu/ZnSOD (SOD1) y la manganeso super6xido dismutasa (MnSOD, SOD2), mostrando curiosamente ninguna homolog6a de secuencia significativa. La SOD1 es una enzima homodimera compuesta de subunidades de peso molecular de 15,6 kDa, predominantemente localizada en las fracciones citos6licas, pero tambi6n es encontrada en peroxisomas, el n6cleo e incluso en el espacio intermembrana mitocondrial. La SOD2 es una enzima homotetram6rica cuyas subunidades tienen un peso molecular de 23 kDa, est6 localizada en la matriz mitocondrial y es codificada por un gen nuclear. Existe una relaci6n entre la actividad metab6lica y los niveles de MnSOD, ya que se ha observado que los tejidos con alta actividad metab6lica y su correspondiente aumento de la producci6n de ERO, como son el h6gado, el ri6n6n, coraz6n y el cerebro, poseen altos niveles de MnSOD (M6llsten A. *et al.*, 2007). A diferencia de SOD1, la SOD2 es fuertemente inducida por una amplia variedad

de factores como lo son la hiperoxia, la irradiación, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), lipopolisacáridos (LPS), interleucina-1 (IL-1) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

El  $O_2^{\bullet-}$  generado tiene una vida corta y en condiciones normales es dismutado rápidamente por la MnSOD para formar  $H_2O_2$  (Boveris A. and Cadenas E., 1975) (Figura I.5.). El  $H_2O_2$  es catalizado con metales de transición, generalmente hierro, dando como resultado la generación de  $OH^{\bullet}$ . Esta reacción (reacción de Fenton) se equilibra con las proteínas chaperonas de metal presentes en la matriz mitocondrial. El  $OH^{\bullet}$  también es producido cuando el  $H_2O_2$  reacciona con el  $O_2^{\bullet-}$  en una reacción que también genera una molécula de agua y de  $O_2$  molecular. A diferencia del  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ , el  $OH^{\bullet}$  tiene fuertes efectos citotóxicos. Tanto el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\bullet-}$  pueden entrar en el citosol y seguir participando en señalizaciones redox (Kirkinezos I.G. and Moraes C.T., 2001). El  $H_2O_2$  producido dentro de las mitocondrias es altamente difusible en contraste con el  $O_2^{\bullet-}$ , que no puede difundirse a través de las membranas, haciéndolo fácilmente compartimentado. Por lo tanto, el  $O_2^{\bullet-}$  mitocondrial generado se puede mantener separado del citosol hasta que un estímulo apropiado lo libere a través de los VDAC (Han D. *et al.*, 2003). Otra ruta para la liberación del  $O_2^{\bullet-}$  puede ser a través del poro de transición de permeabilidad (PTP), ya que a través de este poro puede estar intercambiándose entre la matriz mitocondrial y el citosol (Szewczyk A. and Wojtczak L. 2002).

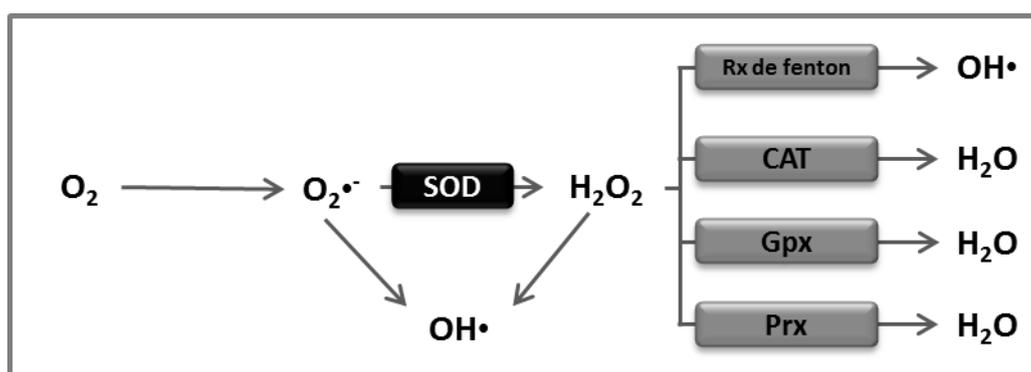


Figura I.5. Representación esquemática simplificada de los principales sistemas enzimáticos de detoxificación de ERO mitocondriales. (SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; Gpx: glutatión peroxidasa; Prx: peroxirredoxinas).

## 7. ESTRÉS OXIDATIVO

De acuerdo con la teoría de los radicales libres, el envejecimiento fisiológico podría ser visto como un proceso gradual inevitable al menos parcialmente, generado a través de la acumulación de ciertas lesiones oxidativas causadas por el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es equivalente a la pérdida de la homeostasis redox de la célula y se produce como resultado del desequilibrio entre los pro-oxidantes y antioxidantes. Son muchos los factores que participan en este proceso que conlleva al debilitamiento de la barrera antioxidante representada por enzimas y factores antioxidantes no enzimáticos, lo que permite la acumulación de compuestos citotóxicos, a través de un exceso de compuestos pro-oxidantes que consumen las reservas de antioxidantes del organismos. Las ERO alcanzan estados estables de energía mediante la vinculación de sus electrones individuales a través de reacciones de oxidación con moléculas dianas presentes en diversas estructuras celulares, tales como las membranas celulares y las membranas intracelulares, ADN, proteínas o hidratos de carbono, que se someten a alteraciones estructurales y funcionales importantes en este "ataque oxidativo", poniendo en peligro el funcionamiento general de la célula y su viabilidad (Padurariu M. *et al.*, 2013). Si las ERO no son neutralizadas y el estrés oxidativo persiste puede llegar a producir daño molecular de difícil recuperación, como peroxidación lipídica, proteínas mal plegadas o mutaciones del ADNmt y nuclear, culminando en muerte celular por apoptosis o necrosis (Galluzi L. *et al.*, 2012).

La mitocondria representa no solo una fuente de ERO sino también un blanco para su acción. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  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  $O_2^{\bullet-}$ , como son el ADNmt, los ácidos grasos insaturados, proteínas de la MMI y varios centros hierro-azufre.

### 7.1. El estrés oxidativo induce apoptosis

La apoptosis es la forma de muerte celular mejor caracterizada, ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo de homeostasis para

mantener la población de células en los tejidos (Elmore S., 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 C.J. and Hickson I.D., 2001). 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 más característico. Además, está asociada con el encogimiento de las células, así las células tienen un menor tamaño, el citoplasma se vuelve denso y los organelos quedan empaquetados en un espacio reducido (Duprez L. *et al.*, 2009). En la membrana plasmática se presenta una exposición en el exterior de moléculas de fosfatidilserinas (Zamzani N. *et al.*, 1996) formándose unas protuberancias que dan origen a los denominados “cuerpos apoptóticos”. Dos familias de proteínas están involucradas en la apoptosis: la familia Bcl-2, las cuales controlan la integridad de la mitocondria (Youle R.J. and Strasser A., 2008) y la familia de las cisteinil aspartato proteasas o caspasas, las cuales median la ejecución de la apoptosis (Fuentes-Prior P. and Salvesen G.S., 2004). Dependiendo del origen de la señal de muerte, la apoptosis se puede inducir por dos vías: la intrínseca (mitocondrial), que es activada por estímulos del interior de la célula y la extrínseca o de receptores de muerte, que responde principalmente a estímulos extracelulares (Russo A. *et al.*, 2006).

Hay pruebas suficientes de que las ERO y el estrés oxidativo están directamente involucrados en la apoptosis mitocondrial y que esto se produce a diferentes niveles (Le Bras M. *et al.*, 2005). Las ERO pueden desencadenar la apoptosis y participar activamente en la ejecución del programa de apoptosis (Circu M.L. and Aw T.Y., 2010). Muchos compuestos proapoptóticos, incluidos los aparentemente no-oxidantes como el cadmio, estaurosporina, ceramida, dexametasona o numerosos fármacos contra el cáncer, pueden desencadenar la señalización apoptótica intrínseca a través de la inducción de la producción de ERO. La generación de ERO proapoptóticas también se ha demostrado en respuesta a la retirada del factor de crecimiento, a la infección por el VIH, a la luz UV o irradiación  $\gamma$  y puede ocurrir incluso en condiciones casi anaeróbicas. Sin embargo, el aumento intracelular de las ERO, en particular, del  $O_2^{\bullet-}$ , se ha demostrado que inhibe la señalización de apoptosis en las células

tumorales, independientemente del interruptor (Le Bras M. *et al.*, 2005). La apoptosis mediada por ERO mitocondriales se le ha asignado especial importancia en varias patologías humanas. Por ejemplo, la apoptosis es un resultado del daño oxidativo resultante de la disfunción mitocondrial en las enfermedades mitocondriales, el hígado y las enfermedades cardiovasculares, y la neurodegeneración. La apoptosis mitocondrial inducida por las ERO es particularmente importante en el envejecimiento y en patologías específicas de envejecimiento, tales como la pérdida de audición relacionada con la edad (Someya S. and Prolla T.A., 2010). Además, la apoptosis mitocondrial mediada por las ERO ocurre en varias enfermedades de infección viral, por ejemplo la depleción de células T durante la infección del VIH. La trans-aldolasa, una enzima clave en la vía de las pentosas fosfato, regula el suministro de NADPH a las mitocondrias. Esta acción se considera un factor importante para los niveles de las ERO y se cree que juega un papel en la apoptosis inducida por el VIH en las células T (Banki K. *et al.*, 1998).

### **7.2. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en enfermedades humanas**

Las toxicidades mitocondriales son generalmente trastornos crónicos que se manifiestan en diferentes formas y de gravedad variable en función del número de mitocondrias dañadas dentro de las células afectadas. De esta forma, las células con un gran número de mitocondrias sólo manifiestan lesiones celulares importantes cuando un número significativo de las mitocondrias están disfuncionales, por lo que, la especificidad tisular es otro factor importante que influye en la toxicidad mitocondrial, ya que algunos tejidos muestran una mayor dependencia de la OXPHOS (Anderson P.L. *et al.*, 2006). El daño oxidativo produce disfunción mitocondrial, situación que conlleva a la muerte celular, contribuyendo así a diversas patologías que pueden ser congénitas y adquiridas (Figura I.6.), incluyendo la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, envejecimiento y trastornos neurodegenerativos (Murphy M.P., 2009; Wallace D.C. *et al.*, 2010). Otras patologías pueden resultar del estrés oxidativo inducido por la señalización de apoptosis producida por los aumentos de ERO y/o disminución de antioxidantes, perturbación de la homeostasis redox

intracelular, y modificaciones oxidativas irreversibles de los lípidos, proteínas o ADN (Pellegrini M. and Baldari C.T., 2009; Krawczyk M. *et al.*, 2010).

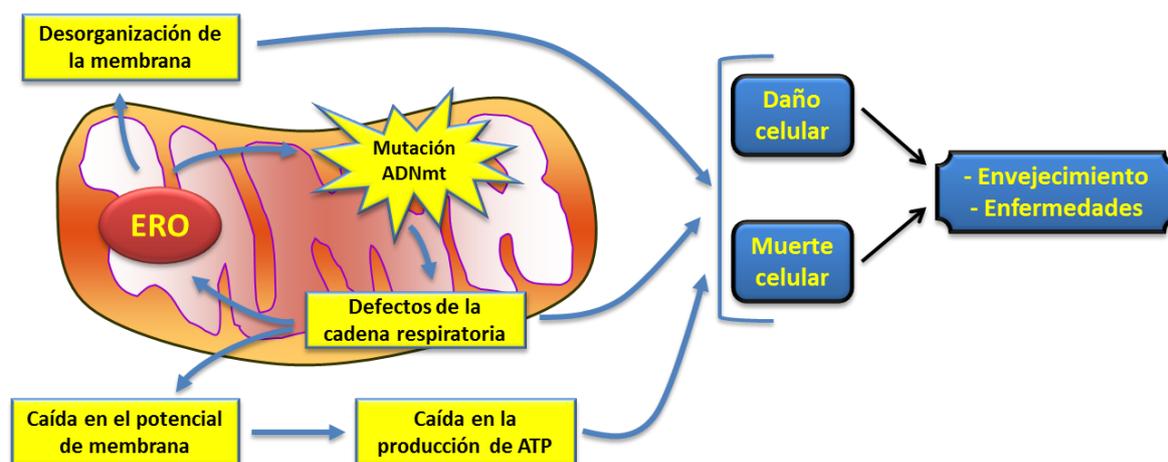


Figura I.6. Mecanismo de la disfunción mitocondrial; mutaciones en el ADNmt, defectos de la CTE y una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) están estrechamente relacionados. Los defectos de la cadena respiratoria generan ERO que puede producir mutaciones en el ADNmt y conducir a una caída en el potencial de membrana mitocondrial y producir alteraciones adicionales de la CTE. Esto puede resultar en caída de la producción de ATP y en consecuencia, provocar daño y muerte celular que se ve reflejado en enfermedades y en el envejecimiento.

### 7.3. Estrés oxidativo y su relación con los efectos neuropsiquiátricos

Muchos estudios sugieren un papel importante de las mitocondrias en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (de Moura M.B. *et al.*, 2010). A pesar de ser un grupo heterogéneo de trastornos, todos se caracterizan por una pérdida progresiva y selectiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las células neuronales (Mattson M.P., 2000). Los mecanismos implicados en la neurodegeneración son múltiples, y consistente evidencia muestra que la producción de ERO es un proceso importante por el cual las mitocondrias contribuyen a la neurodegeneración (Fernández-Checa J.C. *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos propuestos es la disfunción mitocondrial que mediante el aumento de ERO y/o disminución de la disponibilidad de ATP contribuye al daño de muchas

de las proteínas implicadas en formas genéticas y que tienen una función específica en enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer o la de Parkinson (Lin M.T. and Beal M.F., 2006). La aparición de estrés oxidativo durante la neurodegeneración también se ha confirmado por la detección de aductos de aldehído en cerebros de personas con estas enfermedades. Estos aductos son los productos finales de la peroxidación de lípidos que provocan disfunciones en proteínas y alteran las respuestas celulares. La tasa de oxidación y la formación de aductos de aldehído aunque generalmente baja, aumenta con el envejecimiento así como con la disminución de las defensas antioxidantes (Negre-Salvayre A. *et al.*, 2008). Es importante destacar que las ERO también desempeñan un papel fundamental en la patofisiología de varios trastornos neuropsiquiátricos tales como esquizofrenia o el trastorno bipolar. Respecto a esto, algunos estudios han informado de alteraciones en las enzimas antioxidantes y aumento en los productos de la peroxidación lipídica en pacientes con este último trastorno (Steckert A.V. *et al.*, 2010).

#### **7.4. El estrés oxidativo y los eventos adversos asociados con la terapia antirretroviral**

Muchas complicaciones relacionadas con la TARGA se cree que son atribuibles a efectos tóxicos en la mitocondria (Petit F. *et al.*, 2005) y diversas investigaciones han sugerido una participación del estrés oxidativo en algunos de estos eventos adversos (Chandra S. *et al.*, 2009; Vassimon H.S. *et al.*, 2010). Cada familia de fármacos antirretrovirales ejerce diferentes efectos secundarios. Por otra parte, la mayoría de estudios apuntan a algunas alteraciones específicas del compuesto que no están relacionados con el grupo farmacológico (por ejemplo, los eventos adversos del SNC se han descrito con frecuencia en los pacientes sometidos a una terapia a base de EFV, pero no en los que recibieron otro ITINAN) (Manfredi R. *et al.*, 2004). Esta variabilidad, junto con el hecho de que los fármacos antirretrovirales se administran en combinación y que las toxicidades mitocondriales inducidas por fármacos son específicas de cada tejido, ha complicado la evaluación del perfil de toxicidad mitocondrial específica de cada uno de los compuestos.

En un estudio clínico realizado en pacientes infectados con el VIH en comparación con personas no infectadas, se observaron mayores niveles de estrés oxidativo en pacientes infectados (tratados como no tratados) con respecto a los sujetos no infectados. Dentro del grupo de pacientes infectados, los pacientes bajo tratamiento con TARGA mostraban niveles aún más altos de estrés oxidativo que los no tratados (Mandas A. *et al.*, 2009). En diversos estudios *in vitro*, se ha descrito la implicación de los fármacos antirretrovirales en el aumento del estrés oxidativo. Ha sido descrito que los análogos de timidina AZT y d4T producen cambios mitocondriales y estrés oxidativo en fibroblastos y células adiposas (Caron M. *et al.*, 2008). Al IP saquinavir, se le han atribuido efectos toxicológicos en células endoteliales humanas, como el aumento de la muerte celular por apoptosis a través de la producción de ERO (Baliga R.S. *et al.*, 2004). En otro estudio, la línea celular de adipocitos 3T3-L1 mostró que la inducción de estrés oxidativo mediada por nelfinavir juega un papel importante en la resistencia a la insulina de los adipocitos (Ben-Romano R. *et al.*, 2006). Los ITINAN también han sido asociados con el estrés oxidativo. El tratamiento con EFV en células humanas endoteliales de la arteria coronaria (HCAEC) (Jamaluddin MdS. *et al.*, 2010) y de células hepáticas humanas (Blas-García A. *et al.*, 2010) condujo a un aumento del estrés oxidativo.

### **7.5. El VIH induce estrés oxidativo**

Hay muchos factores que acompañan a los pacientes con VIH que pueden empeorar el daño oxidativo mediado por los antirretrovirales. Se ha demostrado que el propio VIH altera el equilibrio redox en diferentes tejidos y, además, algunos estudios han informado que su glicoproteína de la envoltura (gp120) y la proteína transreguladora (Tat) inducen estrés oxidativo en las células endoteliales del cerebro, lo que conduce a una interrupción de la BHE, cuya función esencial es preservar el cerebro de sustancias tóxicas presentes en la sangre y que es probable que participe en la demencia asociada al VIH (Banerjee A. *et al.*, 2010). De esta manera, los individuos infectados por el VIH están continuamente expuestos a estrés oxidativo crónico, siendo esto de mucha relevancia ya que el estrés oxidativo parece jugar un papel importante en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas y también en la demencia por VIH (Blas-García A. *et al.*, 2011b). Lípidos y proteínas oxidadas,

formadas por la oxidación mediada por ERO, se han detectado en el cerebro y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con demencia por VIH. Estos pacientes también presentan una acumulación de sustancias tóxicas como el 4-hidroxi-nonal (posee 3 grupos altamente reactivos) en el LCR que son capaces de producir la disfunción mitocondrial en las neuronas (Turchan J. *et al.*, 2003). Además, un estudio transversal demostró que la presencia de estrés oxidativo en pacientes con VIH se asoció con la terapia antirretroviral, y en particular con el uso de EFV (Hulgan T. *et al.*, 2003).

### 8. BIOENERGETICA CELULAR

Todas las células necesitan una fuente de energía para mantener la homeostasis. El mantenimiento celular implica procesos consumidores de energía no-espontáneos, como la generación de gradientes de concentración, la dinámica del citoesqueleto, la reparación del ADN, la transcripción basal y la traducción, la rotación de las proteínas, y el tráfico de vesículas. Las leyes de la termodinámica exigen un flujo continuo de energía para equilibrar estos requisitos entálpicos (positivos) y entrópicos (negativos) de mantenimiento de la célula, y por lo tanto las células deben extraer la energía libre de nutrientes o de la luz del sol (Lunt S.Y. and Vander Heiden M.G., 2011).

Una fuente importante de energía celular es la glucosa, que ocupa una posición central en el metabolismo de los organismos vivos. Es relativamente rica en energía potencial, y por lo tanto un buen combustible; la oxidación completa de la glucosa en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el agua procede un cambio de energía libre estándar de 2,840 kJ/mol. Mediante el almacenamiento de glucosa en polímeros de alto peso molecular tal como el almidón o el glucógeno, una célula puede almacenar grandes cantidades de unidades de hexosa mientras se mantiene una osmolaridad citosólica relativamente baja. Cuando aumenta la demanda energética, la glucosa puede ser liberada de estos polímeros de almacenamiento intracelulares y se utiliza para producir ATP ya sea aeróbicamente o anaeróbicamente (Nelson D.L. and Cox M.M., 2004). Además, la glucosa es no sólo un excelente combustible, sino que también es un precursor notablemente versátil, capaz de suministrar una enorme variedad de intermediarios metabólicos para las reacciones biosintéticas.

### 8.1. Metabolismo de la glucosa en el cerebro

La glucosa es el único sustrato transportado por la sangre utilizada por el cerebro, que puede soportar sus demandas metabólicas. La capacidad de la glucosa para mantener el metabolismo energético cerebral es debida, en parte, a la combinación de una concentración relativamente alta de glucosa en el plasma, regulada hormonalmente y por la presencia de potentes transportadores de glucosa, que llevan la glucosa a través de la BHE y a las membranas de las células cerebrales. Puesto que las reservas de glucógeno son muy limitadas en el cerebro, un suministro permanente de la glucosa a través de la corriente sanguínea es necesario para mantener la función cerebral (Clarke D.D. and Sokoloff L., 1999). En condiciones normales, la captación de glucosa por las células cerebrales individuales se produce a través del GLUT1 (transportador facilitador de glucosa independiente de la energía), localizada en la membrana plasmática de los astrocitos (Maher F. *et al.*, 1994). En contraste con los astrocitos que se cree que expresan sólo GLUT1, las neuronas expresan tanto GLUT1 y, más potentemente, GLUT3 (Hara M. *et al.*, 1989; Maher F., 1995). Sin embargo, se ha sugerido que la expresión de GLUT1 en neuronas cultivadas se debe a una adaptación a las condiciones de cultivo (Maher F. *et al.*, 1996). Por otro lado, GLUT3 se ha descrito que posee mayor afinidad (menor  $K_M$ ) que GLUT1 (Bell G.I. *et al.*, 1993; Maher F. *et al.*, 1994).

Las neuronas y astrocitos, los principales dos tipos de células del cerebro, son en gran parte responsables de un consumo masivo de  $O_2$  y glucosa; de hecho, el cerebro representa aproximadamente solo el 2% del peso corporal total, sin embargo, representa más del 20% del consumo total de ambos sustratos. En condiciones de reposo, la liberación aproximada del 85% de la glucosa por los astrocitos se consume como lactato (Bolaños J.P. *et al.*, 1994). Tras la estimulación neuronal, la captación de glucosa y la producción de lactato (Pellerin L. and Magistretti P.J., 1994; Loaiza A. *et al.*, 2003; Porrás O.H. *et al.* 2008) se incrementan en los astrocitos vecinos. Las neuronas, por el contrario, contribuyen mínimamente al consumo de glucosa por el cerebro (Kasischke K.A., *et al.* 2004; Herrero-Mendez A. *et al.*, 2009). Por lo tanto, a pesar de su localización compartida, neuronas y astrocitos muestran una diferente preferencia para la utilización de la glucosa.

La glucólisis es una vía central casi universal del catabolismo de la glucosa, la vía con el mayor flujo de carbono en la mayoría de las células. El desglose glucolítico de la glucosa es la única fuente de energía metabólica en algunos tejidos de mamíferos y tipos celulares (eritrocitos, médula renal, cerebro y espermatozoides) (Nelson D.L. and Cox M.M., 2004).

En la glucólisis, una molécula de glucosa se metaboliza en dos moléculas de piruvato, un proceso que es independiente de la disponibilidad de  $O_2$ . El destino metabólico del piruvato depende del tejido y de las condiciones ambientales. En condiciones de normoxia, el piruvato se convierte en acetil-coenzima A en las mitocondrias, donde se oxida completamente a  $CO_2$  a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), un proceso que conserva la energía de reducción-oxidación (redox) como dinucleótido de nicotinamida y adenina [ $NADH(H^+)$ ]. La CTE mitocondrial transfiere los electrones de  $NADH(H^+)$  al  $O_2$  en un proceso en que acopla la oxidación del  $NADH(H^+)$  para la formación de un gradiente electroquímico de protones a través de la MMI, que la  $F_0F_1$ -ATPasa utiliza para fosforilar ADP, formando de manera eficiente ATP. Bajo condiciones de hipoxia o anoxia, o cuando se altera el flujo de electrones en la CTE mitocondrial, la tasa de glucólisis aumenta, de modo que el piruvato, que no se metaboliza adicionalmente en la mitocondria, se convierte en lactato a expensas de la oxidación de  $NADH(H^+)$ . Aunque este proceso es bioenergéticamente ineficiente, puede ocurrir a una velocidad suficiente para satisfacer las necesidades de energía de la célula, a expensas de un mayor consumo de glucosa (Bolaños J.P. *et al.*, 2009).

La glucosa puede, además, ser metabolizada por la vía pentosa fosfato (PPP); por cada seis moléculas de glucosa que entran en la PPP, una molécula equivalente de glucosa se libera en forma de  $CO_2$ . En esta vía, la glucosa-6-fosfato se descarboxila para formar ribosa-5-fosfato en una serie de reacciones que conservan su energía redox en la forma de  $NADPH(H^+)$ . Aunque ésta no es considerada como una ruta metabólica bioenergética, es la fuente citosólica más importante de  $NADPH(H^+)$ , un cofactor para muchas reacciones reductoras, más en particular las que participan en la biosíntesis de ácidos grasos y la regeneración de glutatión reducido. Las rutas del metabolismo de la glucosa son descritas en la Figura I.7.

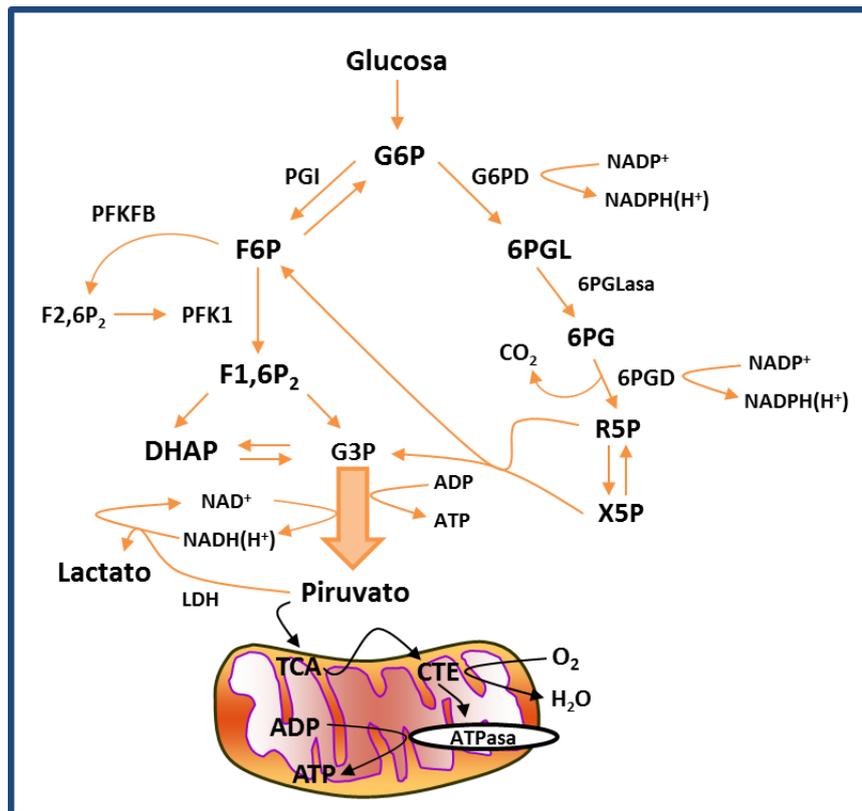


Figura 1.7. Vías del metabolismo de la glucosa. Enzimas: G6PD, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato; HK, hexoquinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PFKFB, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa; PFK1, 6-fosfofructo-1-quinasa; 6PGD, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 6PGLasa, 6-fosfogluconolactonasa; PGI, fosfoglucosa isomerasa. Metabolitos: DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F1,6P<sub>2</sub>, fructosa-1,6-bisfosfato; F2,6P<sub>2</sub>, fructosa-2,6-bisfosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; 6PGL, 6-fosfogluconolactona; R5P, ribulosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato (Bolaños J.P. *et al.*, 2009).

## 8.2. La glucólisis en las células nerviosas

Se ha demostrado que los astrocitos están protegidos de la inhibición mitocondrial por la rápida regulación de la glucólisis. Las neuronas por otra parte, carecen de este mecanismo de defensa y por lo tanto son más vulnerables, sugiriendo que esta diferencia puede ser la base de la diferente susceptibilidad de los dos tipos de células a los estímulos perjudiciales (Almeida A. *et al.*, 2001). Una respuesta diferencial en las neuronas y los astrocitos no es exclusiva de la inhibición de la respiración mitocondrial (Pauwels P.J. *et al.* 1985; Bolaños J.P.

*et al.* 1995), ya que también ocurre después de la activación de receptores de glutamato neuronales, un evento que desencadena una rápida disminución de ATP (Almeida A. and Bolaños J.P., 2001) sin un concomitante aumento de la tasa glucolítica o la captación de glucosa (Pauwels P.J. *et al.* 1985; Porras O.H. *et al.* 2004).

Estudios en esta respuesta diferencial condujeron a la observación de que, después de la inhibición de la respiración, resultando en una crisis bioenergética, los astrocitos presentan un rápido aumento en la fosforilación de la enzima AMPK coincidiendo con la acumulación de fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P<sub>2</sub>), y a su vez, activando a la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), un regulador maestro de la glucólisis. Se encontró que la tasa de actividad de esta enzima en condiciones basales en los astrocitos es el doble que de las neuronas, además, la concentración de la F2,6P<sub>2</sub>, el potente activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1), la principal enzima reguladora de la glucólisis también fue significativamente mayor en los astrocitos que en neuronas y, después de la inhibición de la respiración, la concentración aumentó aún más en los astrocitos, pero no cambió en neuronas. Esta respuesta diferencial podría ser atribuida a la ausencia casi total en las neuronas de PFKFB, la enzima responsable de la generación de F2,6P<sub>2</sub>. En ambas neuronas y astrocitos, la más abundante de las isoformas de PFKFB, es la isoforma 3 (PFKFB3) cuya actividad se dedica casi exclusivamente a la generación de F2,6P<sub>2</sub> (Almeida, A. *et al.*, 2004). La PFKFB3 está destinada a la degradación proteosomal seguida de la ubiquitilación por el complejo promotor de la anafase (APC/C-CDH1), una ubiquitin ligasa E3 mejor conocida por su papel en la regulación de la mitosis y la meiosis (Pesin J.A. and Orr-Weaver T.L., 2008), aunque también ha sido implicada en la regulación del crecimiento axonal, la plasticidad sináptica y supervivencia de las neuronas post-mitóticas (Almeida A. *et al.*, 2005; Stegmüller J. and Bonni A., 2005), cuya actividad es baja en los astrocitos. Por el contrario, la actividad del APC/C-CDH1 es alta en neuronas, y por lo tanto PFKFB3 es continuamente degradada (Figura I.8.). Esto se traduce en una baja tasa glucolítica en las neuronas, y la desviación de G6P a través de la PPP, que es capaz de generar antioxidantes y promover la supervivencia (Almeida A. *et al.* 2005; Stegmüller J. and Bonni A., 2005). A partir de estudios en otros tejidos, es bien conocido que, tras el gasto de ATP durante la hipoxia vascular o el ejercicio,

hay un aumento en la concentración de la AMPK (Lage R. *et al.* 2008; Fisslthaler B. and Fleming I., 2009). Estos trabajos indican que el mecanismo de señalización que acopla la demanda energética a la rápida regulación de la glucólisis en astrocitos implica la activación de la PFKFB mediada por la AMPK. También se ha relacionado a la vía AMPK-PFKFB en astrocitos tras la crisis bioenergética promovida por la captación de glutamato (Pellerin L. and Magistretti P.J. 1994; Ronnett G.V. *et al.* 2009). Las neuronas, que a diferencia de los astrocitos no activan la glucólisis durante el estrés bioenergético, también expresan la AMPK (Culmsee C. *et al.*, 2001).

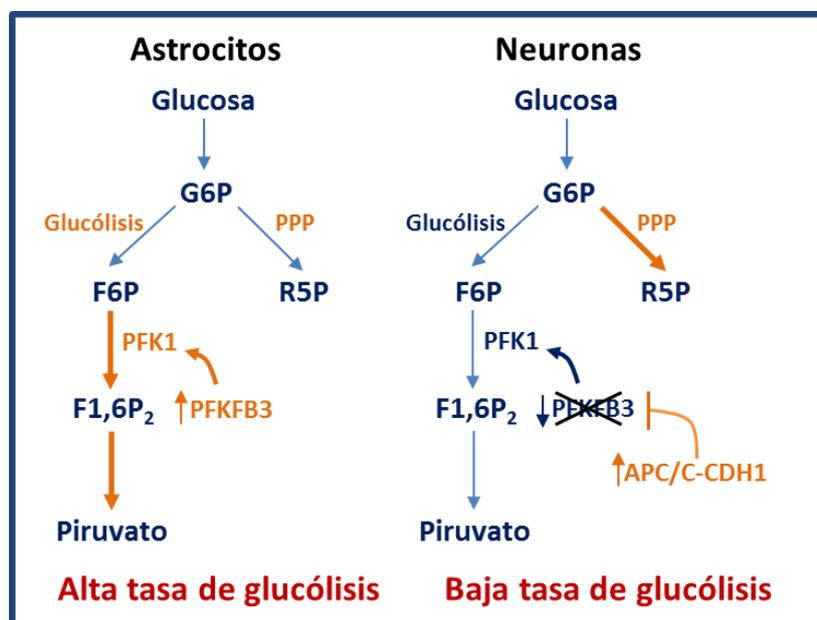


Figura I.8. La utilización diferencial de la glucosa en astrocitos y neuronas. Los astrocitos expresan la enzima promotora de la glucólisis PFKFB3, que activa la enzima limitante de la velocidad de la glucólisis, PFK1. La actividad de APC/C-CDH1 es alta en las neuronas, por lo tanto PFKFB3 es continuamente degradada, lo que se traduce en una tasa glucolítica baja en las neuronas (modificada de Bolaños J.P. *et al.*, 2009).

Otra vía que contribuye al aumento de la utilización de la glucosa sin consumo de O<sub>2</sub> es la PPP, que consiste en la descarboxilación oxidativa del carbono uno de la glucosa para generar NADPH y gestionar al estrés oxidativo. La PPP es considerada generalmente una vía menor del metabolismo de la glucosa en el cerebro en reposo, pero puede ser notablemente

regulada al alza en diversas condiciones para generar NADPH, que a su vez aumenta el GSH para detoxificar a las ERO en acuerdo con la glutatión peroxidasa (Dringen *et al.*, 2007). Tal mecanismo de protección también puede actuar en los astrocitos (Ben-Yoseph O. *et al.*, 1996; Rahman B. *et al.*, 2000; Garcia-Nogales P. *et al.* 2003; Takahashi S. *et al.*, 2012).

Es bien sabido que la tasa de glucólisis en las neuronas corticales es muy baja, pero la razón de esto es desconocida. La tasa de  $^{14}\text{CO}_2$  liberado de la  $[6\text{-}^{14}\text{C}]$  glucosa, es un reflejo de la glucosa oxidada en el TCA, y esta es insignificante en las neuronas corticales (Garcia-Nogales P. *et al.*, 2003). La tasa de glucólisis también ha sido evaluada mediante la utilización de otros métodos (Delgado-Esteban, M. *et al.*, 2000; Herrero-Mendez A. *et al.*, 2009), resultando también insignificante, tanto en condiciones normales (en reposo) o condiciones de estrés bioenergético. Cabe mencionar que en otras preparaciones y regiones del cerebro, tales como, neuronas del cerebelo, los sinaptosomas o neuronas de la retina, o incluso bajo situaciones *in vivo*, un mecanismo regulador diferente podría operar. Se ha descrito que bajo un estrés bioenergético con un declive en el ATP, las neuronas corticales no presentan una activación concomitante de la tasa glucolítica o la captación de glucosa (Kasischke K.A. *et al.*, 2004; Porras O.H. *et al.*, 2004). Por lo tanto, las neuronas expresan naturalmente baja tasa glucolítica y una incapacidad para estimular la glucólisis durante una crisis bioenergética.

### 9. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico, un gas en condiciones normales de temperatura y presión, ha surgido como un mediador intra- e intercelular implicado en la transmisión de señales fisiológicas y fisiopatológicas. Desempeña funciones esenciales en la modulación del tono vascular (Ignarro L. J. *et al.*, 1987), en la neurotransmisión (Garthwaite J. *et al.*, 1988) y en el sistema inmune (Hibbs J.B. *et al.*, 1988), y está involucrado en la génesis de enfermedades como el shock séptico, inflamación y demencia (Vallance P. and Collier J., 1994; Court O. *et al.*, 2002).

La síntesis de NO se realiza por acción de una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS), que a partir del aminoácido L-arginina (L-Arg) produce NO y L-citrulina, requiriendo la presencia de un cofactor (específicamente, una coenzima) la NADH o la NAD fosfato reducido (NADPH) en presencia de  $\text{O}_2$  (Figura I.9.). El NO es producido por una amplia variedad de tipos celulares

que incluyen células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias. Existen tres isoformas de la NOS, 2 constitutivas y dependientes del calcio (NOSc), que son la endotelial (NOSe), también conocida como tipo III (NOS3) y la neuronal (NOSn), o tipo I (NOS1), las cuales sintetizan NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular, y una inducible e independiente del calcio (NOSi), también denominada de tipo II (NOS2), que no se expresa o lo hace muy débilmente en condiciones fisiológicas, pero que en algunas condiciones puede ser inducida produciendo gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares (Moncada S., 1997).

Varios efectos fisiológicos del NO están mediados a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble, asimismo, el NO puede utilizar otras vías de señalización, tales como la inhibición de la CcO mitocondrial en la CTE, la modificación covalente de proteínas, o las reacciones de oxidación que requieren unión del grupo NO•, y sus interacciones con estos objetivos sugieren que desempeña un papel fisiopatológico crítico en las células.

En el cerebro, el NO es un mensajero fisiológico de corta duración que participa en diversas funciones biológicamente relevantes (Moncada S. *et al.*, 1991; Esplugues J.V., 2002). El NO ha sido implicado en la muerte neuronal, como por ejemplo: en la isquemia cerebral (derrame cerebral), traumatismo cerebral (golpe en la cabeza), infecciones del cerebro (la meningitis y la demencia asociada al SIDA), envejecimiento del cerebro y las enfermedades neurodegenerativas, como la de Alzheimer, la de Parkinson, la esclerosis múltiple y en enfermedades de las neuronas motoras (Brown G.C., 2010). Aunque también se ha descrito que puede inhibir la muerte celular o no tener acciones relacionadas con la supervivencia neuronal en algunos modelos (Thomas D.D. *et al.*, 2008).

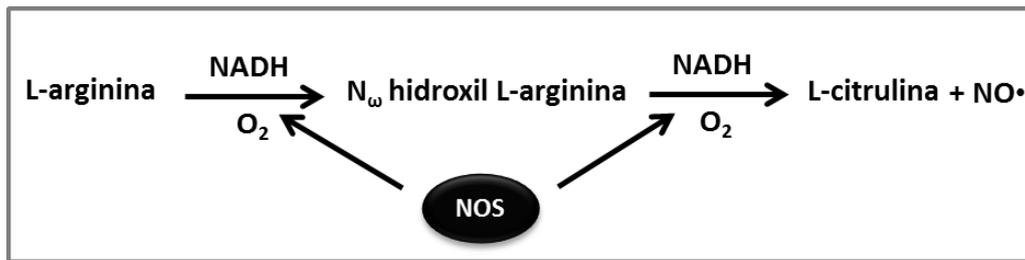


Figura I.9. Síntesis de óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS).

### 9.1. Generación de óxido nítrico en las células nerviosas

Todas las células del cerebro son capaces de sintetizar NO (Murphy S. *et al.*, 1993; Wolf G., 1997). En las neuronas postsinápticas, el NO se forma después de la activación mediada por sus receptores de glutamato, principalmente el subtipo *N*-metil-D-aspartato (rNMDA). Después de la activación, incrementa transitoriamente el nivel de  $\text{Ca}^{+2}$  en el citosol formando un complejo con la calmodulina que se une y activa a la NOSn (Knowles R.G. and Moncada S., 1994), la cual forma NO y citrulina (Figura I.10.). Las células gliales (astrocitos, microglia y oligodendrocitos) sintetizan NO después de la expresión transcripcional de la NOSi (Figura I.10.), cuya inducción está promovida por ciertos estímulos pro-inflamatorios, patógenos o hipoxia, los cuales generan niveles moderados o altos de NO crónicamente (Merrill J.E. *et al.*, 1990; Nomura Y. and Kitamura Y., 1993; Saha R.N. and Pahan K., 2006). Experimentalmente, la inducción de la NOSi en las células gliales puede ser promovida por la incubación con LPS o con ciertas citoquinas, tales como el interferón- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o la interleucina-1 $\beta$ , que actúan a través de sus receptores específicos de la membrana plasmática (Murphy S. *et al.*, 1993; Merrill J.E. *et al.*, 1997). Además, las neuronas pueden responder a estímulos pro-inflamatorios y participar en la inflamación del cerebro. Por lo tanto, la neuronal expresión de la NOSi se ha descrito en diferentes modelos experimentales, incluyendo la estimulación de citoquinas de líneas de células neuronales y neuronas primarias *in vitro*, así como en modelos animales de accidente cerebrovascular y la neurodegeneración, destacando el impacto sobre la neurodegeneración (Hausladen A. and Fridovich I., 1994; Small C.I. *et al.*, 2004). Las células endoteliales de los microvasos cerebrales liberan NO después de la interacción de un agonista (por ejemplo, acetilcolina) con el receptor de la membrana plasmática, que promueve la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y la activación

de la NOSe (Knowles R.G. and Moncada S., 1994) (Figura I.10.). El NO formado por la activación de la NOSe difunde a las células del músculo liso vecinas y activa a la guanilato ciclasa soluble, iniciando así la relajación del músculo dependiente del guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y que conduce a la vasodilatación (Rees D.D. *et al.*, 1989) (Figura I.10.).

Algunos investigadores se refieren a la NOS mitocondrial (NOSmt), como una actividad de la NOS que se encuentra en las mitocondrias, pero esto sigue siendo controvertido, y puede ser la NOSn unida a/dentro de la mitocondria (Bustamante J. *et al.*, 2007).

La NOSn que predominantemente se encuentra en las neuronas, y que también está presente en algunos vasos cerebrales y células gliales (Bredt D.S. *et al.*, 1990; Salter M. *et al.*, 1991); puede ser ubicada ya sea pre- o post-sinápticamente y está particularmente implicada en la señalización neuronal, la neurotoxicidad, la plasticidad sináptica y la modulación de las vías del comportamiento tales como el aprendizaje o la expresión de dolor (Esplugues J.V., 2002). La inducción de la NOSi en las células gliales está implicada en la respuesta inmune no específica del cerebro y por lo general se asocia con condiciones patológicas (Murphy S., 2000).

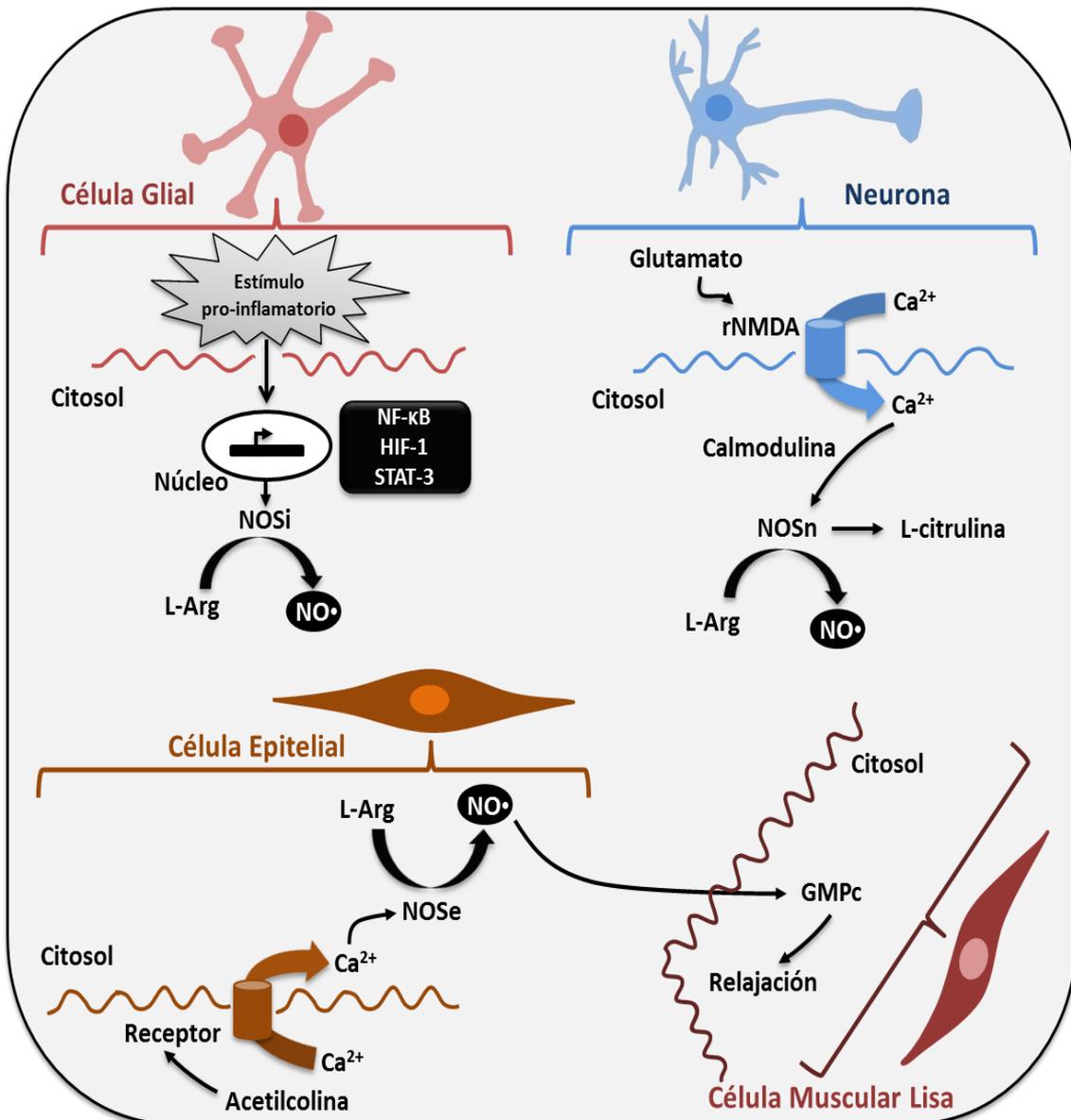


Figura I.10. Síntesis de óxido nítrico (NO) en las células cerebrales. En las células gliales, ciertos estímulos pro-inflamatorios promueven la inducción transcripcional de la NOSi (isoforma inducible), que forma grandes cantidades de NO de una manera independiente del  $Ca^{2+}$ . En las neuronas, la estimulación del receptor *N*-metil-D-aspartato (rNMDA) mediada por el glutamato provoca la acumulación de  $Ca^{2+}$  intracelular. El  $Ca^{2+}$  se une a la calmodulina y activa a la isoforma neuronal de la NOS (NOSn), que forma NO y citrulina a partir de la L-arginina (L-Arg). En los vasos sanguíneos, la acetilcolina estimula a su receptor colocado en la membrana de las células endoteliales, promoviendo la acumulación de  $Ca^{2+}$  intracelular y la activación de la isoforma endotelial de la NOS (NOSe). El NO formado por la NOSe es liberado a las células del músculo liso vecinas, donde induce la relajación mediada por el guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

## 9.2. Metabolismo de óxido nítrico y oxígeno

El NO inhibe la respiración mitocondrial por diferentes medios: (A) causa una inhibición rápida, selectiva y potente, pero reversible de la CcO (Cooper C.E. and Giulivi C., 2007) y (B) las especies reactivas de nitrógeno (ERN) causan inhibición de muchos componentes mitocondriales, incluyendo el complejo I y esta ocurre de forma más lenta, no selectiva, pero irreversible (Brown G.C. and Borutaite V., 2004).

Las ERN son una familia de moléculas derivadas del NO, que actúan en conjunto con las ERO en el daño celular. El radical de NO ( $\text{NO}\bullet$ ) se produce en los organismos superiores por la oxidación de uno de los átomos terminales del grupo guanido-nitrógeno de la L-Arg. Este proceso es catalizado por la enzima NOS y dependiendo del microambiente, el NO puede ser convertido a varias otras ERN tal como el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\bullet$ ), el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), el tetróxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) o el peroxinitrito ( $\text{ONOO}\bullet^-$ ). Las ERN son capaces de realizar diversas reacciones, tales como nitrosilación, oxidación, hidroxilación y nitración de diversas biomoléculas.

Estas modificaciones se realizan durante el metabolismo normal de las células y forman parte de diversos procesos fisiológicos. Algunos de los cuales pueden ser mediados a través de la formación intermedia de S-nitroso-cisteína o S-nitroso-glutatión. Sin embargo, en ciertas condiciones, la formación de las ERN y/o de ERO puede estar exacerbada, superando a los mecanismos de protección del organismo contra ellas, provocando condiciones patológicas conocidas como estrés que puede ser de tipo oxidativo o nitrosativo, dependiendo de las reacciones que predominen (Dröge W., 2002). Además, altos niveles de NO pueden, en presencia de  $\text{O}_2$ , dar lugar a una mezcla potente de ERO y ERN, a veces conocido colectivamente como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON). Estas especies, en casos particulares pueden participar en procesos como la oxidación de residuos de cisteína en las proteínas, nitración y nitrosación de proteínas y la oxidación de lípidos, resultando en la generación de mecanismos genotóxicos (compuestos con potencial carcinogénico y mutagénico), que pueden llegar a provocar lesiones en la secuencia primaria

del ADN y otras biomoléculas, y de esta forma mediar el surgimiento y desarrollo tumoral (Brown G.C., 2010).

La inhibición del consumo de  $O_2$  mitocondrial por NO, junto con la vasodilatación inducida por el mismo, puede aumentar los niveles de  $O_2$  del tejido. Es de destacar que el  $O_2$  es un sustrato limitante para la producción de NO (para NOSn e NOSi), de ERO (por la cadena respiratoria mitocondrial y NADPH oxidasa) y de ERN por reacción de NO y  $O_2$ . Inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial por NO o ERN estimulan la fuga de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  producidos desde las mitocondrias (Borutaite V. and Brown G.C., 2006). El  $O_2^{\bullet-}$  puede reaccionar con el NO para producir  $ONOO^{\bullet-}$ , que inhibe aún más la cadena respiratoria pudiendo causar un círculo vicioso (Ferrer-Sueta G. and Radi R., 2009). Aunque el  $ONOO^{\bullet-}$  sólo es estable en soluciones alcalinas, se protona rápidamente a valores de pH fisiológicos para formar ácido peroxinitroso (ONOOH). El ONOOH da lugar a especies químicas con radicales  $HO^{\bullet}$  con parecida reactividad y al  $NO_2^{\bullet}$ . La aparición de tales reacciones de radicales confiere propiedades prooxidantes al  $ONOO^{\bullet-}$  que se cree que son responsables para la ejecución de la respuestas neurotóxicas mediadas por NO (Bolaños J.P. *et al.*, 1995; Bonfoco E. *et al.*, 1995). Además, se ha descrito la capacidad del  $ONOO^{\bullet-}$  de oxidar el GSH e inactivar a la glutatión reductasa (Savvides S.N. *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que tanto *in vivo* como *in vitro* que, en concentraciones bajas, micromolares-nanomolares, el  $ONOO^{\bullet-}$  está activamente involucrado en el desencadenamiento de las señales de supervivencia celular (Bolaños JP. *et al.*, 2004).

### **9.3. Efecto del óxido nítrico y de las especies reactivas de nitrógeno sobre la viabilidad celular**

Es conocido que altos niveles de NO inducen muerte celular por dos mecanismos diferentes en células neuronales: (i) necrosis mediada por el agotamiento de la energía (ii) apoptosis mediada por estrés oxidativo/nitrosativo (Brown G.C. and Borutaite V., 2002). La necrosis implica la ruptura de la membrana plasmática, debido a la hinchazón celular, fosfolipasas o proteasas, a menudo como consecuencia del agotamiento de la energía y/o la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ . La apoptosis produce la condensación y fragmentación de la cromatina, exposición de

fosfatidilserina, y un desmontaje y fragmentación celular sin ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis resulta generalmente de la activación de caspasas, ya sea inducida por la activación del receptor de muerte o la liberación del citocromo *c* de la mitocondria tras la permeabilización de la membrana mitocondrial por proteínas homólogas de Bcl-2.

### **9.3.1. Inducción de necrosis**

El NO puede inducir agotamiento de la energía celular por múltiples mecanismos: (i) inhibir la CcO mitocondrial y por lo tanto la producción de ATP, (ii) NO, S-nitrosotioles y ONOO<sup>•-</sup> inhiben otros múltiples componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, (iii) ONOO<sup>•-</sup> y S-nitrosotioles activan la transición de la permeabilidad mitocondrial, lo que resulta en la hidrólisis de todo el ATP celular (Borutaite V. *et al.*, 2000), (iv) ONOO<sup>•-</sup> y los S-nitrosotioles inhiben la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), por lo tanto la producción de ATP glucolítico (Hara M.R. *et al.*, 2006; Sen N. *et al.*, 2008), y (v) ERON causan roturas de hebras del ADN que activan la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), que consume el NAD<sup>+</sup> citosólico (Zhang J. *et al.*, 1994; Jagtap P. and Szabó C., 2005). Todos estos procesos agotan el ATP de la célula, que en general provoca la necrosis a través del fracaso de las bombas de Ca<sup>2+</sup> y de sodio que impulsan ATP, conduciendo a la inundación de la célula con el calcio (activación de proteasas, fosfolipasas y, la transición de la permeabilidad mitocondrial) y con el sodio, resultando en la ruptura osmótica de la membrana plasmática.

### **9.3.2. Inducción de apoptosis**

Altos niveles de NO conllevan a la producción de ERON, que causan estrés oxidativo/nitrosativo a las células, condición que puede inducir la apoptosis por diversos mecanismos, incluyendo: (i) la inducción de p53 (Yung H.W. *et al.*, 2004), (ii) estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Kawahara K. *et al.*, 2001; He J. *et al.*, 2004), (iii) la activación de la transición de permeabilidad mitocondrial para provocar la liberación de citocromo *c*, y (iv) la activación de la p38 u otras vías de la MAP quinasa (Chen M. *et al.*, 2009).

Dado que altos niveles de NO reducen la producción de ATP mitocondrial, la muerte por necrosis de neuronas o astrocitos en estas condiciones depende de si la producción de ATP glucolítico puede continuar (Almeida A. *et al.*, 2001) y esto a su vez depende de si los niveles

de GSH celular se pueden mantener (Gegg M.E. *et al.*, 2003). La continuación de la glucólisis en presencia de alto nivel de NO generalmente induce apoptosis (Bal-Price A. and Brown G.C., 2000).

Existen varios mecanismos por los cuales el NO puede también inhibir la apoptosis en las células neuronales: (a) inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial mediada por GMPc/PKG (Takuma K. *et al.*, 2001), (b) activación de la vía de supervivencia PI-3K/Akt mediada por GMPc/PKG, (c) S-nitrosilación de caspasas, (d) activación de las vías de las MAP quinasas, (e) activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y/o AP-1 (Bonthius D.J. *et al.*, 2009), (f) incremento de la expresión de proteínas de choque térmico y Bcl-2 (Chung H.T. *et al.*, 2001) y (g) hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Beltran B. *et al.*, 2000).

#### **9.4. Inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial por óxido nítrico**

La inhibición de la función mitocondrial por NO se ha observado en una amplia gama de sistemas biológicos, incluyendo astrocitos (Jacobson J. *et al.*, 2005), microglía (Moss D.W. and Bates T.E., 2001), oligodendrocitos (Natarajan C. *et al.*, 2013), neuronas (Brorson J.R. *et al.*, 1999; Tangpong J. *et al.*, 2008), macrófagos (Davis C.W. *et al.*, 2010), cardiomiocitos aislados de rata (Shiva S. *et al.*, 2007), etc. El mecanismo responsable de la inhibición reversible de la CcO por NO implica la unión del NO con el citocromo  $\alpha_3$  reducido para formar un complejo de nitrosilo-hemo a través de la donación de un electrón al citocromo  $\alpha_3$  férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), a continuación interactúa con el centro de cobre  $\text{Cu}^{+2}_B$ . A mayor concentración de  $\text{O}_2$ , cuando la CcO está predominantemente en un estado oxidado, ésta consume el  $\text{O}_2$  y metaboliza al NO. En cambio, a baja concentración de  $\text{O}_2$ , cuando la enzima está predominantemente en un estado reducido, el  $\text{O}_2$  molecular y el NO compiten por la unión de la CcO y el NO no se metaboliza (al no convertirlo en nitrito). Esto resulta en un aumento de la concentración de NO, la formación de ERO, y la redistribución de  $\text{O}_2$  a consecuencia de una disminución de su consumo (Taylor C.T. and Moncada S., 2010). Además, se ha descrito que la exposición prolongada del NO en astrocitos resulta en un daño persistente de la CcO, posiblemente por la ruptura directa de  $\text{Cu}^{+2}_A$  causada por el  $\text{ONOO}\cdot^-$  (Sharpe M.A. and

Cooper C.E., 1998). También, el NO puede promover la oxidación de un solo electrón de ubiquinol a semiquinona, por lo tanto, interfiere con la transferencia del electrón al citocromo *b* (Poderoso J.J. *et al.*, 1996). La semiquinona es una efectiva fuente de  $O_2^{\bullet-}$  en las mitocondrias, la presencia de NO puede por tanto aumentar el  $O_2^{\bullet-}$ , con el que reacciona para formar  $ONOO^{\bullet-}$ , que a su vez podría ser responsable de los daños a NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I de la CTE) (Riobó N.A. *et al.*, 2001) (Figura I.11.). Por lo tanto, el  $ONOO^{\bullet-}$  podría nitrar (e inactivar) los residuos de tirosina de los dominios esenciales del complejo I, aunque también hay evidencias de la inactivación del complejo I por la S-nitrosilación de los grupos sulfhidrilo esenciales de la proteína mediada por NO (Brown G.C and Borutaite V., 2004). Estudios realizados en mitocondrias aisladas de neuronas y astrocitos han demostrado que la actividad del complejo I no se ve afectada por el  $ONOO^{\bullet-}$  (Bolaños J.P. *et al.*, 1995; Ma T.C. *et al.*, 2007), a menos que el estado del GSH celular hubiera sido previamente comprometido de forma sustancial (Barker J.E. *et al.*, 1996).

Es conocido que el NO tiene la capacidad de activar a la guanilato ciclasa soluble para formar GMP cíclico, mediador de una serie de cascadas de señalización celular, como la regulación de los canales iónicos, fosfodiesterasas o proteínas quinasas que dependen del GMP cíclico, siendo importante en diversos procesos fisiológicos tales como la vasodilatación y la neurotransmisión (Russwurm M. *et al.*, 2013). Por otra parte, el NO al inhibir reversiblemente la CcO de una manera competitiva con  $O_2$ , se convierte en un interruptor molecular implicado en la regulación de ciertas vías de señalización.

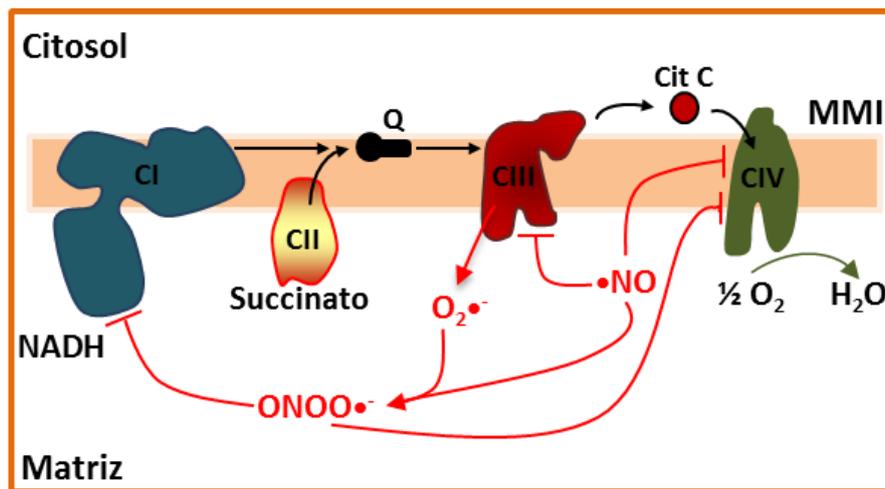


Figura I.11. Principales objetivos del óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO•) en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. El NO inhibe rápida y reversiblemente la CcO (complejo IV) al competir con el O<sub>2</sub>. Esto provoca un aumento en el estado reducido de los citocromos contracorriente de la CTE mitocondrial. Además, cuando el NO está presente persistentemente, interfiere con la actividad de la ubiquinol-citocromo *c* reductasa (complejo III) y aumenta la tasa de generación de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) por la CTE mitocondrial. Por reacción del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con el NO, las mitocondrias pueden formar ONOO•, el cual puede persistentemente inhibir tanto el NADH-ubiquinol reductasa (complejo I) y las actividades de la CcO.

Esta interacción puede ser amplificada por, al menos, tres maneras: primero, aumentando transitoriamente el ratio AMP:ATP por la inhibición de la síntesis de ATP, que es el interruptor para la estimulación de la AMPK que conduce a varios efectos, incluyendo el aumento de la captación de glucosa y la glucólisis (Almeida A. *et al.*, 2004; Carling D., 2004) y segundo, a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (hipoxia), NO endógeno permite la redistribución de O<sub>2</sub> a otras dianas no respiratorias de O<sub>2</sub>, como las prolin hidroxilasas (Hagen T. *et al.*, 2003). Éstas no registran la hipoxia y, por tanto, siguen degradando al factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1α), un factor de transcripción que, regula a la alza la expresión de genes asociados con la glucólisis. Por último, la interferencia de la cadena respiratoria mitocondrial mediada por NO induce cambios en el flujo del Ca<sup>2+</sup>, conduciendo a la activación de estrés de RE (Xu W. *et al.*, 2004).

## 10. NEURODEGENERACIÓN INFLAMATORIA

La neurodegeneración inflamatoria es la muerte/pérdida neuronal causada por la inflamación y es un proceso (como el estrés bioenergético, la agregación de proteínas, y la excitotoxicidad) que contribuye a la pérdida neuronal o disfunción en muchas enfermedades neurológicas. En general, la inflamación puede tener efectos beneficiosos y/o perjudiciales en cualquier enfermedad en particular y en cualquier fase particular de una enfermedad. Los efectos beneficiosos se deben principalmente a la eliminación de los agentes patógenos, limpieza de escombros, y en ayudar a la reparación, y los efectos perjudiciales son los efectos secundarios probablemente no intencionales de los procesos benéficos. Hay evidencia de que la inflamación del cerebro puede contribuir a la patología de distintas enfermedades neurodegenerativas crónicas (la de Alzheimer, la de Parkinson, esclerosis múltiple, y la demencia asociada a SIDA), así como patologías agudas tales como apoplejía, trauma cerebral, y meningitis (Brown GC and Bal-Price A., 2003; Zipp F and Aktas O., 2006; Klegeris A. *et al.*, 2007). Estas patologías tienen diferentes causas y consecuencias, pero todas ellas implican la inflamación del cerebro, y hay pruebas de que el bloqueo de la inflamación puede retrasar la aparición o reducir los síntomas (Lucas S.M. *et al.*, 2006; Wyss-Coray T., 2006).

La inflamación puede dañar el cerebro en una variedad de maneras, incluyendo: (1) en la pared vascular puede producir aterosclerosis, que conduce a un accidente cerebrovascular y demencia vascular; (2) puede comprometer la función de la BHE y permitir que los leucocitos y anticuerpos entren al cerebro; (3) los anticuerpos generados contra antígenos del cerebro pueden inducir ataque inmune como ocurre en la esclerosis múltiple; (4) puede inducir edema cerebral; (5) algunos tipos de inflamación pueden suprimir la neurogénesis; y (6) los agentes patógenos, los agregados de proteínas, o neuronas dañadas pueden activar la glía inflamatoria, que puede entonces provocar la muerte de las neuronas (Brown G.C. and Neher J.J., 2010).

### 10.1. El óxido nítrico y la neurodegeneración inflamatoria

Además de su papel como un neuromodulador, el NO actúa como un mediador inflamatorio, implicado en muchas enfermedades inflamatorias y degenerativas del SNC tales como la sepsis, la hipoxia, la enfermedad de Parkinson, etc. (Esplugues J.V., 2001). También se le ha visto implicado en la patogénesis de la demencia asociada al SIDA, donde se ha observado que la neurotoxicidad inducida por ciertas proteínas de la cubierta del VIH está parcialmente mediada por la activación de la NOS (Dawson V.L. *et al.*, 1993), asimismo, pacientes con VIH que desarrollan demencia severa exhiben un aumento sustancial de la NOSi cortical (Adamson D.C. *et al.*, 1996). Además al NO se le ha visto relacionado con la activación de proteínas reguladoras del VIH (Li W. *et al.*, 2008a), y se ha descrito que el gen Tat del VIH-1 induce la síntesis de NO en astrocitos humanos (Liu X. *et al.*, 2002). Los astrocitos y la microglía (macrófagos cerebrales) se activan en la mayoría de las patologías del SNC, incluso durante la infección, el trauma, envejecimiento, después de una isquemia o un derrame cerebral, y en la mayoría de las enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas. Varios autores han identificado ciertos mecanismos por los cuales la glía inflamatoria activada mata a las neuronas en cultivo (Brown G.C. and Bal-Price A., 2003; Block M.L. *et al.*, 2007). Un modo es el mediado por altos niveles de la expresión de NOSi en células gliales. Se ha demostrado que los altos niveles de NO resultantes inducen la muerte neuronal provocando la inhibición de la CcO mitocondrial en las neuronas (Bal-Price A. and Brown G.C., 2001; Bolaños J.P. and Heales S.J., 2010). Inhibición de la respiración neuronal por NO causa despolarización neuronal y la liberación de glutamato, seguido por excitotoxicidad a través del receptor de NMDA (Golde S. *et al.*, 2002; Jekabsone A. *et al.*, 2007). Esta excitotoxicidad puede ser potenciada por un segundo mecanismo, como el NO de la NOSi que se traduce en la liberación de glutamato en los astrocitos a través de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares estimulando la exocitosis de glutamato vesicular (Bal-Price A. *et al.*, 2002a). Por lo tanto los astrocitos inflamatorios activados mantienen un nivel más alto de glutamato extracelular, lo que probablemente no es suficiente para inducir solos la excitotoxicidad, pero puede también ser suficiente si además se inhibe la respiración neuronal de manera que los receptores NMDA son activados por la despolarización y el

glutamato. Sin embargo, para que se lleve a cabo este mecanismo se requieren niveles relativamente altos de NO. Por otra parte, bajos niveles de la expresión de la NOSi pueden generar sinergia con otras condiciones para inducir la muerte celular como por ejemplo la hipoxia. La hipoxia produce una fuerte sinergia con el NO para inducir la muerte neuronal a través de la inhibición de las vías respiratorias (Mander P. *et al.*, 2005). Esta sensibilización a la hipoxia es potencialmente importante en el accidente cerebrovascular, el traumatismo, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento del cerebro, donde la inflamación y la hipoxia pueden coexistir.

Otro mecanismo de neurodegeneración inflamatoria que se ha identificado es el de doble interruptor compuesto por la NOSi y la actividad de la NADH oxidasa de los fagocitos (PHOX) (Mander P. and Brown G.C., 2005). Se ha encontrado que la activación de la NOSi o de la NADPH oxidasa (NOX/PHOX) por si solas tuvieron poco efecto citotóxico, pero cuando ambos se activaron a la vez, causaron muerte neuronal mediada por el ONOO•<sup>-</sup>. La neurodegeneración inflamatoria inducida por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, IFN- $\gamma$ , araquidonato, ATP y/o PMA fue mediada por este mecanismo en condiciones particulares. La activación simultánea de PHOX y la NOSi en microglía resultó en la desaparición del NO, la aparición de ONOO•<sup>-</sup>, y la muerte masiva de neuronas co-cultivadas (Bal-Price A. *et al.*, 2002b). Además, se ha descrito que la PHOX es un regulador clave de la actividad inflamatoria de la microglía (Block M.L. *et al.*, 2007).

### **10.2. EL VIH y la persistente inflamación del SNC**

Además de la inflamación sistémica y el estrés oxidativo, la infección por VIH también está asociada con inflamación persistente y el estrés oxidativo en el compartimento del SNC, La infección por VIH se asocia con disfunción neurocognitiva incluso en personas que demuestran la supresión completa o casi completa de la replicación del VIH con la TARGA. La infección por el VIH causa mayor o menor grado de desarrollo cognitivo, motor, y déficits de comportamiento colectivamente conocidos como HAND que se encuentra presente hasta en un 50% de los individuos tratados con la TARGA (Antinori A. *et al.*, 2007; Grant I., 2008; Gannon P. *et al.*, 2011). HAND consta de tres sub-clasificaciones que abarcan un espectro de

deterioro neuropsicológico, desde el deterioro neurocognitivo asintomático (ANI) y el trastorno neurocognitivo leve (MND) hasta la demencia asociada al VIH (HAD), la forma más grave de HAND. La neuropatogénesis de HAND se ha asociado con una disminución de la sináptica neuronal y de la densidad dendrítica del SNC (Atluri V.S. *et al.*, 2013), con apoptosis y necrosis neuronal (Kaul M. *et al.*, 2005) y con la alteración de la fisiología neuronal (Gelman B.B. and Nguyen T.P., 2010). La TARGA ha disminuido la prevalencia de HAD (Robertson K.R. *et al.*, 2007), sin embargo, una proporción significativa de pacientes con tratamiento antirretroviral (30 - 50%) sigue desarrollando deterioro neurocognitivo, a pesar de la reducción de la viremia plasmática, la mejora de los parámetros inmunológicos, y la disminución de la progresión a SIDA (Simioni S. *et al.*, 2010; Mothobi N.Z. and Brew B.J., 2012). Un estudio reciente muestra un aumento significativo en la prevalencia de las formas más leves de HAND en la era TARGA (Heaton R.K. *et al.*, 2011). La infección persistente del SNC por el VIH impulsa la activación inmunitaria de los macrófagos/microglía residentes, astrocitos reactivos penetrantes, inflamación perivascular e infiltración de células monocíticas (Gelman B.B. DJ., 2012), que puede resultar en VIH-encefalitis (HIVE), particularmente en individuos que no reciben la terapia antirretroviral (Bilgrami M. and O'Keefe P., 2014), sin embargo se ha observado un decrecimiento por la terapia antirretroviral en la prevalencia de encefalitis causada por la infección por HIV (Bell J.E., 2004; Anthony I.C. and Bell J.E., 2008). A pesar de la extensa investigación en este campo, la patogénesis de HAND todavía no está clara. Los estudios se centran en los factores que contribuyen a la patogénesis de HAND que incluye al virus en sí y a los productos virales, en la inflamación sistémica y persistente del SNC, el envejecimiento en el cerebro infectado por el VIH, la distribución del subtipo del VIH, el uso concomitante de drogas de abuso (en particular cocaína y metanfetamina) y el potencial de neurotoxicidad de los antirretrovirales. La verdadera participación del tratamiento antirretroviral en el desarrollo de HAND aún no se conoce, aunque, algunos estudios clínicos han sugerido un papel para los efectos neurotóxicos directos y/o indirectos de los antirretrovirales en el SNC (Cardenas V.A. *et al.*, 2009; Marra C.M. *et al.*; 2009). Está claro que la introducción de la terapia antirretroviral ha disminuido la mortalidad/morbilidad de la infección por VIH, la gravedad del deterioro neurocognitivo y la neuroinflamación asociada a HAND, pero a pesar de estos efectos

beneficiosos de la terapia antirretroviral, la neuroinflamación y los daños neuropatológicos persisten (Anthony I.C, *et al.*, 2005; Simioni S. *et al.*, 2010; Silva A.C. *et al.*, 2012).

## ***II. OBJETIVO***



El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad de provocar toxicidad mitocondrial y la influencia sobre la bioenergética celular, ejercidas por el tratamiento con efavirenz en los dos tipos de células con mayor presencia en el SNC: neuronas y células gliales.

Los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar el efecto de efavirenz sobre la función mitocondrial y la viabilidad celular.
2. Analizar la influencia de efavirenz en la bioenergética celular y su repercusión en la viabilidad celular.
3. Determinar cómo actúan las acciones generadas por efavirenz en presencia del óxido nítrico, un mediador inflamatorio e inhibidor de la función mitocondrial.
4. Evaluar la capacidad de efavirenz para producir óxido nítrico en las células nerviosas, y si este mediador interfiere en la función mitocondrial de dichas células.



### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***



## **1. REACTIVOS**

### **1.1. Obtención de Efavirenz**

En la etapa inicial de este trabajo, el fármaco en estudio 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). Su pureza (98 - 100%) se evaluó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Posteriormente, fue obtenido de la casa comercial Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido).

En ambos casos, el fármaco fue disuelto en metanol 0,5% antes de proceder a su utilización, obteniendo una concentración de 3 mg/mL. La concentración de metanol utilizada no ha tenido un impacto significativo en los parámetros analizados.

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

La mayoría de los reactivos químicos utilizados en este estudio son de grado de pureza analítica y se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals (Stenheim, Alemania), Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), Merck (Darmstadt, Alemania) y Panreac Quimica S.A. (Barcelona, España).

Las sondas fluorescentes tetrametilrodamina (TMRM) y MitoSOX™, se adquirieron de Molecular Probes (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.); bisBenzimida H33342 trihidrocloruro (Hoechst 33342), diaminorodamina-4M AM (DAR-4M) y dihidrorodamina 123 (DHR 123) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals, y el yoduro de propidio (IP) y anexina V-fluoresceína del kit “Annexin V-FITC Apoptosis detection kit” de Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Además, los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western Blot se adquirieron de Abcam, BD Bioscience (San Jose, CA, EE.UU.), Sigma-Aldrich Chemicals, y los secundarios de Vector Laboratories (Burlingame, CA, EE.UU.) y DAKO (Glostrup, Dinamarca).

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

Suplementos para el cultivo celular como piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, penicilina/estreptomicina se obtuvieron de Gibco (Invitrogen Life Technologies), además de, tampón fosfato salino (PBS), tripsina-EDTA y el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640). Fungizona-anfotericina B fue suministrada por Clonetics (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.); el suero fetal bovino (FBS) fue obtenido de Lonza (Basilea, Suiza); Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), suero de caballo (HS), D-glucosa y citosina arabinosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals.

## **2. CULTIVO CELULAR**

### **2.1. Líneas celulares**

En la mayoría de los experimentos se utilizaron 2 líneas celulares inmortales: la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) y la de glioma humano U-251MG (CLS 300385).

El mantenimiento del cultivo de la línea celular SH-SY5Y se realizó en medio RPMI-1640 con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), suplementado con 2 mM de L-glutamina, 2,383 g/L de HEPES, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 1 mM de aminoácidos no esenciales y 110 mg/L de piruvato sódico, mientras que el mantenimiento de la línea celular U-251MG se llevó a cabo en DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), suplementado con 1 mM de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina. En ambos casos, 10% de FBS previamente inactivado por calor (30 minutos a 56 °C), penicilina (50 unidades/mL) y estreptomicina (50 µg/mL) se adicionaron a los medios. A los cultivos celulares se les reemplazó el medio cada 2 - 3 días y una vez alcanzada una densidad celular del 90 - 95% se realizaron sub-cultivos. Para realizar los experimentos se utilizaron cultivos celulares sub-confluentes de pase inferior a 25. Las células SH-SY5Y se diferenciaron a neuronas antes de llevarse a cabo los experimentos, para lo que 1 mM de db-cAMP (N (6), 2'-O-dibutilil-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), Sigma-Aldrich Chemicals) (Sánchez S. *et al.*, 2004) fue

añadido al cultivo un día después de la siembra. Las células se dejaron diferenciar durante 6 días, período durante el cual el medio se sustituyó cada 3 días.

## **2.2. Cultivos primarios de rata**

Ratas Wistar albinas fueron suministradas por Harlan Laboratories (Barcelona, España); se utilizaron hembras de unos 3 - 5 meses en edad fértil que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta de mantenimiento de roedores stock de laboratorio. Los animales fueron recepcionados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia tras un período de aclimatación (7 días) en el box de cuarentena, fueron estabulados en la sala de mantenimiento de ratas, con ciclo controlado de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, una humedad relativa del  $55 \pm 10\%$ , y con una impulsión de aire filtrado a través de filtros HEPA. Los animales fueron estabulados, sometidos a los procedimientos experimentales y sacrificados según el RD 53/2013 sobre “protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”, y siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federación Europea de Animales de Laboratorio). Los experimentos realizados con ratas en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia.

Para conseguir los cultivos primarios, se emplearon ratas embarazadas, en el caso de la obtención de neuronas se utilizaron aproximadamente 10 fetos de 15 – 16 días de gestación y para disponer de astrocitos en cultivo primario se utilizaron unos 12 postnatales recién nacidos de un día. Para asegurar la adherencia de las células aisladas al material de cultivo, la superficie de placas multipocillos y flasks se cubrió con una capa de poli-D-lisina bromhidrato (Sigma-Aldrich Chemicals). Se empleó a una concentración de 10 µg/mL (p/v), el material se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y dentro de la cabina de flujo laminar. Después, la poli-D-lisina fue retirada y el material se lavó dos veces con agua estéril (mismo volumen de poli-D-lisina adicionado). Luego el material revestido fue incubado a 37 °C durante 24 a 48 horas antes de su uso.

Los cultivos primarios de neuronas y astrocitos se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de rata (Almeida A. y Medina J.M., 1998). Los prosencéfalos fueron retirados y cortados con

un bisturí en EBSS que contenía 20 µg/mL de desoxirribonucleasa (DNasa, Roche Diagnostics) y 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich Chemicals) (Solución A), luego fueron centrifugados a 500 g durante 2 minutos. El precipitado se incubó en EBSS que contenía 0,025% de tripsina, 60 µg/mL de DNasa y 0,3% de BSA (Solución B) a 37 °C durante 15 minutos. La tripsinización se detuvo mediante la adición de FBS a una concentración final de 10% y la suspensión se centrifugó a 500 g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en la solución A y la suspensión se pasó 8 veces a través de una pipeta Pasteur anteriormente pulida por fuego. Se dejó reposar durante 4 minutos y se recogió el sobrenadante. Este paso se repitió por lo menos dos veces y las fracciones combinadas se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. Luego las células fueron resuspendidas en medio de cultivo (DMEM complementado con 10% de FBS). Finalmente la suspensión celular de neuronas se cultivó a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en flasks o placas multipocillo revestidos con poli-D-lisina, mientras que, la suspensión celular de astrocitos se cultivó a una densidad de  $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en flask de 150 cm<sup>2</sup>. Después de 48 h, el medio en el cultivo de neuronas fue reemplazado por DMEM suplementado con 5% de HS, 20 mM de D-glucosa y 10 µM de citosina arabinosa (previene la proliferación neuronal). Las neuronas se utilizaron después de 6 - 7 días en cultivo, cuando la presencia de neurofilamentos fue evidente en el 99% de las células. Los astrocitos se cultivaron por 12 – 14 días en estas condiciones, cuando este tipo celular representaban el 85% de las células, mientras que la proporción restante se componía de microglía y células progenitoras.

### **2.3. Mantenimiento de los cultivos celulares**

Todos los cultivos celulares 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).

## **3. TRATAMIENTOS**

Los experimentos se realizaron utilizando concentraciones de EFV (10 y 25 µM), similares a las observadas en plasma de pacientes bajo terapia antirretroviral. Los experimentos fueron desarrollados con cultivos sub-confluentes en medio completo suplementado con 3% (v/v)

de FBS inactivado. En cada experimento se usó un control del vehículo (metanol), esta concentración de metanol no tiene un impacto significativo en ninguno de los parámetros estudiados; también se utilizó un control negativo, células incubadas con el medio en ausencia de cualquier tratamiento.

Para los experimentos con NO exógeno, neuronas y células de glía se trataron con concentraciones de 0,3 mM o 0,5 mM de DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetil)amino]diazen-1-ium-1,2-diolato), respectivamente (Enzo Life Science, Pennsylvania, EE.UU.), siendo ambas capaces de inhibir la respiración celular (Almeida A. *et al.*, 2001). Con el fin de asegurar una exposición inmediata a NO, la solución de agua Milli-Q/DETA-NO recién preparada se incubó a 37 °C durante 20 minutos antes de ser aplicada al cultivo celular. Para los tratamientos combinados, DETA-NO se añadió 1 hora antes del tratamiento con EFV y se mantuvo durante todo el tiempo de exposición a EFV.

Con el propósito de evaluar si los cambios observados eran dependientes de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), en algunos experimentos se empleó un inhibidor no-específico de la NOS, N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (50  $\mu$ M), que se obtuvo de Cayman Chemical (Michigan, EE.UU.), el cual se añadió a neuronas y células gliales al mismo tiempo que EFV.

#### **4. MEDICIÓN ELECTROQUÍMICA DE CONSUMO DE OXÍGENO**

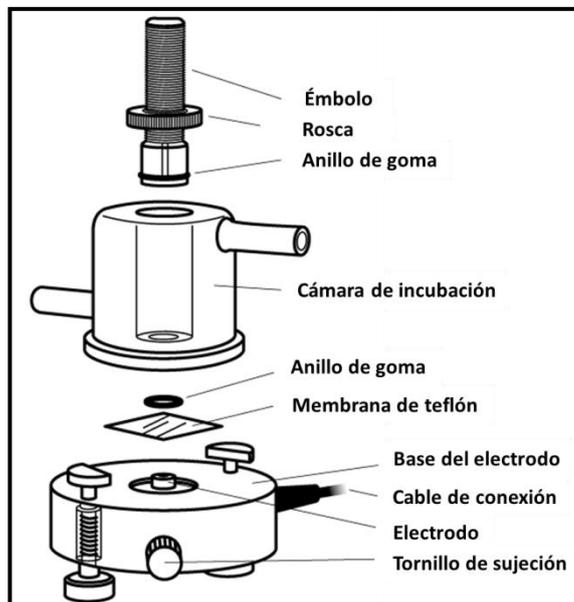
El consumo celular de oxígeno (O<sub>2</sub>) se midió utilizando un electrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Rank Brothers, Bottisham, Reino Unido), basado en un detector de O<sub>2</sub> polarográfico de membrana, descrito por primera vez por Lewis C. Clark (Clark L.C. *et al.*, 1953; Severinghaus J.W. and Astrup P.B., 1986). El sistema consiste en una célula de dos electrodos, una membrana permeable al O<sub>2</sub> y un electrolito. Los electrodos son un ánodo de plata/cloruro de plata y un cátodo de platino, y la conducción entre ambos se produce por un electrolito (solución de KCl 3 M) en la que se encuentran inmersas. El O<sub>2</sub> difunde a través de la membrana de teflón permeable a gases hacia el interior del sensor del electrodo. La aplicación de un voltaje polarizante (700 mV) ioniza el electrolito e inicia un flujo de corriente y una serie de reacciones electromagnéticas (Figura III.1):

Cátodo de Platino  $O_2 + 2e^- + 2H_2O \longrightarrow H_2O_2 + 2OH^-$  (reducción)

Ánodo de Plata  $4Ag + 4Cl^- \longrightarrow 4AgCl + 4e^-$  (oxidación)

**Figura III.1. Reacciones electroquímicas que tienen lugar en el electrodo de oxígeno (O<sub>2</sub>) tipo Clark. El principio de las reacciones es la oxidación del O<sub>2</sub> atmosférico.**

El oxígeno es consumido durante la electroquímica, siendo proporcionales la magnitud del flujo de corriente y la concentración de O<sub>2</sub> en el tampón de respiración (HBSS). Estas reacciones generan una corriente que es la base de la medida. El trazo o medición resultante es, por tanto, una medida del consumo de O<sub>2</sub> en la mezcla de reacción. El electrodo consta además de una cámara de incubación, que se encuentra rodeada permanentemente por una película de agua, procedente de un baño de agua atemperada a 37 °C, permitiendo mediciones a temperatura constante. La cámara de incubación se cierra por la parte superior con un émbolo, cuya función es aislar la muestra de la atmósfera.



**Figura III.2. Componentes y montaje del electrodo de oxígeno tipo Clark.**

Al inicio de cada experimento, se realiza una calibración del electrodo, usando 1 mL de tampón de respiración y manteniendo la cámara abierta durante unos minutos, asumiendo que el valor de pO<sub>2</sub> que se alcanza en el medio es de aproximadamente 200 μM (equivalente a la concentración de O<sub>2</sub> ambiental y considerado el valor máximo de concentración). El cero

se obtiene tras la adición de un secuestrador de  $O_2$ , el ditionito sódico ( $Na_2S_2O_4$ ) (Panreac Quimica S.A.) en exceso, y manteniendo la cámara de incubación cerrada, con el fin de absorber todo el  $O_2$ .

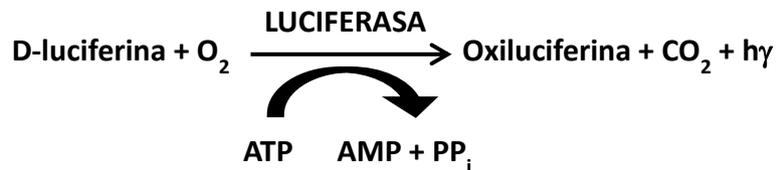
El electrodo está conectado a un procesador DUO. 18 (World Precision Instruments, Stevenage, Reino Unido), y los datos se analizaron con el programa Tarragona (Custom Written Software, University College London, Reino Unido). Esto nos permite observar a tiempo real la variación de la concentración de  $O_2$ , así como, su velocidad de consumo en diferentes períodos de tiempo.

La monocapa de las células SH-SY5Y y U-251MG intactas fue disgregada por tripsinización, la suspensión celular resultante se centrifugó a 500 *g* durante 5 minutos y las células vivas se contaron con un hemocitómetro (Bright Line Counting Improved Neubauer Chamber, Hausser Scientific, Horsham, PA, EE.UU.). Se utilizaron entre 4 y 5 millones de células por medición, resuspendidas en un volumen de 1 mL del tampón de respiración (HBSS), previamente atemperado a 37 °C. La medición electroquímica se realizó después de adicionar a la suspensión celular una vez colocada en la cámara los respectivos solventes, EFV (10 y 25  $\mu$ M), o DETA-NO. Este experimento también se realizó después de que ambos tipos celulares fueran incubados durante 6 h con los respectivos solventes, EFV o L-NAME. A continuación, se recogieron las células y se realizó el protocolo anteriormente descrito para medir su consumo de  $O_2$ .

En estos experimentos, el consumo de  $O_2$  que se registró era predominantemente mitocondrial, según se confirmó con la adición directa de cianuro de potasio (KCN) 1 mM, un inhibidor específico de la OXPHOS, en la cámara de incubación del electrodo.

## 5. NIVELES DE ATP INTRACELULAR

La concentración de ATP intracelular se determinó utilizando un ensayo de bioluminiscencia que se basa en la oxidación de luciferina a oxiluciferina (Figura III.3.).



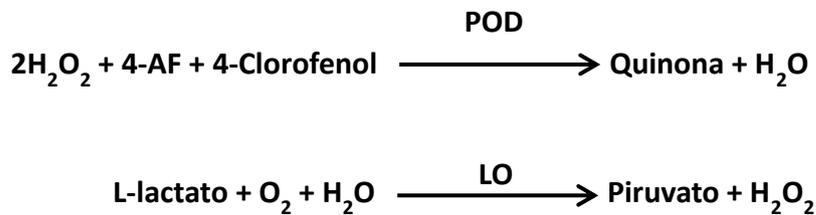
**Figura III.3. Oxidación de la luciferina a oxiluciferina mediada por la enzima luciferasa. La concentración de ATP en las muestras es directamente proporcional a la luz emitida por esta reacción.**

Para la determinación de este metabolito, se utilizó el “ATP Bioluminescence Kit” (Roche Diagnostics) y el ensayo se realizó conforme al protocolo establecido por el fabricante. En resumen, las células SH-SY5Y ( $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ), U-251MG ( $4,0 \times 10^4/\text{cm}^2$ ), neuronas primarias ( $2,5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) y astrocitos ( $4,0 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) se sembraron en flasks de  $25 \text{ cm}^2$ , y fueron tratadas en ausencia (vehículo) o presencia de EFV, DETA-NO o del co-tratamiento de DETA-NO con EFV durante 24 horas, tras lo cual las células se recogieron por disgregación mecánica de la monocapa utilizando “scrapers” (Corning Inc. Corning, NY, EE.UU.) en PBS frío. Después se centrifugaron a  $500 g$  durante 5 minutos en una microcentrífuga (5415-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , los pellets celulares resultantes se resuspendieron en tampón de dilución provisto por el kit. La curva estándar de ATP se preparó a partir de la solución estándar de ATP ( $10 \text{ mg/mL}$ ) suministrada por el kit, en un rango de  $10^{-11}$  a  $10^{-2} \text{ M}$  utilizando el tampón de dilución para minimizar el ruido de fondo de la luminiscencia. Los puntos de la curva estándar, así como las muestras, fueron aplicados por triplicado a una placa negra con fondo claro de 96 pocillos. A continuación, se adicionó tampón de lisis a todos los pocillos y la placa se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se detectó con el lector de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems) inmediatamente después de añadir  $30 \text{ }\mu\text{L}$ /pocillo del reactivo de luciferasa por medio de un dispensador automático interno del equipo.

Los valores de ATP obtenidos se normalizaron con respecto a la concentración de proteína de cada muestra, para lo cual tras la lisis celular se recogieron 10 µL/pocillo del lisado y la concentración proteica se determinó utilizando el “BCA Protein Assay Kit” (Pierce Chemicals, Boulder, CO, EE.UU., véase apartado 8.2 Cuantificación proteica).

## **6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LACTATO**

La concentración de lactato fue determinada en el medio extracelular, utilizando un ensayo colorimétrico. El principio del ensayo es la oxidación del lactato por la enzima lactato oxidasa (LO) a piruvato y peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) el cual en presencia de peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 4-clorofenol forma un compuesto rojo de quinona (Figura III.4.).



**Figura III.4. La oxidación del L-lactato a piruvato es mediada por la enzima lactato oxidasa (LO). La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra.**

Para la determinación de este metabolito, se utilizó el “Lactate Assay Kit” (Biovision Research Products, Mountain View, CA, EE.UU.) y el ensayo se realizó conforme al protocolo establecido por el fabricante. En resumen, las células SH-SY5Y (2,0x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>), U-251MG (4x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>), neuronas primarias (2,5x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>) y astrocitos (4,0x10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) se sembraron en placas de 6 pocillos y fueron tratadas en ausencia (vehículo) o presencia de EFV, DETA-NO o del co-tratamiento de DETA-NO con EFV, durante un período de 6 y 24 horas. Después, se recogió el medio extracelular y se filtró (filtro de jeringa whatman estéril 0,2 µm, Biotech, S.L., Madrid, España), siendo el filtrado resultante la muestra a analizar. La curva estándar de lactato se hizo a partir de una solución madre (25 µg/mL), proveniente de la solución estándar de lactato (100 nmol/µL) suministrada por el kit. La curva estándar y las muestras se prepararon en tampón de dilución suministrado por el kit. Los puntos de la curva estándar, el blanco (tampón de dilución) y las muestras fueron aplicados por duplicado (25

$\mu\text{L}$ ) en una placa de 96 pocillos. A continuación, se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del reactivo de reacción a todos los pocillos, se protegió de la luz e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector espectrofotométrico de placas 'Multiskan' (Thermo Labsystems).

Los valores de lactato obtenidos se normalizaron con respecto a la concentración de proteína de cada muestra (véase apartado 8.1.1. Obtención de extractos proteicos totales) y la concentración proteica se determinó utilizando el "BCA Protein Assay Kit" (Pierce Chemicals, Boulder, CO, EE.UU., véase apartado 8.2. Cuantificación proteica).

## 7. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se estudió por el ensayo colorimétrico de MTT [Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], que evalúa la actividad de las reductasas mitocondriales de acuerdo con la capacidad de las células para reducir una sal soluble de tetrazolio (amarillo) a cristales azules de formazan, reducción que tiene lugar solo cuando dichas enzimas están activas y es considerada un marcador de viabilidad celular, relacionado con la función mitocondrial (Mosmann T., 1983; Gerlier D. and Thomasset N., 1986).

Para esto, las células U-251MG ( $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ ), SH-SY5Y ( $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ), neuronas primarias ( $2,5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) y astrocitos ( $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) se sembraron en placas de 96 pocillos, se dejaron estabilizar durante una noche y el tratamiento con EFV se realizó durante 24 horas. Se añadió reactivo MTT (Roche Diagnostics) (20  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ ) durante las últimas 4 horas del tratamiento. Tras este período, las células se disolvieron en DMSO (100  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ , 5 minutos, 37 °C) y se detectó la absorbancia a 570 nm usando 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 detectada a 690 nm.

## 8. EXPRESION PROTEICA

### 8.1. Obtención de las muestras

Para el análisis de la expresión proteica, las células se sembraron en flasks de 25  $\text{cm}^2$ . Después del tratamiento, las células se recogieron sobre hielo para evitar la degradación de

las proteínas y para ello se realizó lo siguiente: el medio de cultivo fue retirado, se hizo un lavado con 5 mL de PBS frío y la monocapa de células se disgregó de forma mecánica, utilizando “scrapers”, en 1,5 mL de PBS frío. La suspensión celular se centrifugó en una microcentrifuga a 4 °C (5415-R, Eppendorf), 500 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante se utilizó según el protocolo necesario.

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

Los extractos proteicos totales se obtuvieron resuspendiendo los pellets en 70 - 100 µL (dependiendo del tamaño del pellet) de solución de lisis que contiene 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, DTT 1 mM, NaF 10 mM y NP-40 0,05% suplementado con 2 inhibidores de proteasa (“Complete Mini” protease inhibitor cocktail 10X y “Pefabloc”, ambos se Roche Diagnostics). A continuación, las muestras se agitaron en un vórtex durante 20 segundos y se incubaron en hielo durante 15 minutos tras los cuales se centrifugaron en una microcentrifuga a 16000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante que se obtuvo (el extracto proteico) se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

### **8.1.2. Obtención de extractos proteicos totales protegiendo las fosforilaciones**

Este método se utilizó para el análisis de la expresión de la proteína fosforilada AMPK. Los pellets celulares se resuspendieron en 75 – 100 µL de PhosphoSafe (Novagen, Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.), un tampón de lisis que conserva el estado de fosforilación de la proteína, suplementado con “Complete Mini” protease inhibitor cocktail 10X. Luego, las muestras fueron agitadas en un vórtex 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.

## **8.2. Cuantificación de proteína: ensayo del ácido bicinonínico (BCA)**

Este ensayo se basa en la reacción de Biuret, la cual consiste en la reducción del Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+</sup>, producida por la reacción Cu<sup>+2</sup> con residuos oxidables de los aminoácidos como tirosina,

cistina, triptófano o cisteína. Los iones  $\text{Cu}^+$  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 BSA, a partir de una solución madre de 2 mg/mL y preparadas en el mismo tampón que las muestras, con el fin de minimizar la absorbancia residual. Para la realización del ensayo, se siguieron las recomendaciones del “BCA Protein Assay Kit” (Pierce Chemicals). En general, en una placa de 96 pocillos se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  por pocillo de estándar o extracto proteico diluido (1:20); luego se añadió 200  $\mu\text{L}$  del reactivo por pocillo. El reactivo se preparó siempre antes del ensayo, mezclando 50 partes del reactivo A (ácido bicinconínico, carbonato sódico, tartrato sódico y bicarbonato sódico en 0,1 M de NaOH) con 1 parte del reactivo B ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  4%). El ensayo se realizó por duplicado. A continuación, la placa se incubó 30 minutos a 37 °C, 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).

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

Ambos protocolos se desarrollaron siguiendo métodos estándar.

#### **8.3.1. Geles de poliacrilamida**

La técnica de SDS-PAGE se realizó utilizando el sistema “Mini-PROTEAN 3 Cell” (Bio-Rad Laboratories, Hércules, 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%, mientras que los geles de concentración eran de un porcentaje fijo de 3,75% de poliacrilamida, y 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'-Tetramethylethilenediamina (TEMED, Fluka). Los extractos proteicos con la misma cantidad de proteína total (40 – 80 µg), se prepararon antes de cargarlos adicionándoles tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; glicerol 25% v/v, SDS 10%, β-mercaptoetanol 0,5% v/v y azul de bromofenol 0,5%), y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las proteínas. Paralelo a las muestras, 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 desarrolló en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM y SDS 0,1%) a un voltaje de 120 - 150 V.

### **8.3.2. Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Hybond ECL nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), utilizando el “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). La transferencia se realizó durante 1 hora, a 4 °C y a una corriente eléctrica constante de 0,4 amperios, en 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 solución Ponceau (Sigma-Aldrich Chemicals), que tiñe las proteínas reversiblemente y se utiliza como control de la cantidad de proteína cargada en cada pocillo y de la calidad de la transferencia. A continuación, después de eliminar la tinción de Ponceau con agua Milli Q, se procedió a incubar la membrana con una solución bloqueadora (leche en polvo sin grasa o BSA ambas al 5%, preparadas en tampón Tris salino con Tween 20 (TBS-T; Tris-HCl 20 mM pH 7,2; NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave y constante. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche, que fue preparado en solución bloqueadora y suplementado con azida sódica 0,02% (NaN<sub>3</sub>, Merck). Después de esto, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con TBS-T y en agitación fuerte, con el fin de eliminar el anticuerpo excedente. Luego, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el

anticuerpo secundario, preparado en la correspondiente solución de bloqueo, lo cual fue seguido por 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla III.1.

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>			
<b>Proteína</b>	<b>Dilución</b>	<b>Pm (kDa)</b>	<b>Casa Comercial</b>
Actina	1:1000	42	Sigma-Aldrich
AMPK-P	1:1000	62,5	Abcam
iNOS/NOS Tipo II	1:1000	130	BD Biosciences
nNOS	1:2500	155	BD Biosciences
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>		<b>Dilución</b>	<b>Casa Comercial</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 de WB.**

#### **8.4. Detección por quimioluminiscencia**

El revelado del inmunomarcaje se realizó utilizando el reactivo ECL (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) o, en determinados casos en los que se requería una mayor sensibilidad, se utilizó el reactivo SuperSignal West Femto (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos se basan en una reacción de quimioluminiscencia del luminol que genera un producto que se encuentra en estado excitado y emite luminiscencia (Whitehead T.P. *et al.*, 1979). El tiempo de exposición a los reveladores vario de 60 segundos a 5 minutos, según la intensidad de la señal de cada proteína y el reactivo utilizado. El visualizado del inmunomarcaje se realizó con un equipo de revelar automático Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japan). Los análisis densitométricos de estos resultados se realizaron utilizando el software ImageQuant LAS 400.

### **8.5. Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa (“stripping”)**

Con el propósito de reutilizar la membrana de nitrocelulosa y analizar en ella otras proteínas, se procedió a la eliminación de 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 15 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación constante. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-T a temperatura ambiente y se continuó con el protocolo estándar de la técnica de Western blot, empezando por la incubación de la membrana con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y siguiendo con la incubación de los anticuerpos primarios y secundarios.

## **9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CITOMETRIA ESTÁTICA**

Con el propósito de obtener imágenes individuales de células vivas y adheridas se empleó la técnica de microscopía de fluorescencia utilizando para ello un microscopio invertido de fluorescencia IX81 (Olympus, Hamburgo, Alemania) y el software CellR v. 2.8. La señal fluorescente, se cuantificó utilizando el software de citometría estática “ScanR” versión 2.03.2 (Olympus). Esta técnica permite analizar y cuantificar numerosos parámetros celulares de manera automática. A diferencia de la citometría de flujo, este procedimiento se realiza con células adheridas en placas, evitando así 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.)

Los tratamientos se analizaron por duplicado en placas multipocillo de 48 o 24 pocillos. Después del término del tratamiento e incubación con los fluorocromos respectivos, las células se lavaron, se mantuvieron con HBSS y se procedió al análisis (se tomaron 16 - 20 imágenes por cada pocillo).

Esta técnica no solo nos permite obtener los parámetros de fluorescencia estudiados, sino también el número de células totales, al marcar el núcleo de la célula con el fluorocromo

Hoechst 33342 siendo esto útil para conocer y evaluar el número de células resultantes después de estar bajo diferentes condiciones y tratamientos.

### **9.1. Proliferación celular y supervivencia**

Las células se dejaron proliferar exponencialmente durante 24 horas en presencia de vehículo, EFV, DETA-NO o una combinación de EFV y DETA-NO y, a continuación, se contaron conforme a la fluorescencia del fluorocromo Hoechst (1  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342, 20 imágenes/pocillo).

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

Las células fueron sometidas durante 6 y 24 horas a diferentes tratamientos y durante los últimos 30 minutos de tratamiento, se adicionaron los fluorocromos, Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  (para marcar el núcleo) y MitoSOX<sup>TM</sup> 2,5  $\mu\text{M}$ . Este último fue utilizado para detectar el radical superóxido de origen mitocondrial ya que está diseñado para dirigirse directamente a la mitocondria (es atraído por el potencial de membrana mitocondrial debido a su carga positiva), donde es oxidado únicamente por el ion superóxido y no por otras ERO. En el experimento se utilizó rotenona (ROT, inhibidor del complejo I de la CTE) como control positivo. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

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

Las células fueron expuestas a diferentes tratamientos durante 6 y 24 horas y en los últimos 30 minutos de tratamiento, se añadieron los fluorocromos, Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y TMRM 2,5  $\mu\text{M}$ , este último detectó los cambios observados en el  $\Delta\psi_m$ . Como control positivo fue utilizado un desacoplador de la OXPHOS, cianuro de 4-carbonil-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

#### **9.4. Detección de óxido nítrico (NO)**

Las células se trataron durante un período de 6 y 24 horas y en los últimos 30 minutos de tratamiento, se añadieron los fluorocromos, Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y DAR-4M AM (2,5  $\mu\text{M}$ ), un indicador fluorescente de NO y cuya intensidad de fluorescencia no es dependiente del pH. La activación celular (control positivo) se logró mediante el tratamiento con LPS de endotoxina de *E. coli* (10 mg/mL), IFN- $\gamma$  (50 U/mL) y TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) (denominado en este documento como "cóctel de LPS") durante un período de 24 horas. Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión.

#### **9.5. Detección de peroxinitrito**

El peroxinitrito intracelular se evaluó después de tratar las células U-251MG durante 6 y 24 horas, utilizando las sondas fluorescentes Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de DHR 123 (Sigma Aldrich). Estos se adicionaron para los últimos 20 minutos de tratamiento. Como control positivo se utilizó 33  $\mu\text{M}$  de clorhidrato de 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1), un generador de peroxinitrito (Singh R.J. *et al.*, 1999). Los filtros utilizados para este experimento fueron 495 nm de excitación y 519 nm de emisión.

#### **9.6. Apoptosis**

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

Las células se trataron durante 24 horas, y 30 minutos antes de terminar el tratamiento, el medio de cultivo se reemplazó por HBSS que contenía 0,2  $\mu\text{L}$ /pocillo de Hoechst 33342, 0,9  $\mu\text{L}$ /pocillo de anexina V-FITC, usada para detectar la exteriorización de fosfatodilserinas y 0,3  $\mu\text{L}$ /pocillo de IP, para marcar las células muertas o dañadas. La placa se incubó protegida de la luz, a 37 °C y con agitación constante. Las soluciones de IP y Anexina V se obtuvieron en forma de "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit" (Abcam). Como control positivo de apoptosis fue empleado un inhibidor de quinasas, la estaurosporina (STS) en un rango de 0,05 y 0,5  $\mu\text{M}$ . Los filtros utilizados para este experimento fueron 495 nm de excitación y 519 nm de emisión para anexina V-FITC y 540/10 nm de excitación y 590 nm de emisión para el IP.

### 9.7. Eliminación de óxido nítrico en tratamientos con DETA-NO

Ambas líneas celulares inmortales en estudio fueron incubadas con PTIO (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido 3-óxido, Sigma-Aldrich Chemicals) un eliminador de radicales estables para el NO. PTIO se adicióno junto con DETA-NO 1 hora antes de realizarse los tratamientos y se mantuvo durante todo el tiempo de exposición (24 horas) a DETA-NO. Al terminar el período de tratamiento se prosiguió a determinar el nivel del ion  $O_2^{\bullet-}$  mitocondrial (con MitoSOX<sup>TM</sup>) y el número de células en ambos tipos celulares.

### 10. CO-CULTIVO

Las células SH-SY5Y diferenciadas a neuronas fueron co-cultivadas en DMEM utilizando cámaras Transwell<sup>®</sup> (Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) (12 mm de diámetro y 0,4  $\mu$ m de porosidad de membrana) (Ortiz-Masiá D. *et al.*, 2010). Las células U-251MG ( $3,5 \times 10^4$ ) fueron cultivadas en las cámaras el último día de la diferenciación de las células SH-SY5Y (sexto día), al día siguiente se colocaron los insertos en la placa de las células SH-SY5Y diferenciadas y ambos tipos celulares fueron tratados en presencia o ausencia del vehículo y EFV (10 y 25  $\mu$ M) en medio fresco por un período de 24 horas. En los últimos 30 minutos de tratamiento se retiraron los insertos con las células U-251MG y se adicionaron al medio de las células SH-SY5Y los fluorocromos Hoechst 33342 1  $\mu$ M, TMRM 2,5  $\mu$ M y MitoSOX 2,5  $\mu$ M para poder determinar el número células,  $\Delta\psi_m$  y el ion superóxido mitocondrial respectivamente.

### 11. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL UTILIZANDO EL ANALIZADOR DE FLUJO EXTRACELULAR “SEAHORSE XF24”

La función mitocondrial a tiempo real en células intactas se realizó usando el analizador XF24 (Seahorse Bioscience, Copenhagen, Dinamarca) (Figura III.5.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se sembraron 24 horas antes de la medición en 250  $\mu$ L/pocillo en microplacas de 24 pocillos Seahorse Bioscience ( $5,0 \times 10^4$  células U-251MG y  $12,5 \times 10^4$  SH-SY5Y). Aproximadamente 24 horas antes del experimento se dejó hidratando el cartucho con los inyectores a 37 °C en 1 mL/pocillo de medio de equilibrado de Seahorse. Para el día del experimento, el medio fue reemplazado con DMEM para U-251MG y con

RPMI-1640 para las células SH-SY5Y, ambos sin bicarbonato (medio preparado Seahorse con rojo fenol, atemperado a 37 °C) y suplementado con FBS al 3% en ambos casos y piruvato de sodio 1 mM en el caso de DMEM. Los tratamientos (vehículo, EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$ ) se realizaron en 500  $\mu\text{L}$ /pocillo durante 1 hora, a 37 °C, en atmosfera sin  $\text{CO}_2$ . Durante esa hora se retiró el cartucho que se había estado hidratando con medio de equilibrado de Seahorse y se rellenaron los puertos para las adiciones con los inhibidores correspondientes (oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A). Los inhibidores deben prepararse en el mismo medio (DMEM o RPMI-1640) sin tamponar teniendo en cuenta que la concentración debe ser 10X de la deseada en el pocillo. El cartucho tiene que llevar los compuestos inhibidores en cada uno de los inyectores (Figura III.5.). Media hora antes de realizar el experimento con la placa de células se inició el calibrado de los sensores. Después de terminar la detección de la respiración basal, el equipo según su protocolo de medición, va añadiendo a las células los siguientes inhibidores: oligomicina 2  $\mu\text{M}$ ; FCCP 0,6  $\mu\text{M}$ ; FCCP 0,4  $\mu\text{M}$  y una mezcla de rotenona 1  $\mu\text{M}$  y antimicina A 1  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos en cada experimento en ambas líneas celulares son respecto al número de células presentes en cada pocillo.



**Figura III.5. Analizador de flujo extracelular Seahorse XF24, acoplado a un ordenador con el software XF y una microplaca de 24 pocillos para cultivo celular con su cartucho e inyectores.**

## 12. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

### 12.1. Reactivos para el análisis de los complejos mitocondriales

La mayoría de los reactivos químicos utilizados para el desarrollo de este estudio son de grado de pureza analítica y se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals, con excepción del reactivo NADH Grade I que se obtuvo de Roche Diagnostics y de las sales fosfato dibásico de potasio ( $K_2HPO_4$ ) y fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ) que fueron adquiridas de Panreac Quimica S.A. y que se utilizaron para preparar los distintos tampones (buffers KP).

### 12.2. Preparación de homogenizado celular

Para el análisis de la actividad de los complejos mitocondriales, se utilizaron aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células U-251MG y  $3,0 \times 10^6$  células SH-SY5Y. Después del tratamiento, las células se recogieron sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas y para ello se realizó lo siguiente: el medio de cultivo se retiró, se hizo un lavado con PBS frío y la monocapa de células se disgregó de forma mecánica, utilizando "scrappers", en PBS frío. La suspensión celular se centrifugo en una microcentrifuga a  $4^\circ C$  (5415-R, Eppendorf),  $500 g$  durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 0,2 mL de tampón SETH, pH 7.4 (sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, 10 mM Tris-HCl, 50 UI/mL de heparina) y luego se sónico (Ultrasonic cleaner Branson 200, Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) tres veces en agua enfriada con hielo durante 10 segundos, colocando en hielo por 30 segundos entre cada sonicación. Para eliminar los restos celulares, los homogenizados se centrifugaron a  $8000 \times g$  durante 10 minutos y los sobrenadantes se guardaron a  $-80^\circ C$  hasta la determinación de las actividades enzimáticas. El sobrenadante que contiene una suspensión preservada de orgánulos mixtos se utilizó como muestra de reacción para el análisis de espectrometría (Carilla-Latorre S. *et al.*, 2010). El periodo entre la preparación del homogenizado y análisis de la actividad de la enzima fue siempre inferior a 5 días. Para la determinación de la concentración de proteínas del homogenado celular se usó el método colorimétrico de Bradford, utilizando BSA como estándar. En general, en una placa de 96 pocillos se adicionaron 10  $\mu L$  por pocillo de estándar o extracto proteico diluido (1:15); luego

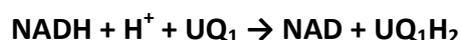
se añadió 200 µL por pocillo del reactivo para cuantificación de proteína (Bio-Rad) diluido (1:5) con agua destilada. El reactivo se preparó siempre antes del ensayo y el ensayo se realizó por duplicado. A continuación, la placa se incubó 10 minutos a 37 °C, con agitación constante y protegida de la luz. La medición de la absorbancia a 595 nm se realizó con un lector espectrofotométrico de placas 'Multiskan' (Thermo Labsystems).

### **12.3. Análisis de la actividad enzimática de los complejos mitocondriales a partir del homogenado celular**

La actividad enzimática de los complejos mitocondriales se determinó por un método espectrofotométrico (Tiranti V. *et al.*, 1995), utilizando para ello un espectrofotómetro Infinite® 200 PRO series (TECAN Trading AG, Switzerland) y su software (i-Control™).

#### **12.3.1. Complejo I (NADH-Ubiquinona Oxidoreductasa)**

Principio



Medir la desaparición de NADH a 340 nm y a 30 °C de temperatura.  $\epsilon = 6.81 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Se preparó la siguiente mezcla (duplicado) en una cubeta de 1 cm.

Buffer KP 40 mM pH 8	500 µL
NADH 1 mM	200 µL
NaN <sub>3</sub> 50 mM	20 µL
BSA – EDTA 1%	100 µL
Homogenado (muestra)	35 µL
Agua Milli Q	120 µL

Se mezcló e incubó por 8 minutos a 30 °C (dentro del espectrofotómetro). Luego se midió la línea base (LB), a este punto la Abs debe estar entre 0,6 – 1,2. Una vez medida la LB se añadió:

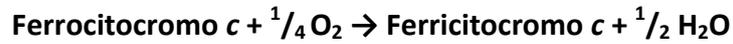
CoQ <sub>1</sub> 10 mM	10 µL
------------------------	-------





#### 12.3.4. Complejo IV (Citocromo c oxidasa)

Principio



La reacción fue seguida por el decrecimiento en la absorbancia del citocromo c a 550 nm y a 38 °C.  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Se preparó la siguiente mezcla en una cubeta de 1 cm (duplicado).

Buffer KP 100 mM pH 7	100 $\mu\text{L}$
Citocromo c 800 $\mu\text{M}$ reducido	100 $\mu\text{L}$
Agua Milli Q	770 $\mu\text{L}$

Se mezcló e incubó por 3 minutos a 38 °C. Luego se adicionó:

Homogenado	20 $\mu\text{L}$
------------	------------------

Se mezcló y se midió durante 3 minutos.

La actividad del complejo IV está dada por la Abs/min de la reacción con el Citocromo c reducido.

### 13. 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 experimentos individuales realizados en cada parámetro en estudio se indica en los pies de figura.

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, 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), tal y como se indica en cada pie de figura. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos si  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) o  $P < 0,001$  (\*\*\*). En muchos de los casos los datos se representan como porcentaje del control, siendo considerado el control negativo (valor obtenido en las células sin tratamiento) como el 100%.



## ***IV. RESULTADOS***



---

## **BLOQUE 1: CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES**

### **1. EFAVIRENZ ALTERA LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y COMPROMETE LA VIABILIDAD CELULAR**

#### **1.1. Análisis del consumo de oxígeno**

Debido a que la disminución de la concentración en el consumo de O<sub>2</sub> de forma aguda por parte de EFV ya ha sido observada en células hepáticas (Blas-García A., *et al.*, 2010), se quiso evaluar de igual manera el consumo de O<sub>2</sub> de las líneas celulares U-251MG y SH-SY5Y (diferenciadas a neuronas) intactas frente al tratamiento agudo de EFV a concentraciones de 10 y 25 µM. En estos experimentos se utilizó un electrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark.

La administración directa de EFV provocó una disminución rápida y dependiente de la concentración en el consumo de O<sub>2</sub> muy similar en ambas líneas celulares, alcanzando significatividad estadística, frente a las células tratadas con el vehículo, a concentraciones similares a las observadas en plasma de pacientes bajo tratamiento diario con este fármaco (Figura IV.1.). Este descubrimiento está de acuerdo con los resultados previos obtenidos en células hepáticas intactas o mitocondrias aisladas de hígado de rata (Blas-García A., *et al.*, 2010), donde la tendencia a disminuir el consumo de O<sub>2</sub> por EFV fue muy parecida a la observada en las células utilizadas en este estudio.

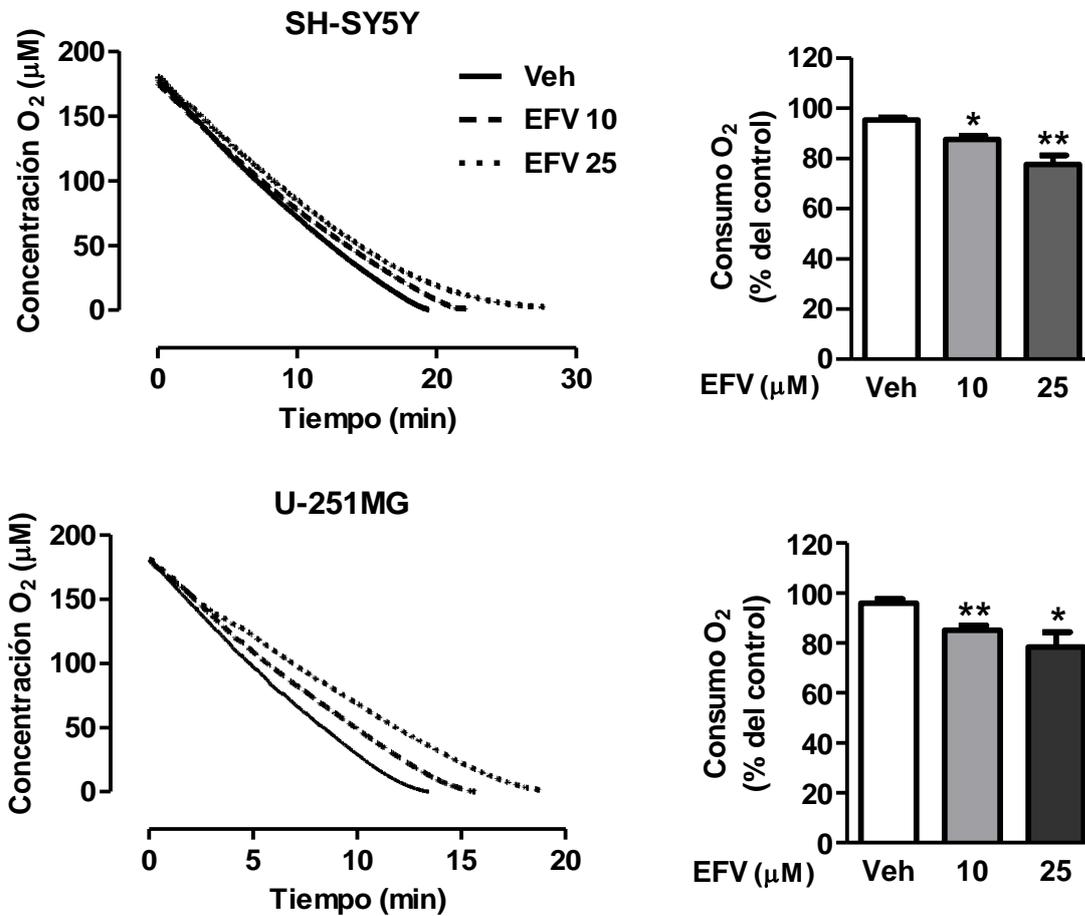


Figura IV.1. Análisis del consumo de O<sub>2</sub> tras la administración directa de EFV. En ambas líneas celulares, EFV es capaz de disminuir de forma aguda el consumo de O<sub>2</sub>. Las gráficas muestran trazos representativos e histogramas de la cuantificación de los datos que presentan la tasa de consumo de O<sub>2</sub> (electrodo tipo Clark O<sub>2</sub>) en ausencia (vehículo) y la presencia de EFV 10 y 25 μM. Los datos (media ± SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto al vehículo.

## **1.2. Determinación de los niveles de ion superóxido de origen mitocondrial**

Alteraciones en el funcionamiento de la CTE resultan normalmente en modificaciones de parámetros mitocondriales asociados, como es la producción del ion superóxido, que pueden resultar perjudiciales para la célula. Para analizar el potencial mitotóxico de EFV, se evaluó su efecto sobre la producción del ion superóxido mitocondrial utilizando el fluorocromo MitoSOX<sup>TM</sup> que es específico para la mitocondria. Se hicieron mediciones por citometría estática tras dos periodos de incubación 6 y 24 horas (h) que mostraron que la incubación de neuronas (SH-SY5Y) y de células gliales (U-251MG) con EFV 10 y 25  $\mu$ M llevó a un significativo incremento en la producción del ion superóxido mitocondrial (Figura IV.2.). A 6 h de incubación con EFV, las neuronas muestran un incremento dependiente de la concentración en la producción del ion superóxido, que es mucho más marcado a las 24 h. Este efecto tiempo-dependiente no se observó en las células gliales ya que tanto a 6 y 24 h sus niveles de producción del ion superóxido son muy similares.

El incremento acumulado en el tiempo del ion superóxido mitocondrial es remarcable principalmente en las neuronas diferenciadas a partir de las células SH-SY5Y, ya que estos valores fueron incluso mayores a los obtenidos con el control positivo rotenona (ROT 10  $\mu$ M), un conocido inductor de la producción del ion superóxido en el complejo I de la CTE (Fig.IV.2C).

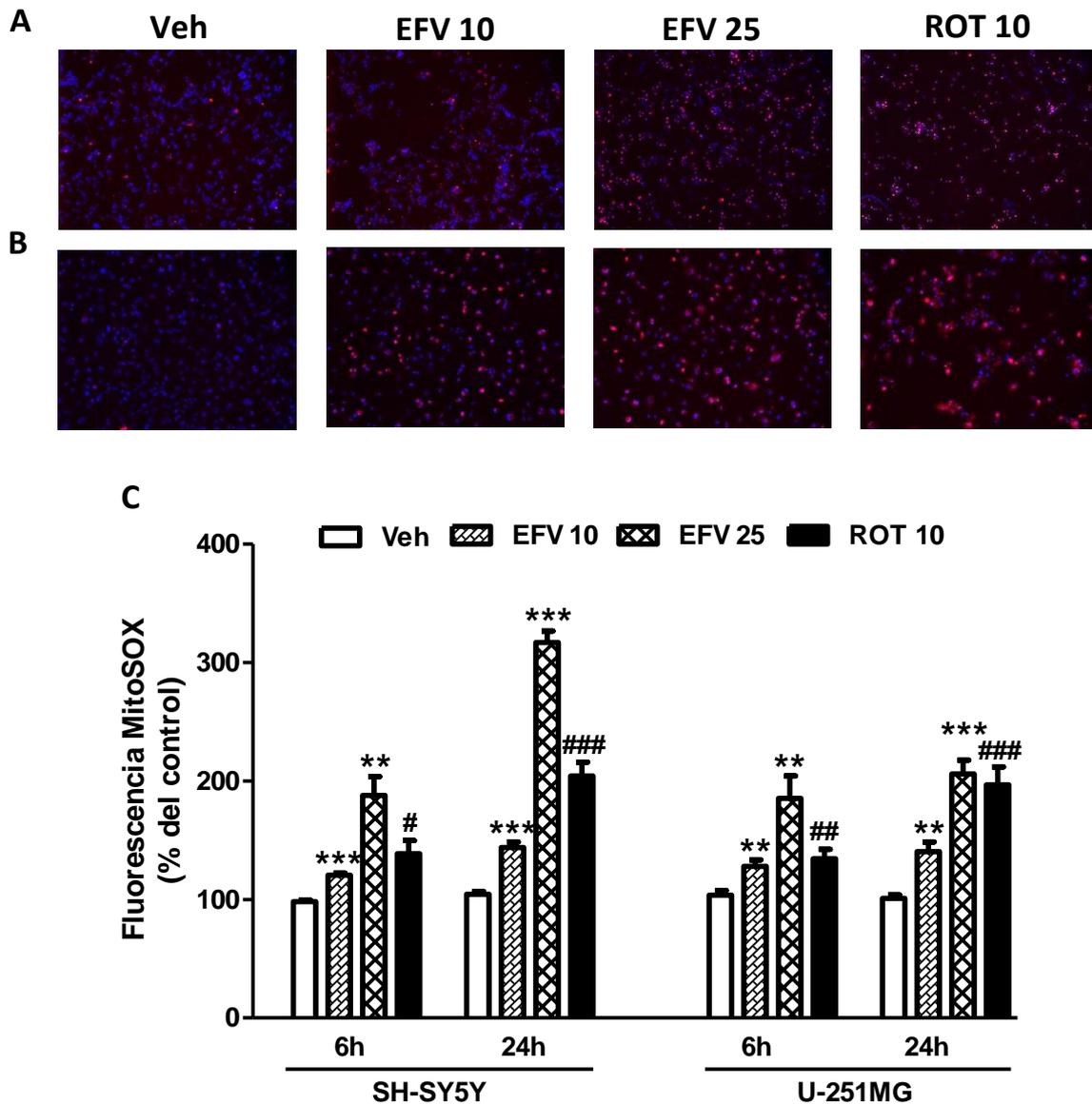


Figura IV.2. Análisis del efecto de EFV sobre la producción del ion superóxido mitocondrial. (A, B) Imágenes representativas de la fluorescencia emitida por células SH-SY5Y diferenciadas a neuronas y de células gliales respectivamente incubadas durante 24 h en ausencia (vehículo) o presencia de EFV (10 y 25  $\mu$ M). Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (azul) y el superóxido mitocondrial con MitoSOX (rojo). (C) La gráfica muestra la cuantificación de la fluorescencia media de MitoSOX obtenida después de 6 y 24 h de incubación con vehículo, EFV o ROT. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. Los datos de ROT fueron analizados individualmente #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 respecto a las células sin tratar.

Los resultados obtenidos en las líneas celulares de neuroblastoma y de glioma se reprodujeron en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata después de ser incubadas con EFV durante 24 h (Figura IV.3.), observándose un aumento concentración-dependiente en los niveles del ion superóxido mitocondrial en ambas poblaciones de células, siendo este aumento mayor en los astrocitos que en las neuronas.

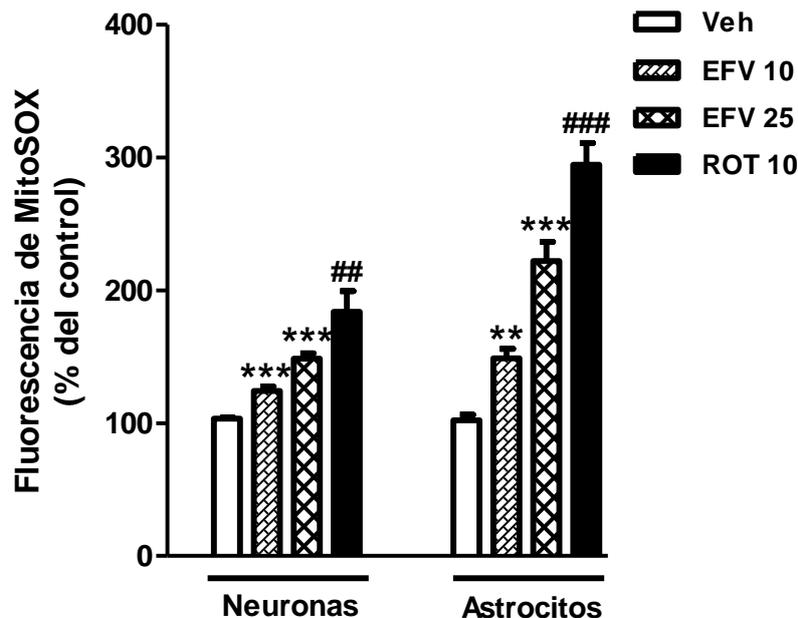


Figura IV.3. Efecto de EFV (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) sobre la producción del ion superóxido mitocondrial en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata. La gráfica muestra la cuantificación de la fluorescencia media de MitoSOX obtenida después de 24 h de incubación en ausencia (vehículo) o presencia de EFV o ROT 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo. Los datos de ROT fueron analizados individualmente ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  respecto a las células sin tratar.

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

Después de observar que el tratamiento con EFV produce un incremento en los niveles de superóxido mitocondrial, se analizó otro parámetro directamente relacionado con la disfunción mitocondrial como lo es el  $\Delta\psi_m$ . Mediciones por citometría estática, usando la sonda fluorescente TMRM en neuronas diferenciadas a partir de células de neuroblastoma y

en células gliales, revelaron una disminución significativa del  $\Delta\Psi_m$  tras 6 y 24 h de incubación con EFV (Fig IV.4.).

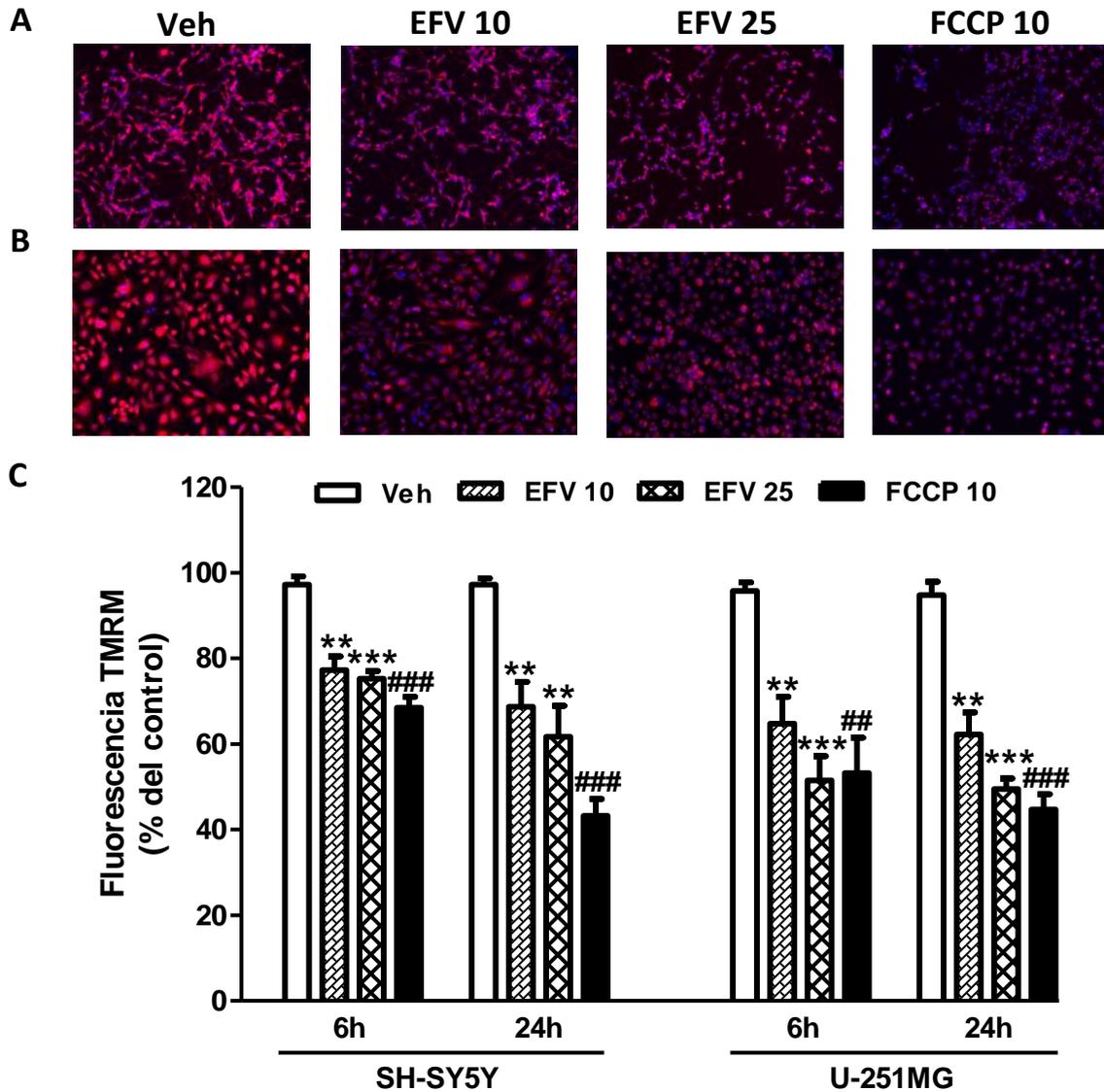


Figura IV.4. Análisis del efecto de EFV sobre el  $\Delta\Psi_m$ . (A, B) Imágenes representativas de la fluorescencia emitida por las neuronas diferenciadas y las células gliales respectivamente, incubadas durante 24 h en ausencia (vehículo) o presencia de EFV o FCCP. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (azul) y el  $\Delta\Psi_m$  con TMRM (rojo). (C) El histograma muestra la cuantificación de la fluorescencia media obtenida por TMRM. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. Los datos de FCCP fueron analizados individualmente ## p<0,01; ### p<0,001 respecto a las células sin tratar.

La cuantificación de los valores de fluorescencia demostró que EFV ejercía un efecto sobre este parámetro en ambas líneas celulares, disminuyendo el  $\Delta\Psi_m$  de manera proporcional a la concentración, siendo ligeramente mayor después de las 24 h de tratamiento (Fig. IV.4.). Esta disminución del  $\Delta\Psi_m$  era más notable en las células gliales, llegando a tener un comportamiento similar al observado con el control positivo FCCP 10  $\mu$ M (desacoplador de la OXPHOS).

Los resultados obtenidos en las líneas celulares se reprodujeron en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata (Figura IV.5.), observando de igual forma una disminución en el  $\Delta\Psi_m$  en ambas poblaciones de células después del tratamiento con EFV durante 24 h, dicha respuesta fue concentración dependiente en las neuronas, no así, en los astrocitos, aunque el descenso del  $\Delta\Psi_m$  fue más destacado en estos últimos.

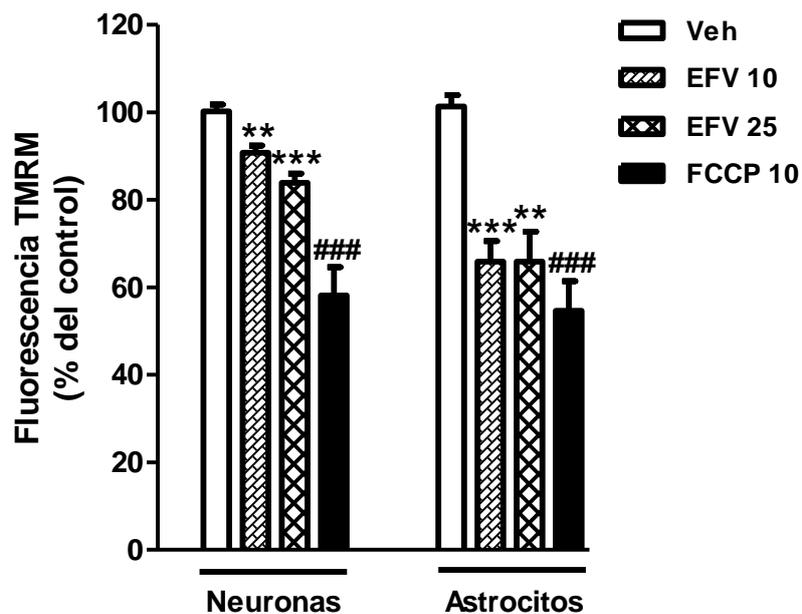


Figura IV.5. Efecto de EFV (10 y 25  $\mu$ M) sobre el  $\Delta\Psi_m$  en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata. La gráfica muestra la cuantificación de la fluorescencia media de TMRM obtenida después de 24 h de incubación en ausencia (vehículo) o presencia de EFV o FCCP. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4) se expresaron como % del valor obtenido en células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. Los datos de FCCP fueron analizados independientemente ###p<0,001 respecto a las células sin tratar.

#### 1.4. Análisis de la proliferación y supervivencia celular

Las células gliales se dejaron proliferar exponencialmente por 24 h y se evaluó la respuesta al tratamiento con EFV (10 y 25  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en el caso de las células de neuroblastoma que fueron diferenciadas a neuronas y que al diferenciarse dejan de proliferar, este experimento no proporciono datos sobre las proliferación sino sobre la supervivencia bajo el tratamiento con EFV. Las células SH-SY5Y el día después del período de diferenciación se incubaron con EFV durante 24 h y finalizado el tratamiento se procedió a determinar el número de células. En este período de tiempo no se observaron diferencias significativas en el número de células en ninguna de las líneas celulares al ser tratadas con EFV 10  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, a las 24 h de tratamiento con EFV 25  $\mu\text{M}$  se detectó una disminución significativa en las neuronas, efecto que no fue observado en las células gliales (Figura IV.6.). Además de la disminución en el número de células mostrada a esta concentración, también se observaron cambios morfológicos en las neuronas (disminución de las neuritas).

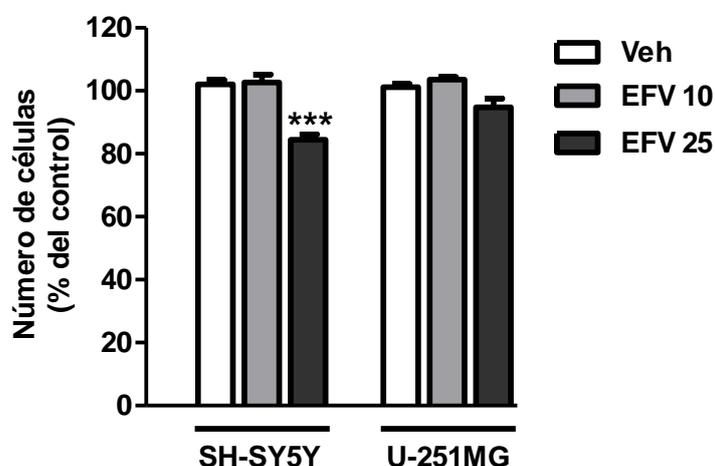


Figura IV.6. Efecto del tratamiento de EFV (24 h) sobre el número de células en neuronas diferenciadas y células gliales. Los histogramas representan el recuento de células, determinado por citometría estática de la fluorescencia de Hoechst. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=8) se relativizaron respecto al número de células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo.

### 1.5. Análisis de la viabilidad celular

Los resultados obtenidos con el ensayo espectrofotométrico de MTT (Figura IV.7.A) confirmaron el efecto inhibitorio del tratamiento con EFV 25  $\mu$ M a 24 h en las neuronas diferenciadas, sugiriendo además una disminución en la función mitocondrial. Dicho efecto inhibitorio es específico para este tipo celular, ya que en las células gliales, EFV a esta concentración y al mismo período de tratamiento no produce cambios significativos en la viabilidad celular.

Este experimento se reprodujo en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata (Figura IV.7A.), mostrando de igual forma una disminución en la viabilidad celular de las neuronas después del tratamiento con EFV durante 24 h. Cabe mencionar que en los astrocitos, EFV 25  $\mu$ M es capaz de producir una ligera disminución en la viabilidad, llegando a ser esta significativa con respecto al vehículo.

Imágenes representativas de cultivos celulares de neuronas y células gliales obtenidas en un microscopio óptico invertido después de 24 h de tratamiento con EFV a concentraciones de 10 y 25  $\mu$ M se muestran en la Figura IV.7. La presencia de EFV 25  $\mu$ M en las neuronas diferenciadas provocó un claro impacto sobre la morfología celular (Figura IV.7B.), en cambio, las células de glioma (U-251MG) presentaron una ligera alteración en su morfología con respecto a las tratadas con el vehículo (Figura IV.7C.). De una manera similar que en las neuronas diferenciadas, EFV tiene la capacidad de provocar disminución de las neuritas y de producir cambios morfológicos incluso con la menor concentración (10  $\mu$ M) sobre las neuronas primarias de rata (Figura IV.7D.), mientras que, los astrocitos primarios de rata no mostraron mayores cambios morfológicos al ser expuestos a EFV, sin embargo una leve disminución en la población celular fue provocada por EFV 25  $\mu$ M (Figura IV.7E.).

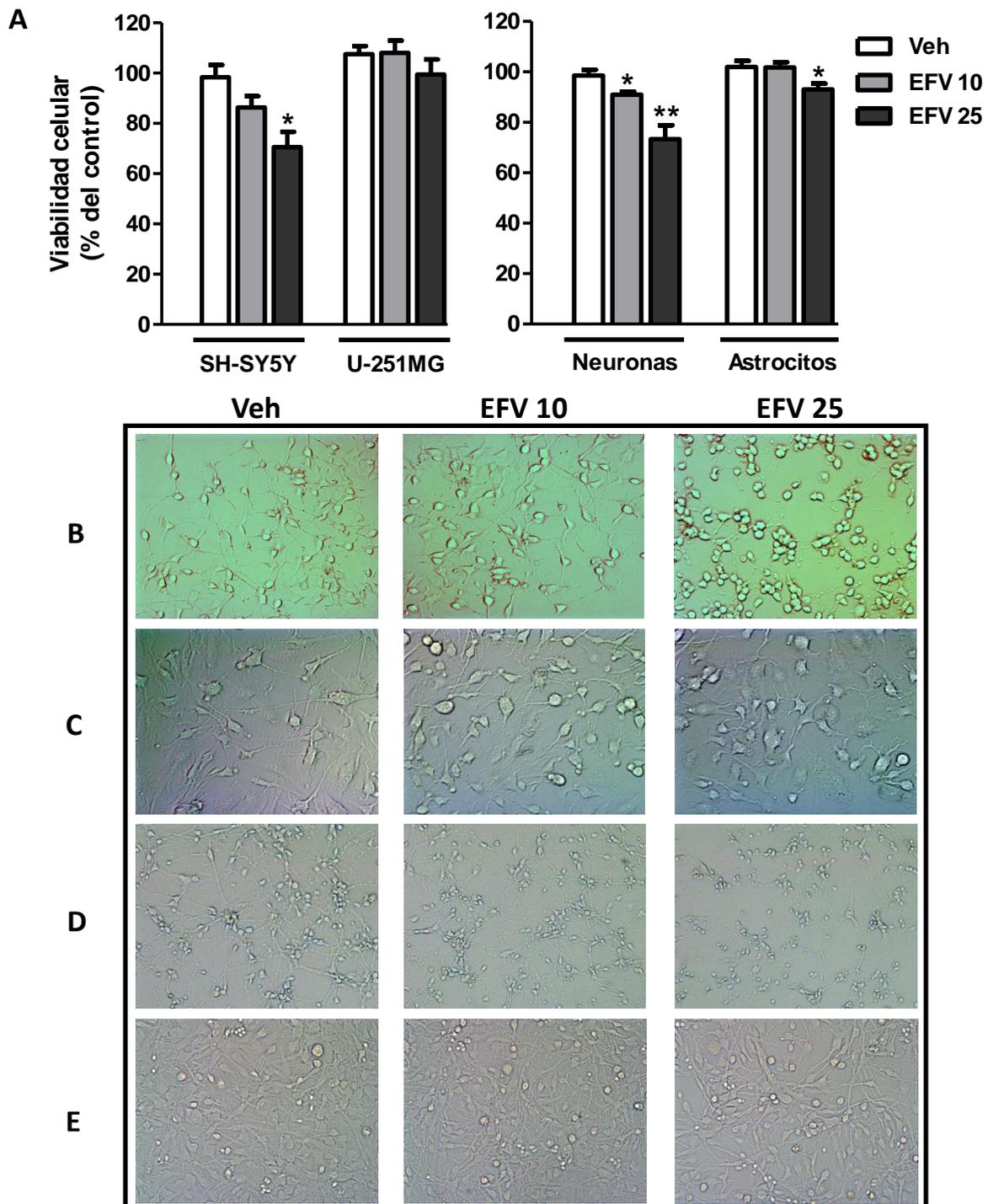


Figura IV.7. Efecto del tratamiento de EFV sobre la viabilidad celular. (A) Viabilidad de neuronas y células gliales determinada por el ensayo de MTT después de 24 h de incubación. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4-6) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto al vehículo. Imágenes representativas de cultivos celulares tratados con EFV durante 24 h: (B) SH-SY5Y diferenciadas a neuronas, (C) U-251MG, (D) neuronas primarias de rata y (E) astroцитos primarios de rata.

### **1.6. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

Como se describe anteriormente, EFV socava el consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial en las células gliales y de las neuronas en cultivo, por consiguiente, se quiso explorar a que nivel en particular es producida esta alteración. Determinación espectrofotométrica de la actividad individual de los 4 complejos de la CTE (CI-IV) reveló que en las células U-251MG, 1 h de tratamiento con EFV produjo una disminución importante y dependiente de la concentración en la actividad de CI, que fue más pronunciada después de 6 h. Además, una disminución modesta pero estadísticamente significativa apareció en el CIII (Figura IV.8.) mientras que no se observaban diferencias en las actividades de los otros complejos.

Las neuronas también manifestaron una disminución concentración-dependiente en la actividad del CI a 1 h de tratamiento con EFV, disminución que se ve más marcada después de las 6 h de incubación. Cabe mencionar que en este tipo celular, no se detectaron cambios significativos en la actividad de los otros complejos evaluados en ninguno de los dos períodos de tiempo estudiados (Figura IV.9.). En algunos experimentos, también se añadieron inhibidores específicos de los complejos de la cadena respiratoria al medio de incubación, utilizándolos como controles positivos.

La disminución concentración-dependiente en la actividad del complejo I producida por EFV en ambas líneas celulares en estudio concuerda con el efecto descrito de este fármaco sobre la actividad del CI de mitocondrias aisladas de hígado de rata (Blas-García A., *et al.*, 2010).

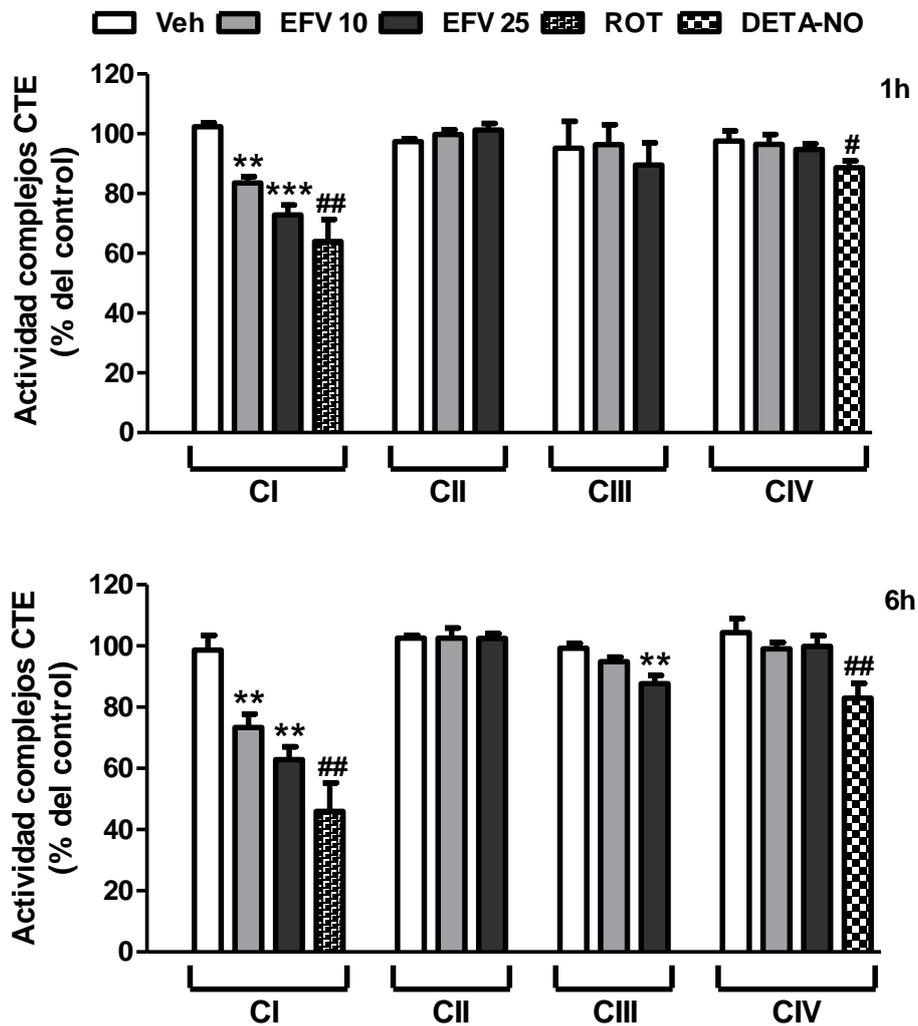


Figura IV.8. Impacto de EFV sobre la actividad individual de los complejos de la CTE en las células gliales. Células U-251MG fueron expuestas a EFV (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) durante 1 o 6 h y la actividad de los complejos I-IV se analizó espectrofotométricamente. La ROT 10  $\mu\text{M}$  fue empleada como inhibidor específico del CI y DETA-NO 0,5 mM fue utilizado como inhibidor del CIV. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (test de Newman-Keuls), \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo. Los datos de ROT y DETA-NO fueron analizados individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ .

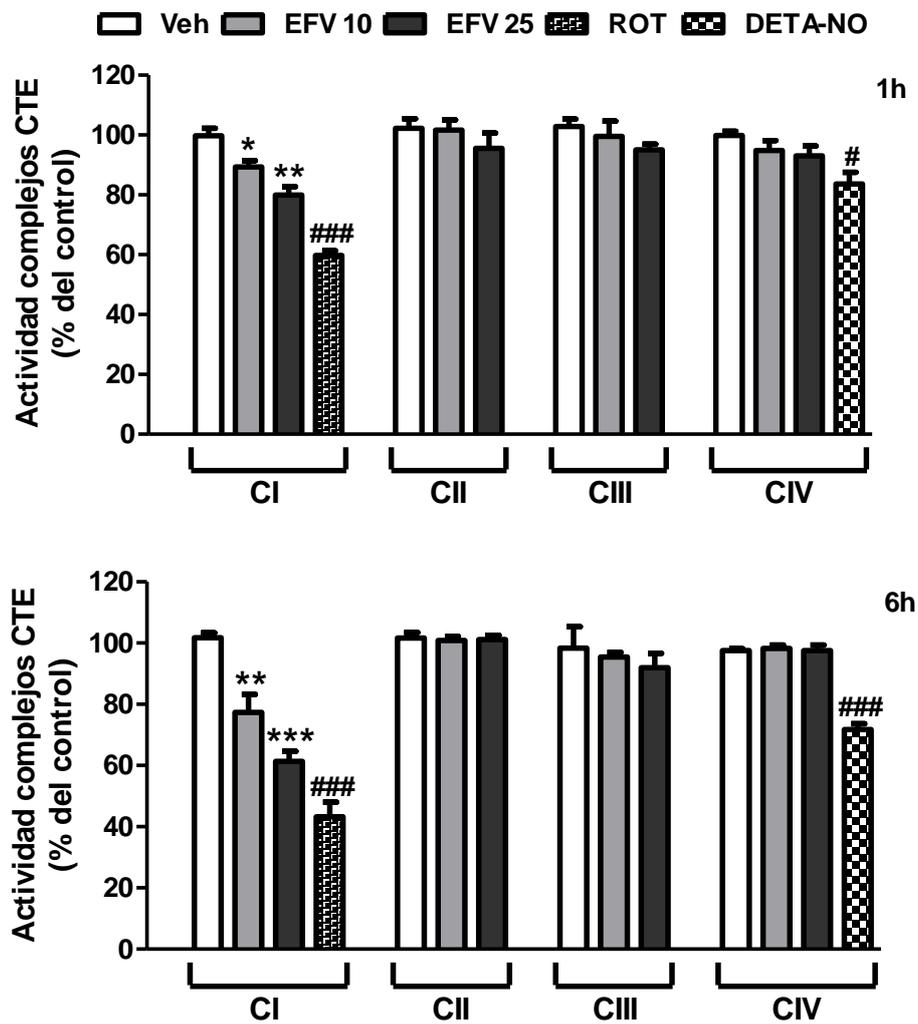


Figura IV.9. Impacto de EFV sobre la actividad individual de los complejos de la CTE en neuronas. Células SH-SY5Y fueron expuestas a EFV (10 y 25  $\mu$ M) durante 1 o 6 h y la actividad de los complejos I-IV se analizó espectrofotométricamente. La ROT 10  $\mu$ M fue empleada como inhibidor específico del CI y DETA-NO 0,3 mM fue utilizado como inhibidor del CIV. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (test de Newman-Keuls), \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo. Los datos de ROT y DETA-NO fueron analizados individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar, #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,01$ .

### 1.7. Determinación de la función mitocondrial con el analizador de flujo extracelular XF24

Con el propósito de caracterizar como EFV interfiere en la función mitocondrial de las células SH-SY5Y y U-251MG, se evaluó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (Figura IV.10.), utilizando el analizador de flujo extracelular XF24. Esta técnica permite realizar a tiempo real la evaluación de parámetros fundamentales de la función mitocondrial, como: la respiración mitocondrial, la respiración ligada a la producción de ATP, la fuga de protones, la capacidad respiratoria de reserva, la capacidad máxima respiratoria y la respiración no-mitocondrial.

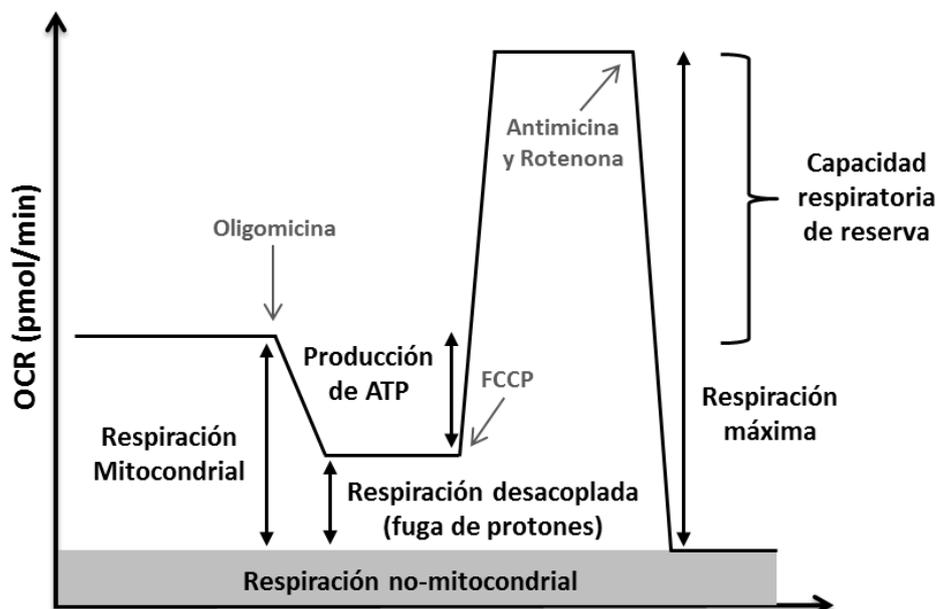


Figura IV.10. Esquema del perfil bioenergético utilizado para evaluar el efecto agudo de EFV sobre la función mitocondrial.

En este experimento se evaluó el OCR de las células intactas tratadas con EFV bajo condiciones basales y también se evaluó la capacidad respiratoria sobre la interferencia farmacológica de la CTE. La respiración basal de las células consiste de la respiración mitocondrial y la no-mitocondrial. La respiración mitocondrial es la componente de la basal que es sensible a la combinación de los inhibidores de la CTE. Estos experimentos revelaron que las células expuestas a EFV (1 h) muestran una clara y estadísticamente significativa disminución en la respiración basal y mitocondrial, un efecto observado en ambos tipos celulares, siendo más marcado el efecto de EFV sobre las células U-251MG (Figura IV.12B.).

La respiración mitocondrial es la suma de la respiración que se utiliza para la síntesis de ATP y la fuga de protones. Para evaluar el componente de la respiración que resulta de la síntesis de ATP, se añadió un inhibidor de la síntesis de ATP, oligomicina. Diferencias estadísticamente significativas en la respiración utilizada para la síntesis de ATP fueron observadas, debido a una disminución dependiente de la concentración, en ambas líneas celulares, mostrándose un menor descenso en las células SH-SY5Y tratadas con EFV 10  $\mu\text{M}$  (Figuras IV.11B y 12B.). La respiración mitocondrial que es insensible a oligomicina resulta de la fuga de protones. No hubo cambios significativos en la fuga de protones en los dos tipos celulares después de incubarlos con EFV (Figura IV.11B y 12B.). La capacidad respiratoria máxima es la suma de (a) la respiración que se produce después de la adición secuencial de oligomicina y FCCP y (b) la respiración que se traduce en la fuga de protones. Al medir la capacidad respiratoria máxima se observó que esta no sufre ningún cambio con EFV 10  $\mu\text{M}$  en las células SH-SY5Y y que solo EFV 25  $\mu\text{M}$  tiene la capacidad de disminuirla en comparación con el vehículo (Figura IV.11B.). En cambio, EFV disminuye la respiración máxima de forma concentración-dependiente en las células U-251MG (Figura IV.12B.). La capacidad respiratoria de reserva se determinó mediante la medición de la máxima respiración desacoplada obtenida con la adición de FCCP, un protonoforo que desacopla el transporte de electrones de la síntesis de ATP. Al determinar la capacidad de reserva en las células SH-SY5Y, se observó que solo la mayor concentración de EFV (25  $\mu\text{M}$ ) fue capaz de disminuirla (Figura IV.11B.), sin embargo, EFV a ambas concentraciones tiene la facultad de disminuir la capacidad de reserva en las células U-251MG (Figura IV.12B.). La respiración no-mitocondrial es la insensible a la combinación de oligomicina, rotenona y antimicina. La respiración no-mitocondrial demostró una disminución dependiente de la concentración en las células SH-SY5Y (Figura IV.11B.), mismo efecto fue mostrado aunque con mayor diferencia por las células U-251MG (Figura IV.12B.)

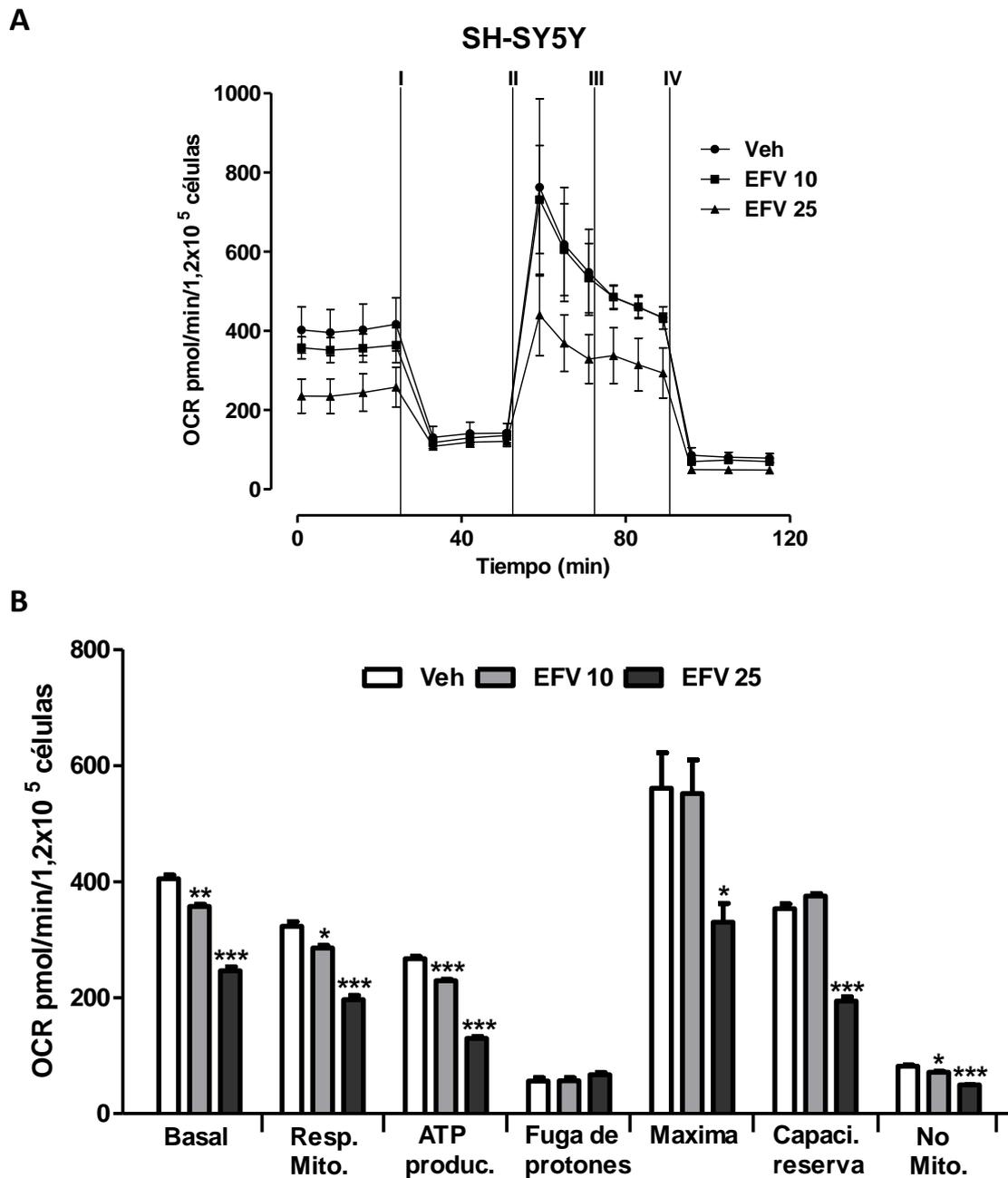
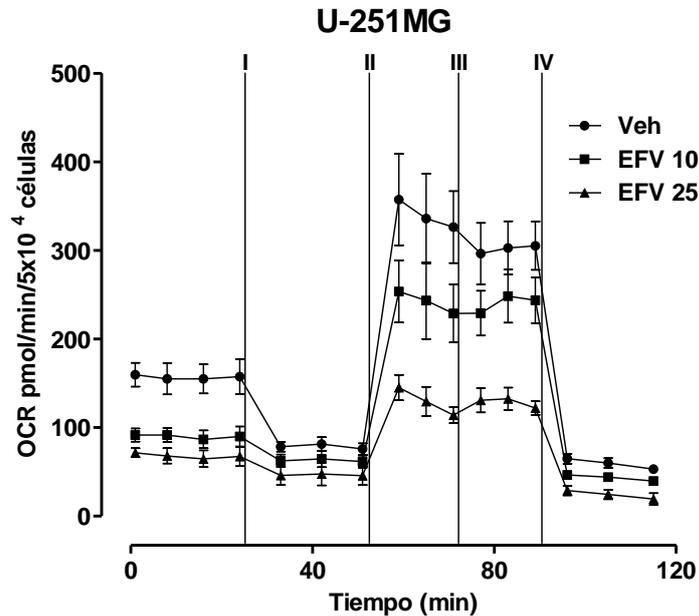


Figura IV.11. Efecto del tratamiento con EFV sobre la función mitocondrial en las neuronas diferenciadas. Se (A) determinó y (B) cuantificó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en las células SH-SY5Y expuestas a EFV (10 y 25  $\mu$ M) durante 1 h. Adiciones secuenciales de los inhibidores de la CTE se indican con flechas: (I) oligomicina 2  $\mu$ M, (II) FCCP 0,6  $\mu$ M, (III) FCCP 0,4  $\mu$ M, (IV) ROT 1  $\mu$ M + antimicina A 1  $\mu$ M. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=3) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

A



B

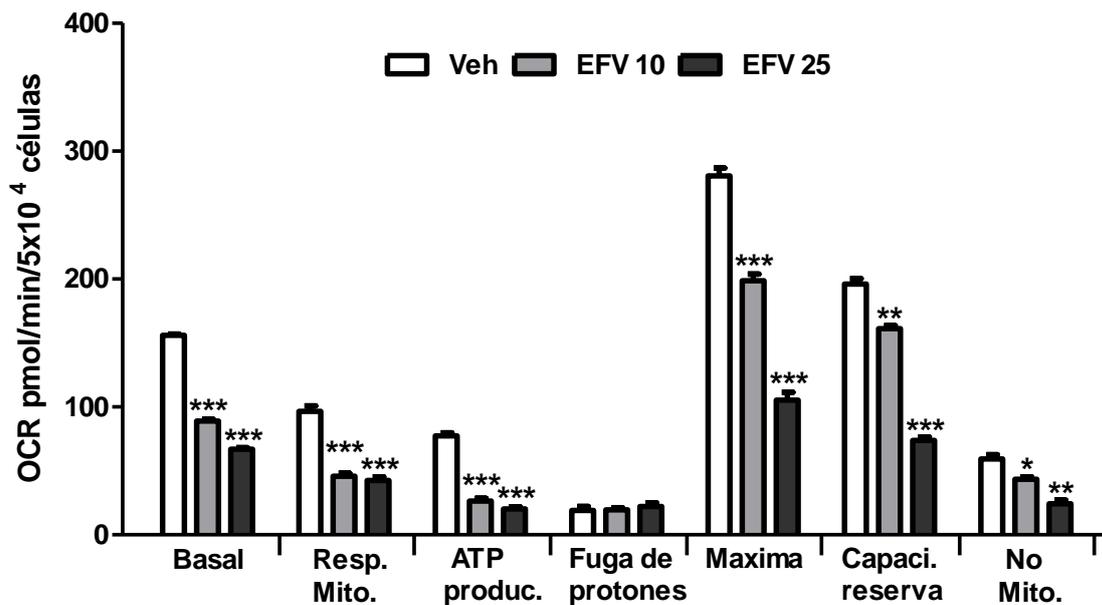


Figura IV.12. Efecto del tratamiento con EFV sobre la función mitocondrial en las células gliales. Se (A) determinó y (B) cuantificó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en las células U-251MG expuestas a EFV (10 y 25  $\mu$ M) durante 1 h. Adiciones secuenciales de los inhibidores de la CTE se indican con flechas: (I) oligomicina 2  $\mu$ M, (II) FCCP 0,6  $\mu$ M, (III) FCCP 0,4  $\mu$ M, (IV) ROT 1  $\mu$ M + antimicina A 1  $\mu$ M. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=3) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

Además, con el propósito de entender de una manera más clara el efecto que EFV ejerce sobre la mitocondria de las líneas celulares en estudio, estos mismos parámetros de la función mitocondrial evaluados como OCR, también fueron representados como % respecto a la respiración basal (Tabla IV.1.).

Líneas celulares	U-251MG			SH-SY5Y		
	Veh	EFV 10	EFV 25	Veh	EFV 10	EFV 25
Respiración mitocondrial (% basal)	61,9±2,5	51,4±2,0*	63,7±4,4	79,8±1,1	80,0±0,6	79,9±0,9
Producción de ATP (% basal)	49,6±1,4	29,6±1,5**	30,3±1,7**	66,0±0,4	64,2±0,9	52,7±0,6***
Fuga de protones (% basal)	12,3±1,4	21,8±1,6*	33,4±3,8*	13,8±1,1	15,8±1,1	27,2±1,0**
Respiración No-mito (% basal)	38,1±1,2	48,6±1,0*	36,3±2,2	20,2±0,6	20,0±0,3	20,1±0,5

Tabla IV.1. Parámetros de la función mitocondrial de las células U-251MG y SH-SY5Y. Los datos están expresados como % respecto a la respiración basal (100%, respiración mitocondrial + respiración no-mitocondrial), y representados como media ± SEM, n=3. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student para comparar cada tratamiento de EFV con el vehículo. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

Se pudo observar que después de la incubación con EFV (1 h) la respiración mitocondrial en las células U-251MG fue ligeramente disminuida por EFV 10 µM, curiosamente con EFV 25 µM esta disminución no se observó (Tabla IV.1.). En las células SH-SY5Y la respiración mitocondrial no sufrió alteraciones. Al evaluar la respiración que compone a la respiración mitocondrial y que resulta en la síntesis de ATP, se observó que en las células U-251MG tratadas con EFV 10 y 25 µM, ésta se redujo significativamente en un 20,0% y 19,3% respectivamente con respecto al vehículo después de adicionar la oligomicina. En cambio en las células SH-SY5Y, solamente EFV 25 µM fue capaz de disminuir significativamente la respiración ligada a la síntesis de ATP en un 13,3% con respecto al vehículo (Tabla IV.1.). Al

analizar la fuga de protones que resulta de la respiración mitocondrial que es insensible a oligomicina, se observó un incremento concentración-dependiente y significativo en las células U-251MG tratadas con EFV 10 y 25  $\mu\text{M}$  (9,5% y 21,1% respectivamente, respecto al vehículo), asimismo, un incremento en la fuga de protones en las células SH-SY5Y, siendo más marcado el producido por EFV 25  $\mu\text{M}$  (13,4%) con respecto al vehículo (Tabla IV.1.). La respiración no-mitocondrial que es insensible a la combinación de los inhibidores de la CTE utilizados, demostró que EFV 10  $\mu\text{M}$  produce un incremento significativo en la respiración no-mitocondrial de las células U-251MG, sin embargo EFV no genera cambios en la respiración no-mitocondrial de las células SH-SY5Y (Tabla IV.1.).

También se quiso observar el comportamiento de EFV en parámetros como la capacidad respiratoria de reserva y la capacidad respiratoria máxima, representando los datos como % respecto a la respiración basal. Los resultados obtenidos respecto a la respiración basal, demostraron que la capacidad respiratoria de reserva y la capacidad respiratoria máxima, tanto en las células U-251MG como en las células SH-SY5Y, se ven incrementadas solamente por EFV 10  $\mu\text{M}$ , siendo este incremento en ambos parámetros más destacado en las células U-251MG (Figura IV.13.).

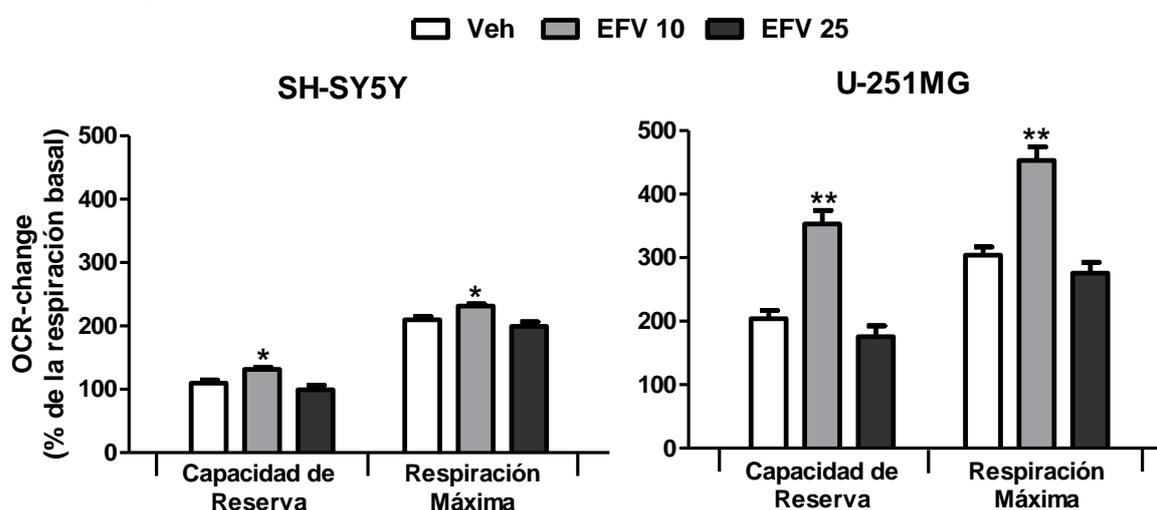


Figura IV.13. Capacidad respiratoria de reserva y capacidad respiratoria máxima. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en las células SH-SY5Y y U-251MG expuestas a EFV (10 y 25 $\mu\text{M}$ ) durante 1 h. Los datos están expresados como % respecto a la respiración basal y representados como media  $\pm$  SEM, n=3. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,001; respecto al vehículo.

### 1.8. Efecto de EFV en co-cultivos de células gliales - neuronas

Con el propósito de observar si en un modelo de interacción entre las células gliales y las neuronas en presencia de EFV, las células gliales podrían interferir en la alteración de la función mitocondrial de las neuronas, respecto a la generada por EFV en las neuronas cultivadas solas, se optó por realizar la técnica del co-cultivo. De acuerdo con ello, se evaluó el efecto del tratamiento de EFV sobre tres parámetros representativos de mitotoxicidad: la producción de superóxido mitocondrial, el  $\Delta\psi_m$  y el número de células, en las neuronas. Para esto, las neuronas se incubaron con EFV en presencia o ausencia de células gliales que a su vez fueron tratadas con EFV durante 24 h. En las neuronas co-cultivadas con células gliales (ambos tipos celulares tratados con EFV), no se observaron cambios en el incremento de la producción de superóxido mitocondrial (Figura IV.14A.) ni en el descenso en el  $\Delta\psi_m$  (Figura IV.14B.) con respecto al efecto producido por EFV en las neuronas cultivadas solas. Así mismo, no hubo cambios en el número de células de las neuronas co-cultivadas con células gliales en presencia de EFV (Figura IV.14C.). Cabe resaltar, que con ambas concentraciones de EFV se observó una ligera mejora aunque no significativa en el  $\Delta\psi_m$  de las neuronas que fueron co-cultivadas por 24 h en presencia de células gliales. Estos resultados sugieren que las células gliales no influyen en la respuesta de las neuronas al tratamiento con EFV, ya que, en la producción de superóxido mitocondrial y en el número de células no se produjeron cambios relevantes, con la excepción del  $\Delta\psi_m$  donde se pudo observar una ligera mejora.

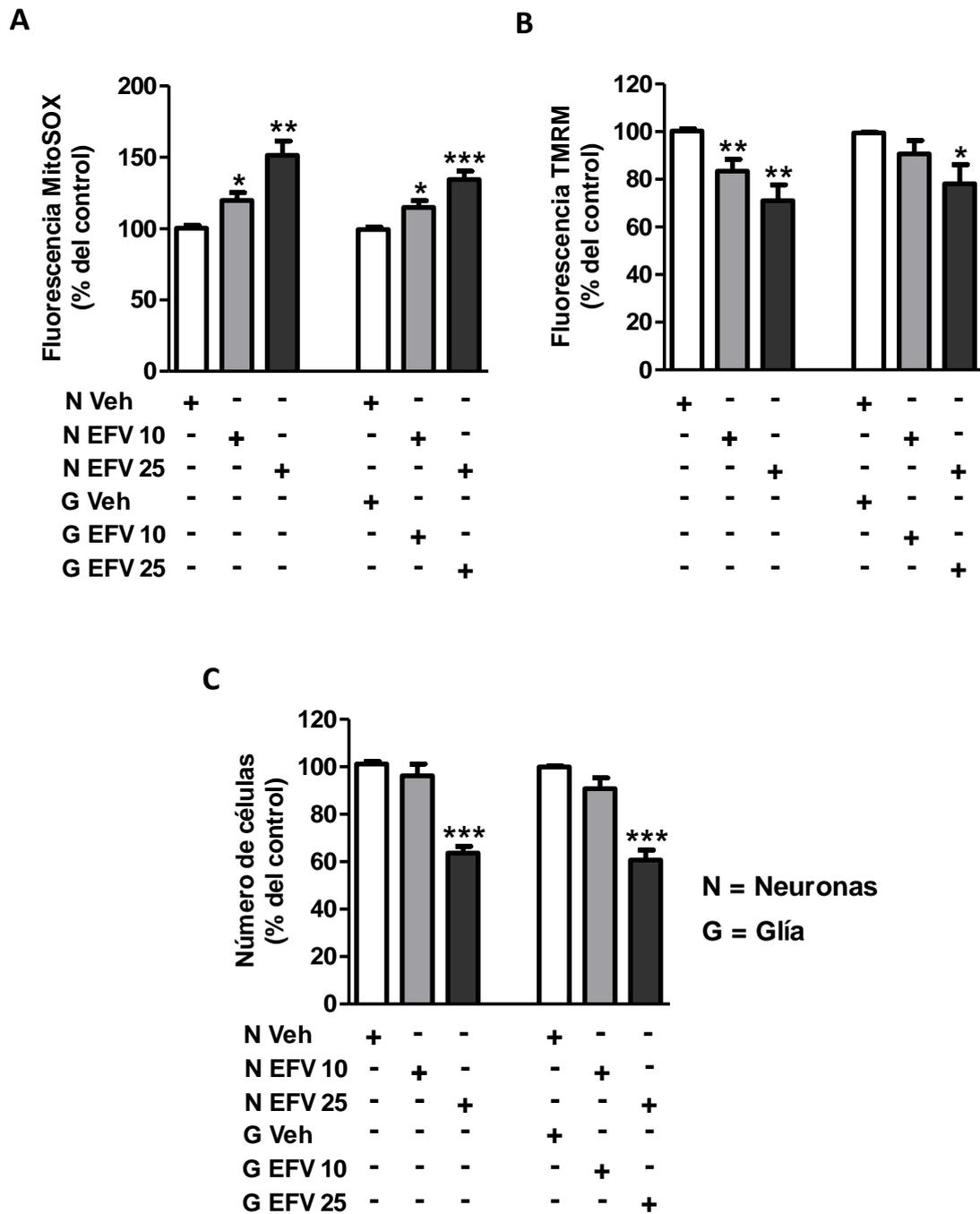


Figura IV.14. Co-cultivo de células gliales - neuronas en presencia de EFV (24 h). Los histogramas representan (A) producción de superóxido mitocondrial, (B)  $\Delta\psi_m$  y (C) el recuento de células, parámetros determinados por fluorescencia y citometría estática. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4-8) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) de cada condición y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

### 1.9. Análisis de los efectos de darunavir, rilpivirina y raltegravir sobre la función mitocondrial y viabilidad celular en neuronas

La excelencia de EFV ha sido cuestionada por la llegada de los nuevos antirretrovirales, tales como el IP darunavir (DRV), el ITINAN rilpivirina (RPV) y el raltegravir (RAL) un II. La pretensión principal de estos nuevos fármacos es obtener un perfil toxicológico más seguro mientras mantienen una eficacia y supresión virológica similar a las de EFV. Debido a que hemos descrito anteriormente que EFV induce toxicidad mitocondrial y compromete la viabilidad celular en neuronas, se quiso evaluar los efectos que estos nuevos antirretrovirales podrían provocar sobre la función mitocondrial (superóxido mitocondrial y  $\Delta\Psi_m$ ) y sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas corticales de rata. Para estas determinaciones se utilizaron un rango de concentraciones clínicamente relevantes en plasma de cada fármaco, y poder así obtener de una forma más amplia el grado de alteración que pueden causar en los diferentes parámetros a determinar. En todos los experimentos se utilizó a EFV (25  $\mu$ M) como control positivo.

Los resultados revelaron que la producción de superóxido mitocondrial no fue incrementada por ninguna de las concentraciones en que las neuronas fueron expuestas durante 24 h a DRV, RPV y RAL, en claro contraste con EFV (Figura IV.15A.) Además, la microscopía de fluorescencia mostró que a diferencia de EFV que produce una disminución significativa del  $\Delta\Psi_m$ , los valores de la fluorescencia media de TMRM fueron similares después de ser incubadas durante 24 h con DRV, RPV, RAL o su vehículo (DMSO) (Figura IV.15B.).

De la misma manera, los efectos diferenciales de los medicamentos antirretrovirales se correlacionaron con la viabilidad celular. Se observó que ninguno de los nuevos compuestos produjo cambios en la viabilidad celular de las neuronas primarias después de 24 h de exposición, mientras que una vez más EFV indujo una reducción significativa en este parámetro (Figura IV.16.).

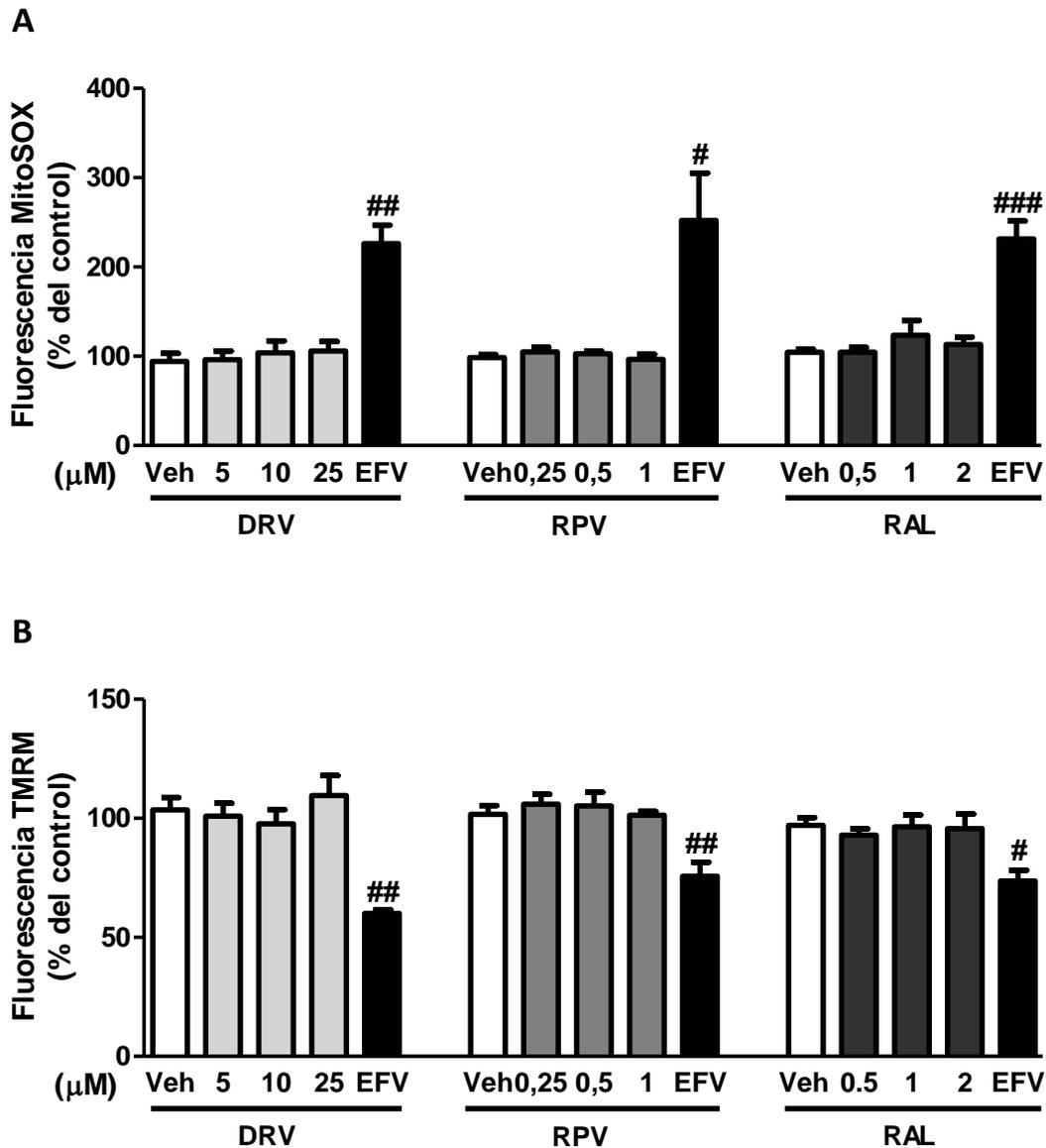


Figura IV.15. Efecto de darunavir (DRV), rilpivirina (RPV) y raltegravir (RAL) sobre la función mitocondrial de neuronas primarias de rata después de ser incubados durante 24 h. (A) Análisis cuantitativo de la producción de superóxido mitocondrial (fluorescencia media de MitoSOX). (B) Análisis cuantitativo del  $\Delta\psi_m$  (fluorescencia media TMRM). Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto al valor de las células sin tratar (considerado 100%) y se analizaron mediante un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls). El control positivo (EFV) se analizó de forma independiente con la prueba t de Student frente a su propio vehículo (metanol).

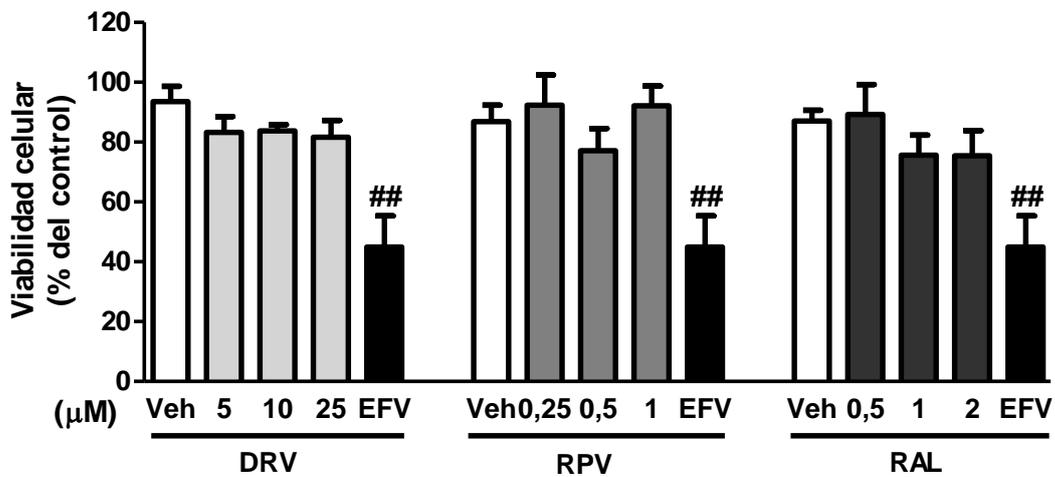


Figura IV.16. Efecto de darunavir (DRV), rilpivirina (RPV) y raltegravir (RAL) sobre la viabilidad celular de neuronas primarias de rata. (A) Absorbancia relativa del ensayo de MTT después de 24 h de incubación en presencia de los diferentes compuestos antirretrovirales. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto al valor de las células sin tratar (considerado 100%) y se analizaron mediante un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls). El control positivo (EFV) se analizó de forma independiente con la prueba t de Student frente a su propio vehículo (metanol).

## **BLOQUE 2: DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE LA BIOENERGÉTICA EN NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES**

## 2. EFAVIRENZ AFECTA A LA BIOENERGÉTICA DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES DE MANERA DIFERENTE

### 2.1. Evaluación de la expresión proteica de AMPK-P

Después de haber confirmado que EFV compromete la función mitocondrial, exploramos su efecto sobre la bioenergética celular. Se sabe que la inhibición de la respiración mitocondrial promueve la activación de AMPK, un sensor importante del estrés energético celular (Hardie D.G., 2007), permitiendo así el restablecimiento del equilibrio energético celular. El análisis de la expresión de la forma fosforilada (activada) de la enzima realizado por Western Blot, mostró que la incubación por 6 h con EFV induce un incremento significativo y dependiente de la concentración en células gliales pero no en las neuronas (Figura IV.17.).

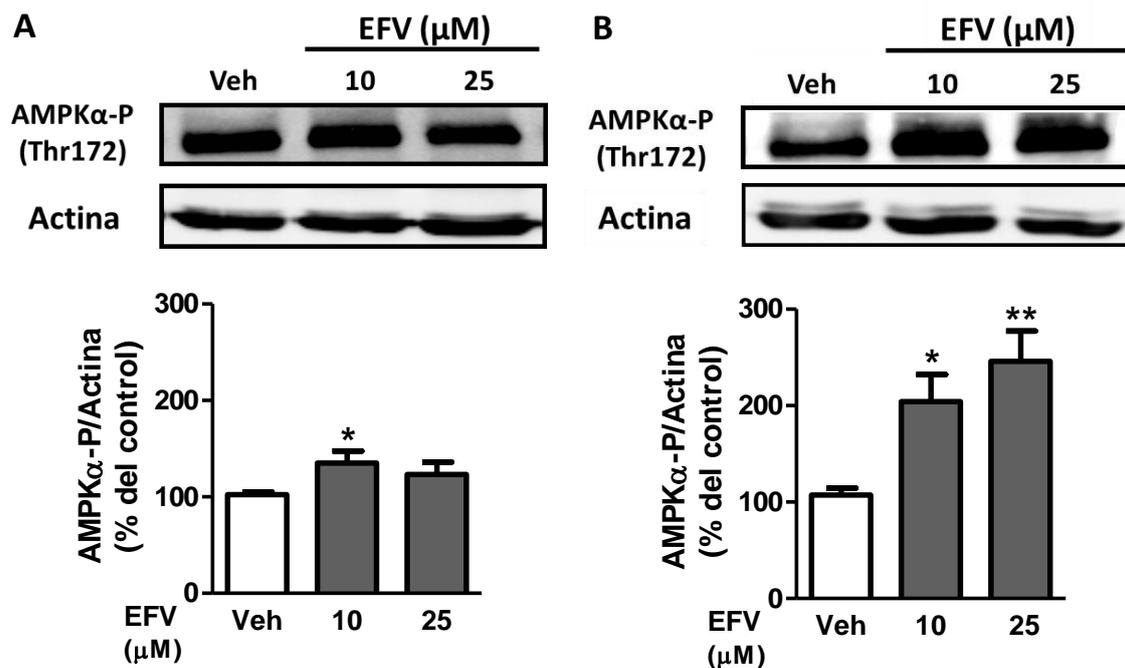


Figura IV.17. Análisis de la expresión de AMPK-P después de 6 h de tratamiento con EFV. Imágenes representativas de WB muestran la expresión de AMPK-P en células (A) SH-SY5Y y (B) U-251MG. Los histogramas representan el análisis densitométrico de las imágenes y fueron normalizados frente a la expresión de actina. Los resultados (media ± SEM, n=4-5) fueron relativizados respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto al vehículo.

## 2.2. Determinación de los niveles de ATP intracelular

Otro parámetro representativo del estatus bioenergético celular es el nivel de ATP intracelular. Su determinación se realizó usando un ensayo de bioluminiscencia y los valores obtenidos se normalizaron con la cantidad de proteína obtenida en los lisados celulares. Cuando la incubación con EFV se prolongó durante un período de 24 h, EFV indujo un aumento significativo y dependiente de la concentración en los niveles de ATP en las células gliales, pero no en las neuronas diferenciadas (Figura IV.18A.)

Este análisis se reprodujo también en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata, en los que también se observó un incremento en los niveles de ATP en astrocitos y una disminución concentración dependiente en las neuronas (Figura IV.18B.).

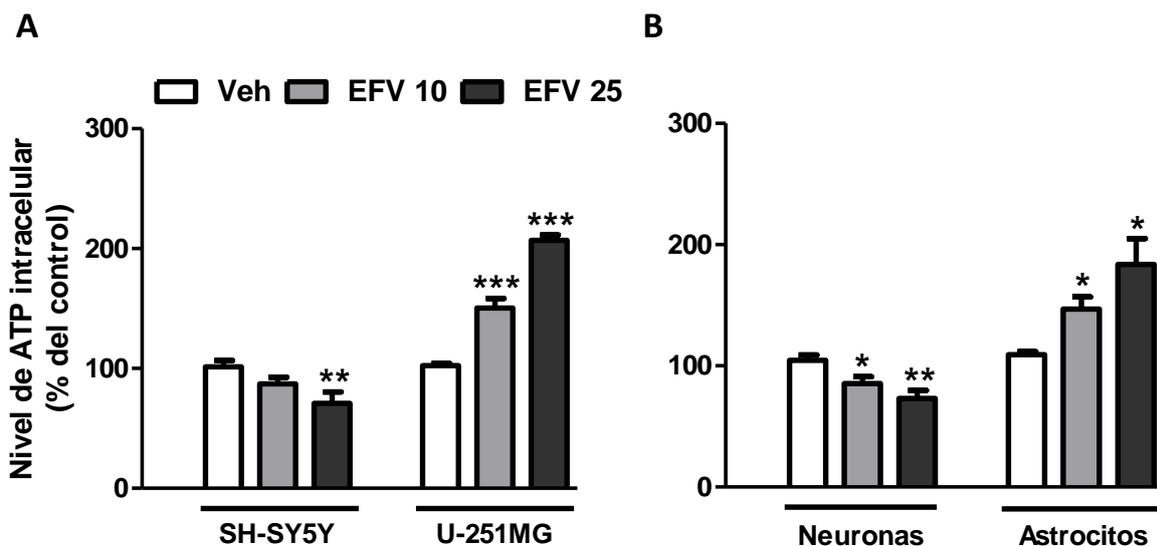


Figura IV.18. Determinación de la concentración de ATP intracelular tras el tratamiento con EFV durante 24 h. Los histogramas muestran los niveles de ATP intracelular en (A) líneas celulares de neuronas diferenciadas y células gliales y (B) cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

### 2.3. Análisis de la producción de lactato extracelular

Se sabe que los astrocitos están protegidos de la inhibición mitocondrial por la rápida regulación de la AMPK mediando la activación de la glucólisis (Bolaños J.P. *et al.*, 2010). Habiendo mostrado en nuestro estudio que las células gliales (U-251MG y astrocitos de rata) registraron un aumento en la expresión de la AMPK y un incremento de la producción de ATP después de sufrir una disfunción mitocondrial tras ser expuestas a EFV, se quiso observar si la activación de la glucólisis era la responsable de generar tales respuestas. Esta posibilidad fue estudiada mediante la determinación del lactato en el medio extracelular después de ser incubadas durante 24 h con EFV. Los resultados revelaron un aumento importante y dependiente de la concentración en las células U-251MG, mientras que, una ausencia de cambios fueron observados en las neuronas. Esta observación se confirmó adicionalmente mediante el análisis de la producción de lactato cuando las células fueron expuestas a medio libre de glucosa o en un medio donde la glucosa había sido sustituida por galactosa (Figura IV.19.). En ambos casos, el aumento de la generación de lactato estuvo ausente, lo que apunta a la activación de la glucólisis como la causa de este efecto.

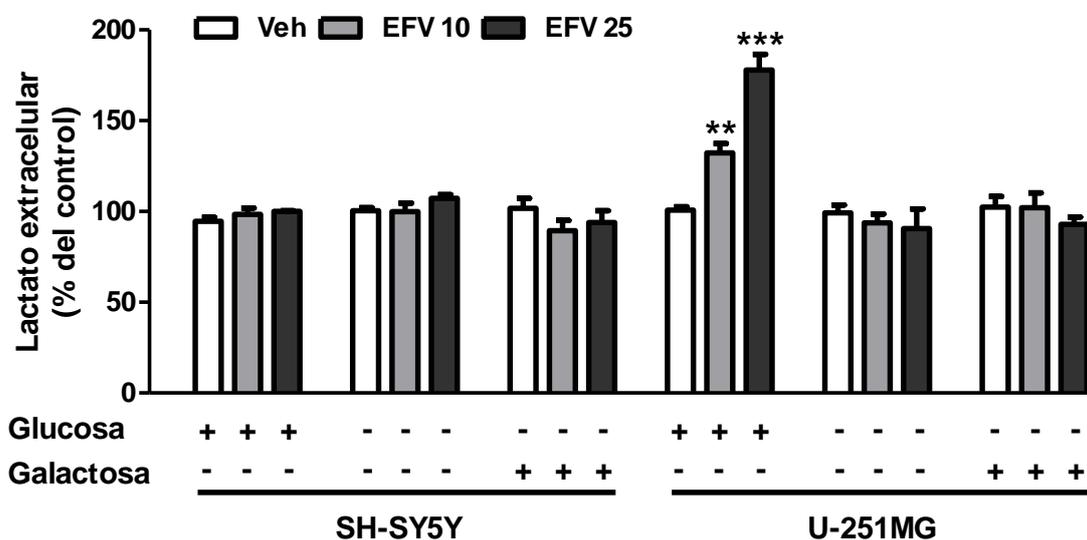


Figura IV.19. Determinación de la concentración de lactato en el medio extracelular después de la exposición a EFV durante 24 h. El histograma muestra la concentración de lactato en el medio extracelular de las líneas celulares de neuronas diferenciadas y células gliales. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

Es importante destacar que, los cambios en los niveles de uno de los principales metabolitos de la bioenergética como lo es la producción de lactato, inducidos por EFV fueron también observados en cultivos primarios de rata. Si bien las neuronas no muestran cambios, los astrocitos manifiestan un aumento importante y dependiente de la concentración en este parámetro (Figura IV.20.).

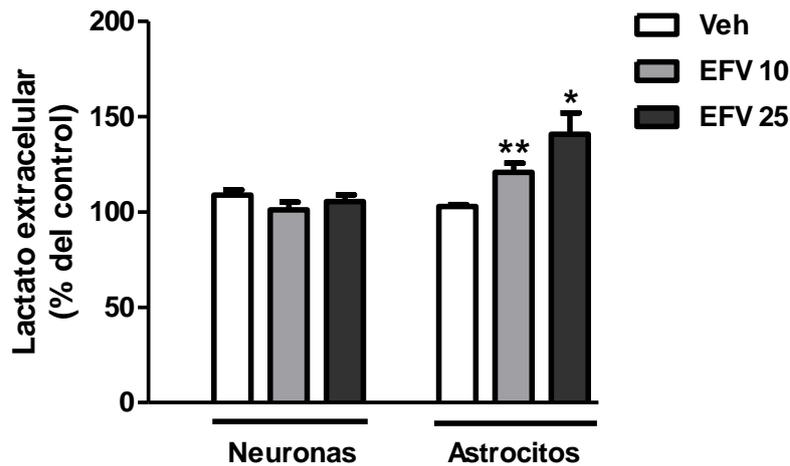


Figura IV.20. Determinación de la concentración de lactato en el medio extracelular después de la exposición a EFV durante 24 h. El histograma muestra la concentración de lactato en el medio extracelular de cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de rata. Los resultados (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto al vehículo.

Con el propósito de observar si el incremento de la expresión de la AMPK estaba vinculado con la activación de la glucólisis, la concentración de lactato en el medio extracelular fue determinada en las células gliales que se co-incubaron con compuesto C (CC), un inhibidor de la AMPK. Los resultados mostraron una disminución concentración-dependiente en los niveles de lactato inducidos por EFV (10 y 25  $\mu$ M), cuando el medio contenía CC (20  $\mu$ M), bloqueando así la activación de la glucólisis mediada por la expresión de la AMPK. Dicha disminución fue observada después de 6 y 24 h de co-incubación con el CC (Figura IV.21A, B.).

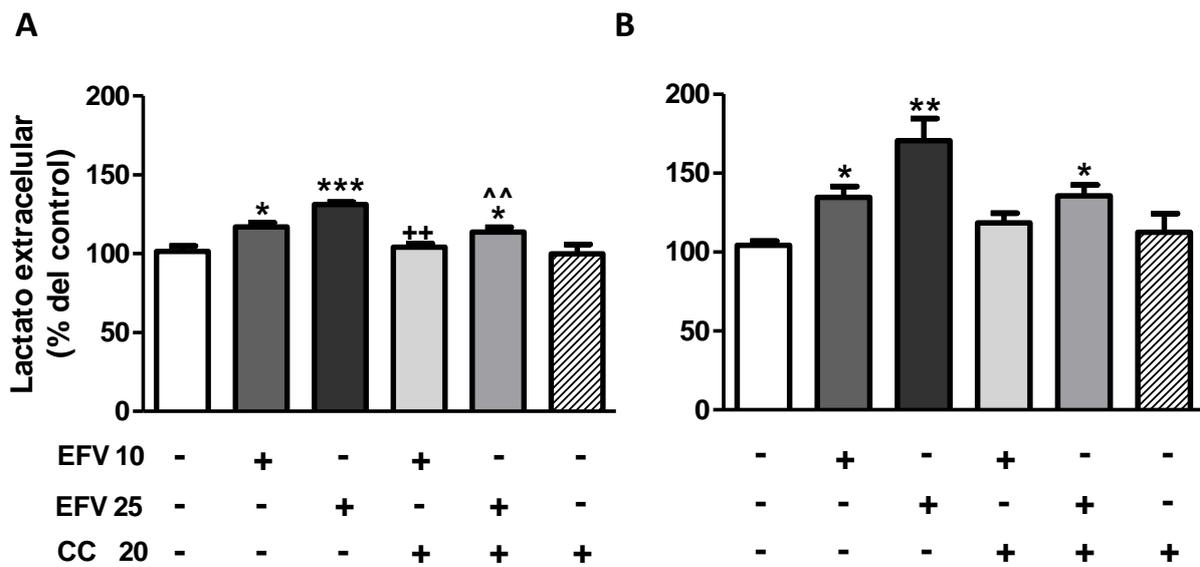


Figura IV.21. Determinación de lactato en el medio extracelular de las células U-251MG co-tratadas con el inhibidor de la AMPK, compuesto C (CC 20  $\mu$ M) por 6 (A) y 24 h (B). Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a los datos obtenidos en las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo. En el caso del co-tratamiento con CC, el análisis estadístico se realizó para los tratamientos individuales con EFV y EFV + CC (t Student; ++ $p < 0,01$  para EFV 10  $\mu$ M respecto a EFV 10  $\mu$ M + CC y ^^ $p < 0,01$  para EFV 25  $\mu$ M respecto a EFV 25  $\mu$ M + CC).

### **BLOQUE 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE EFAVIRENZ SOBRE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES BAJO LA PRESENCIA DE UN ESTÍMULO PRO-INFLAMATORIO**

### 3. LOS EFECTOS DE EFV SE EXACERBAN EN PRESENCIA DE UN ESTÍMULO PRO-INFLAMATORIO

Con el fin de analizar si la presencia de un medio en que la mitocondria se encuentre comprometida y/o la existencia de un estado pro-inflamatorio en el cerebro exagera los efectos de EFV en la función mitocondrial y la bioenergética celular, se añadió NO exógeno (mediante la adición de DETA-NO) al cultivo celular.

#### 3.1. Análisis del consumo de oxígeno

Se evaluó el consumo de O<sub>2</sub> (electrodo de O<sub>2</sub>) y se observó, de acuerdo con los datos publicados (Almeida A. *et al.*, 2001), que el NO (DETA-NO) socava la respiración mitocondrial en ambas líneas celulares siendo este efecto más pronunciado en las neuronas diferenciadas. Los resultados además mostraron un mayor efecto de inhibición en el consumo de O<sub>2</sub> cuando EFV (10 μM) estuvo también presente en la suspensión celular en ambos tipos celulares, con respecto a la inhibición generado por EFV o DETA-NO de forma individual (Figura IV.22.).

#### 3.2. Producción de ion superóxido mitocondrial y $\Delta\psi_m$

El efecto acumulativo de EFV y NO también se mostró en estos dos parámetros de la función mitocondrial ya evaluados. DETA-NO por sí mismo produjo un aumento del superóxido mitocondrial en ambas líneas celulares, un efecto que se potenció cuando estaba presente EFV 10 μM (Figura IV.23A.). Por el contrario, a diferencia de EFV, y acorde a la bibliografía (Almeida A. *et al.*, 2001) DETA-NO no produjo una caída del  $\Delta\psi_m$  en ambas líneas celulares, sino que sólo en las neuronas, mientras que un aumento fue observado en las células gliales. Es de destacar que el efecto de disminución de  $\Delta\psi_m$  tras un tratamiento con EFV fue más representativo aun en presencia de DETA-NO y esto se observó tanto en neuronas, así como en las células gliales (Figura IV.23B.)

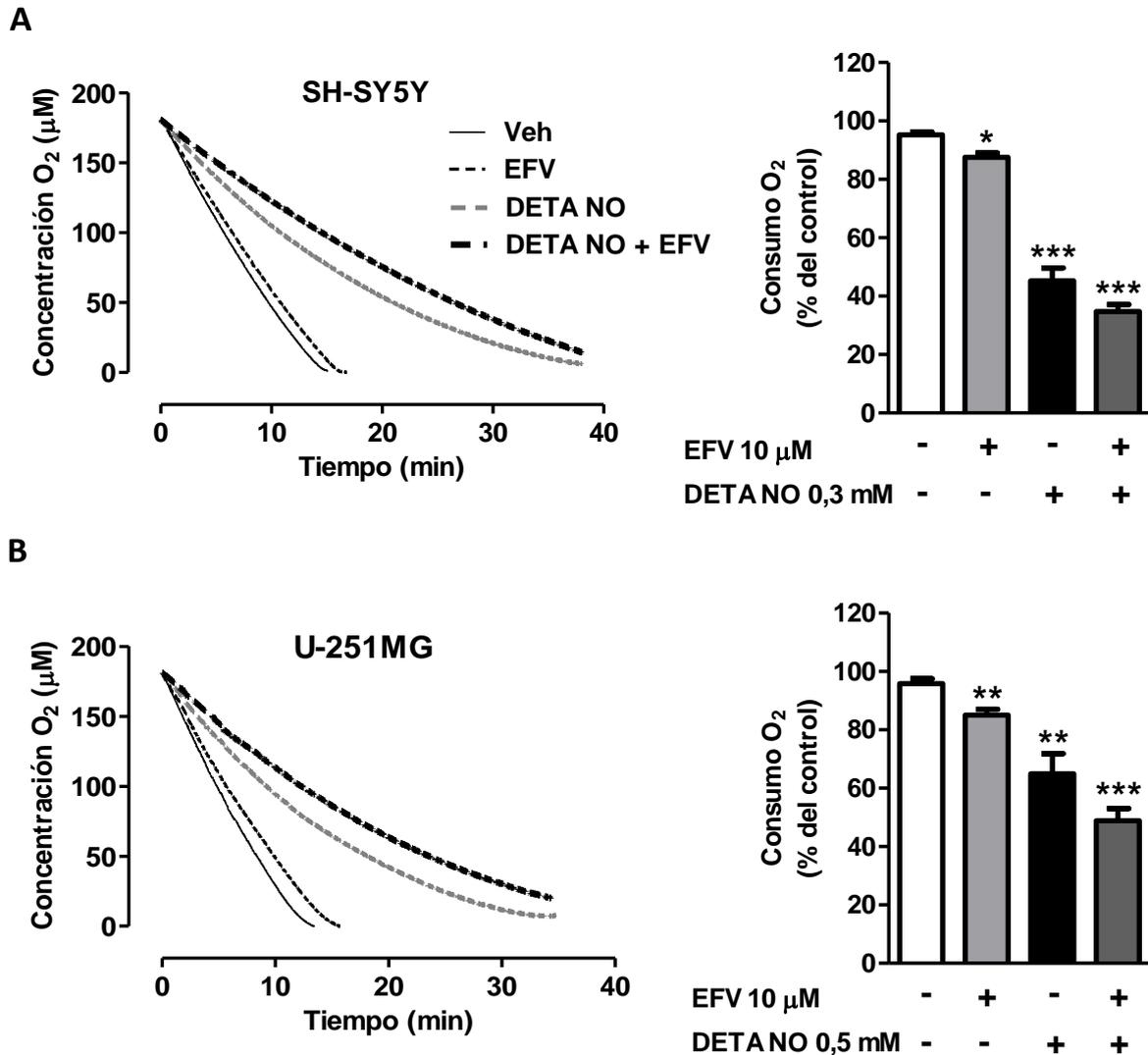


Figura IV.22. Efecto de EFV sobre el consumo de O<sub>2</sub> en células intactas (A) SH-SY5Y y (B) U-251MG en presencia de óxido nítrico exógeno. Los histogramas representan los datos obtenidos en ausencia (vehículo) y en presencia de EFV 10 µM o DETA-NO (0,3 mM en neuronas y 0,5 mM en células gliales) o del co-tratamiento de DETA-NO y EFV. Los datos (media ± SEM, n=3-4) se relativizaron frente a los obtenidos en células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 respecto al vehículo.

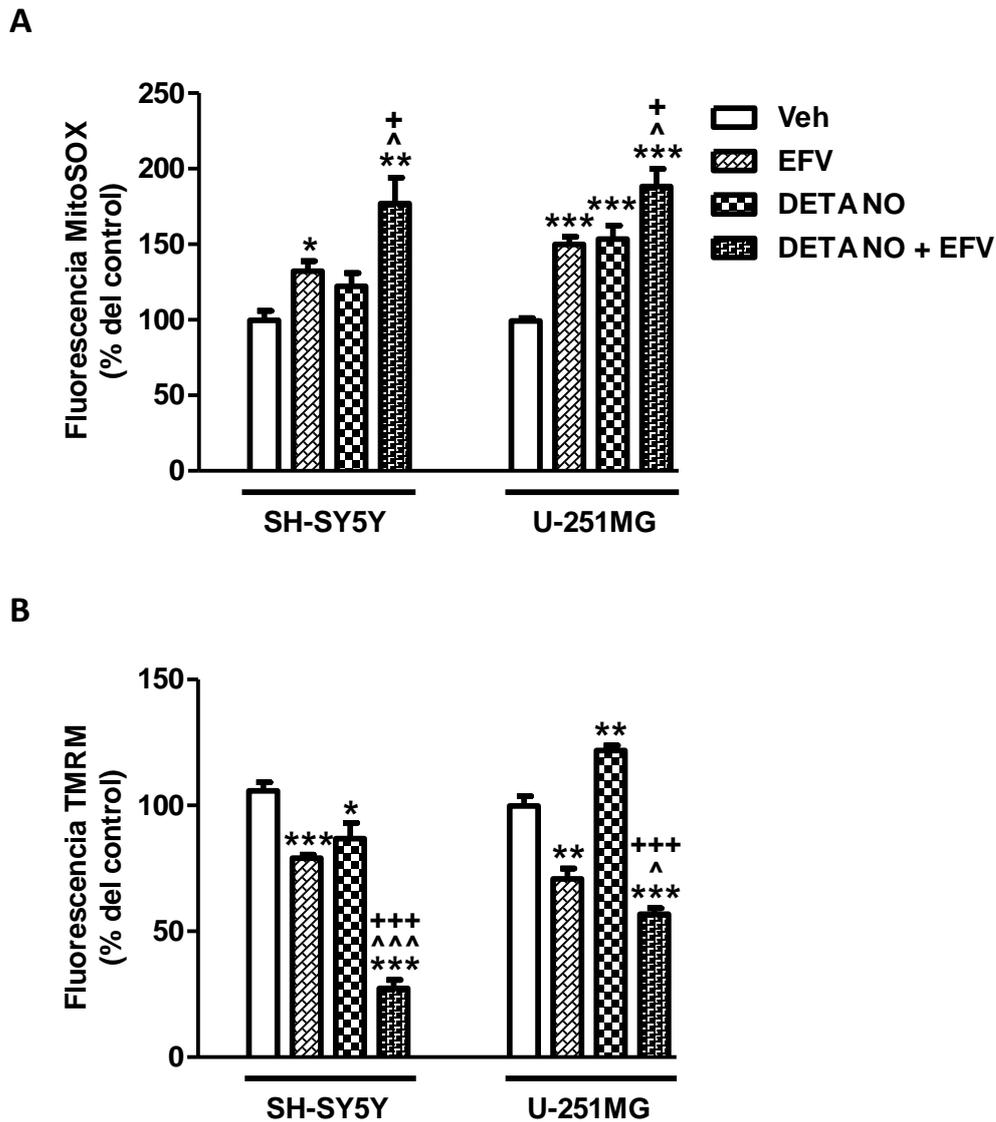


Figura IV.23. Efecto de EFV sobre (A) producción de superóxido y (B)  $\Delta\psi_m$  en células SH-SY5Y y U-251MG en presencia de óxido nítrico exógeno después de 24 h de tratamiento. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. ^p<0,05; ^^p<0,001 significatividad de datos obtenidos con EFV 10  $\mu$ M vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M. + p<0,05; +++ p<0,001 significatividad de los datos obtenidos con DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10 $\mu$ M.

### 3.3. Análisis de la activación de la glucólisis

Con respecto a la activación de la glucólisis, DETA-NO provocó un aumento en el ATP intracelular de las neuronas, pero no produjo cambios en las células gliales, sin embargo, se detectó un aumento en la generación de lactato en ambos casos. En particular, el efecto glucolítico de EFV 10  $\mu$ M exhibido sólo por las células gliales, se vio potenciado en la presencia del donante de NO exógeno, como se muestra en los dos parámetros evaluados: niveles de ATP y la producción de lactato (Figura IV.24.).

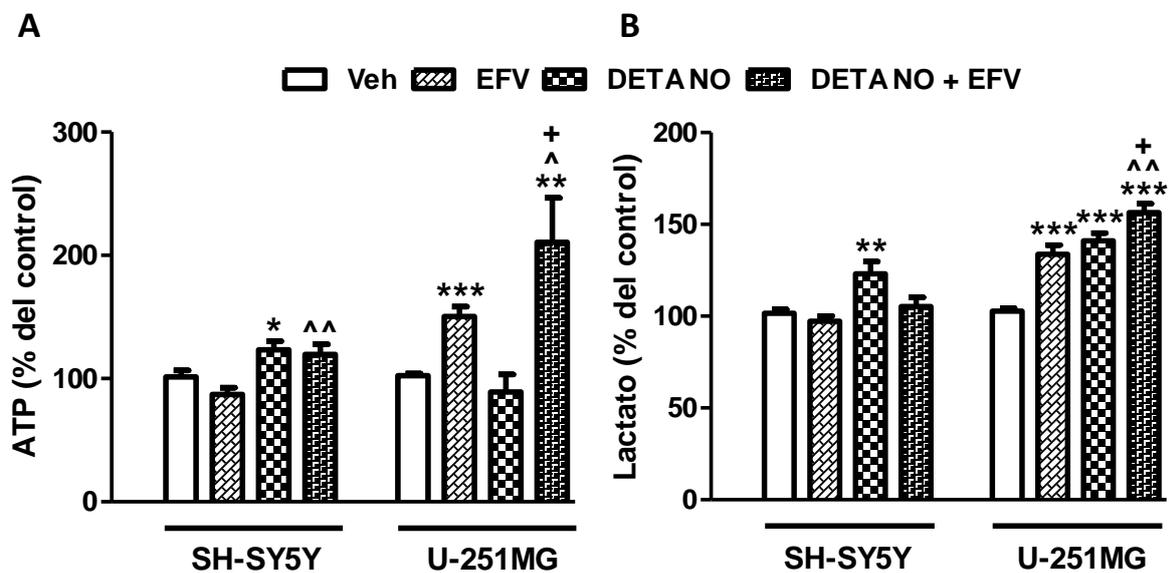


Figura IV.24. Efecto de EFV sobre la activación de la glucólisis en presencia de óxido nítrico exógeno después de 24 h de tratamiento. Niveles de ATP intracelular (A) y producción de lactato (B) en células SH-SY5Y y U-251MG. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=4-6) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo.  $\wedge p < 0,05$ ;  $\wedge\wedge p < 0,01$  significatividad de datos obtenidos con EFV 10  $\mu$ M vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M.  $\dagger p < 0,05$  significatividad de los datos obtenidos con DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M.

Cuando los cultivos de células primarias fueron tratados con EFV + DETA-NO, el efecto acumulativo en la bioenergética de las células gliales y neuronas fue reproducido con ligeras variaciones (Figura IV.25A, B.). DETA-NO potenció el efecto del incremento en los niveles de ATP y la producción de lactato en las células gliales generados por EFV 10  $\mu$ M. Sin embargo,

DETA-NO por sí solo produjo una caída significativa en el contenido de ATP en las neuronas primarias, que se potenció en presencia de EFV 10  $\mu$ M, mientras que no ejerció ningún efecto sobre la producción de lactato. Estas diferencias entre las respuestas de las células de neuroblastoma y neuronas primarias pueden ser debidas a las diferencias metabólicas intrínsecas que existen entre los dos tipos de células.

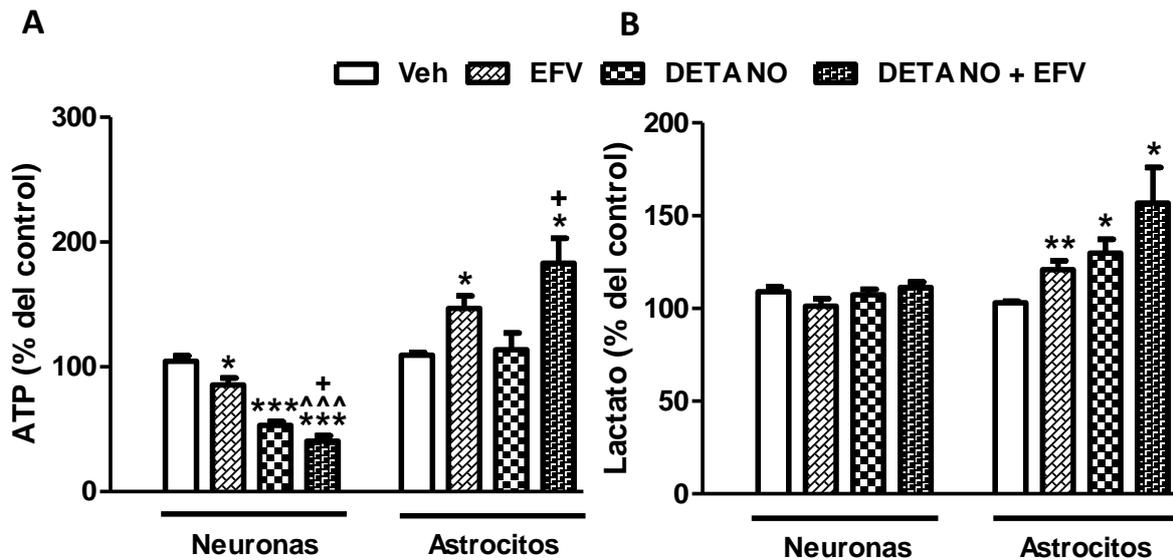


Figura IV.25. Efecto de EFV sobre la activación de la glucólisis en presencia de óxido nítrico exógeno después de 24 h. Niveles de ATP intracelular (A) y producción de lactato (B) en cultivo primario de neuronas y astrocitos de rata. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se expresaron en % frente a los datos obtenidos en células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. ^^p<0,001 significatividad de datos obtenidos con EFV 10  $\mu$ M vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M. + p<0,05 significatividad de datos obtenidos con DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M.

### 3.4. Análisis sobre el número de células

Por último, el objetivo fue evaluar si esta acción acumulativa de DETA-NO y EFV tuvo consecuencias en el número de células (Figura IV.26A, B.) El tratamiento con DETA-NO condujo a una disminución del número de células en ambas líneas inmortales y cultivos primarios de neuronas y células gliales, mostrando ser más pronunciada en el caso de las neuronas. EFV (10  $\mu$ M) solo provocó una leve reducción en el número de neuronas, un

efecto que fue mayor cuando fueron co-tratadas con NO exógeno. Es importante destacar que en las células gliales, el tratamiento combinado no agravó el efecto de DETA-NO.

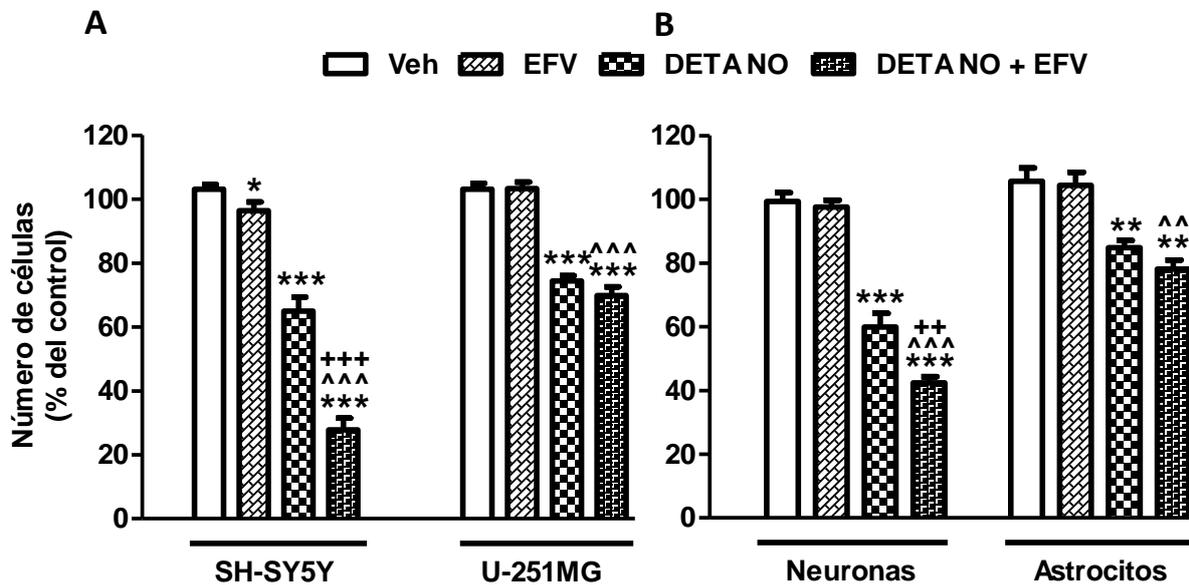


Figura IV.26. Efecto de EFV sobre el número de células en presencia de óxido nítrico exógeno después de 24 h de tratamiento. (A) Líneas celulares inmortales SH-SY5Y y U-251MG y (B) cultivo primario de neuronas y astrocitos de rata. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=6-8) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. ^^p<0,01; ^^p<0,001 significatividad de datos obtenidos con EFV 10  $\mu$ M vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M. ++ p<0,01; +++ p<0,001 significatividad de datos obtenidos con DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV 10  $\mu$ M.

En algunos de los experimentos (producción de superóxido y en el número de células), las neuronas diferenciadas y células gliales fueron co-incubadas con PTIO (25 y 50  $\mu$ M respectivamente), un eliminador de NO, con el fin de confirmar que los efectos de DETA-NO se deben a la liberación de NO (Goldstein S., *et al.*, 2003). Los resultados mostraron que PTIO revertió parcialmente, en ambos tipos celulares, los efectos producidos por el donante de NO y por el co-tratamiento DETA-NO + EFV 10  $\mu$ M después de 24 h de incubación. Sin embargo, PTIO por si solo es capaz de generar una leve disminución en el número de células

de ambos tipos celulares respecto a las células sin tratar, en cambio, la fluorescencia media de MitoSOX no sufrió alteraciones por la presencia de esta molécula (Figura IV.27.).

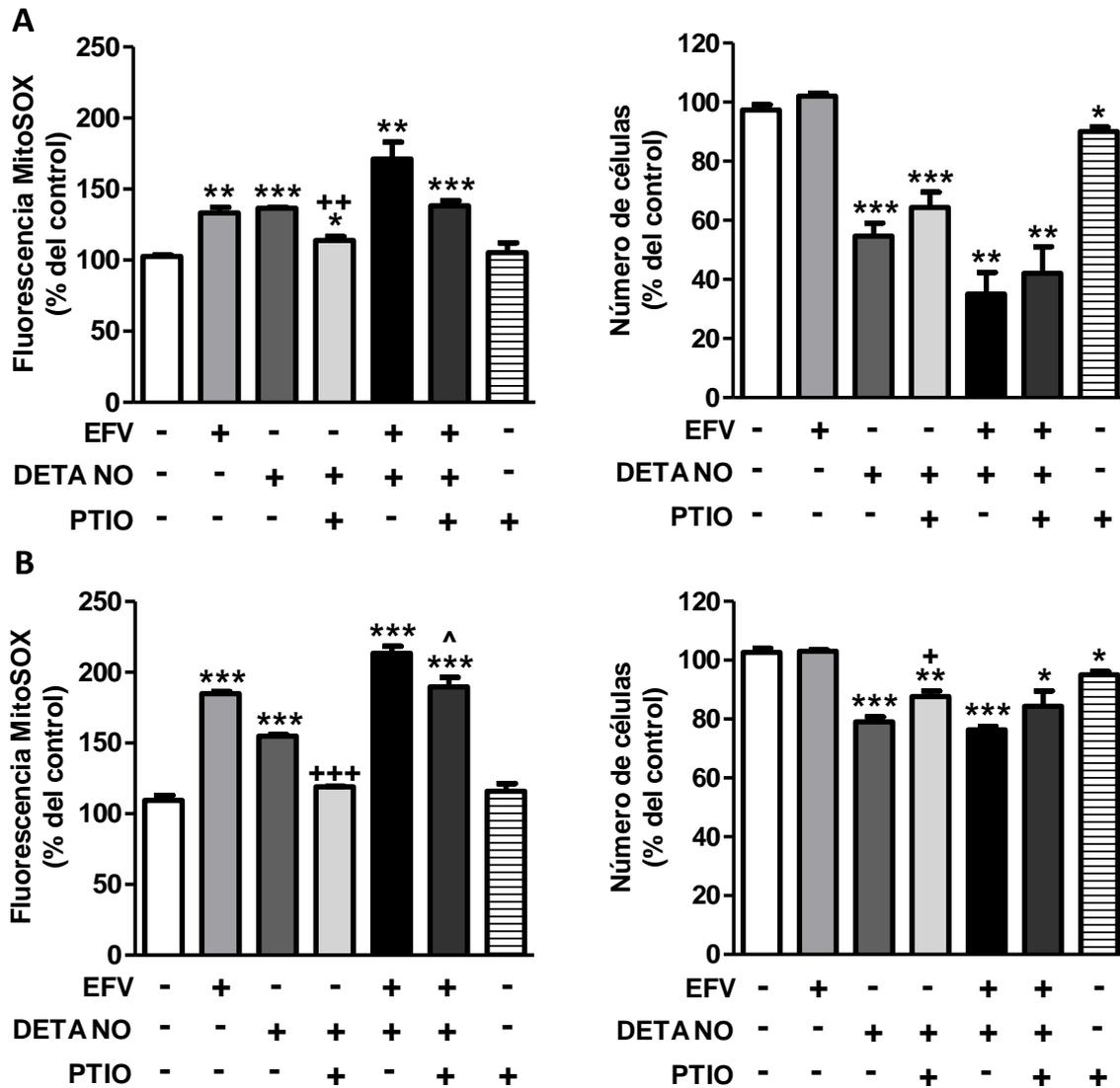


Figura IV.27. Efecto de PTIO (eliminador de NO) en la producción de superóxido mitocondrial y en el número de células. (A) Neuronas diferenciadas (SH-SY5Y) y (B) células gliales (U-251MG) fueron pre-incubadas (1 h) con PTIO (25 y 50  $\mu$ M respectivamente) antes de realizarse los tratamientos (24 h), el cual fue aplicado concomitantemente con DETA-NO o con la combinación DETA-NO + EFV. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001 significatividad de DETA-NO respecto a DETA-NO + PTIO y ^p<0,05 significatividad de DETA-NO + EFV 10  $\mu$ M respecto a DETA-NO + EFV 10  $\mu$ M + PTIO.

### 3.5. Análisis de la activación de la apoptosis

Para estudiar la inducción de apoptosis por EFV, DETA-NO y el co-tratamiento de EFV con DETA-NO, se realizó un análisis bivariado de Anexina V/IP de células SH-SY5Y diferenciadas a neuronas y de células gliales (U-251MG) después de ser incubadas por 24 h. El experimento se desarrolló 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 necrosis o células dañadas (Anexina V<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>). Los citogramas (Figura. IV.28A.) muestran un experimento representativo en el cual ambos tipos celulares tratados con EFV 10 μM presentan una población apoptótica, 8,9% en neuronas y un 25,45% en células gliales, en comparación con el 2,53% y 4,82% presentes respectivamente en el control negativo. Asimismo, DETA-NO también induce apoptosis en las neuronas (6,11%), si bien es cierto es una población menor a la producida por EFV. Es de interés que ésta se ve potenciada por el co-tratamiento con EFV, provocando un incremento en la población apoptótica en las neuronas (21,08%) respecto a la generada por cada uno de ellos. En las células gliales, la población apoptótica generada por DETA-NO (9,0%) sigue siendo menor a la producida por EFV, sin embargo, con el co-tratamiento con EFV se observa un incremento en la población apoptótica (22,15%) pero que no es mayor respecto a la generada solo por EFV.

Este análisis se reprodujo también en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata, en los que se observó (experimento representativo) un incremento de apoptosis en las neuronas (9,99%), pero no así en astrocitos (4,54%) tratados con DETA-NO en comparación con el 4,59% y 3,51% obtenidos en las células no tratadas de cada una de las poblaciones respectivamente. Además, EFV solo fue capaz de inducir apoptosis en las neuronas (7,95%), efecto que no ocurrió en astrocitos (3,72%) como se puede observar en los citogramas (Figura IV.29A.). Es importante mencionar, que el co-tratamiento de DETA-NO con EFV incrementa de manera significativa la población apoptótica en neuronas (12,26%), no así la de astrocitos (5,13%) con respecto a las células apoptóticas producidas por DETA-NO. Para este experimento se utilizaron células tratadas con el inhibidor de la proteína quinasa estaurosporina (STS) (0,05 – 0,5 μM) como control positivo de apoptosis.

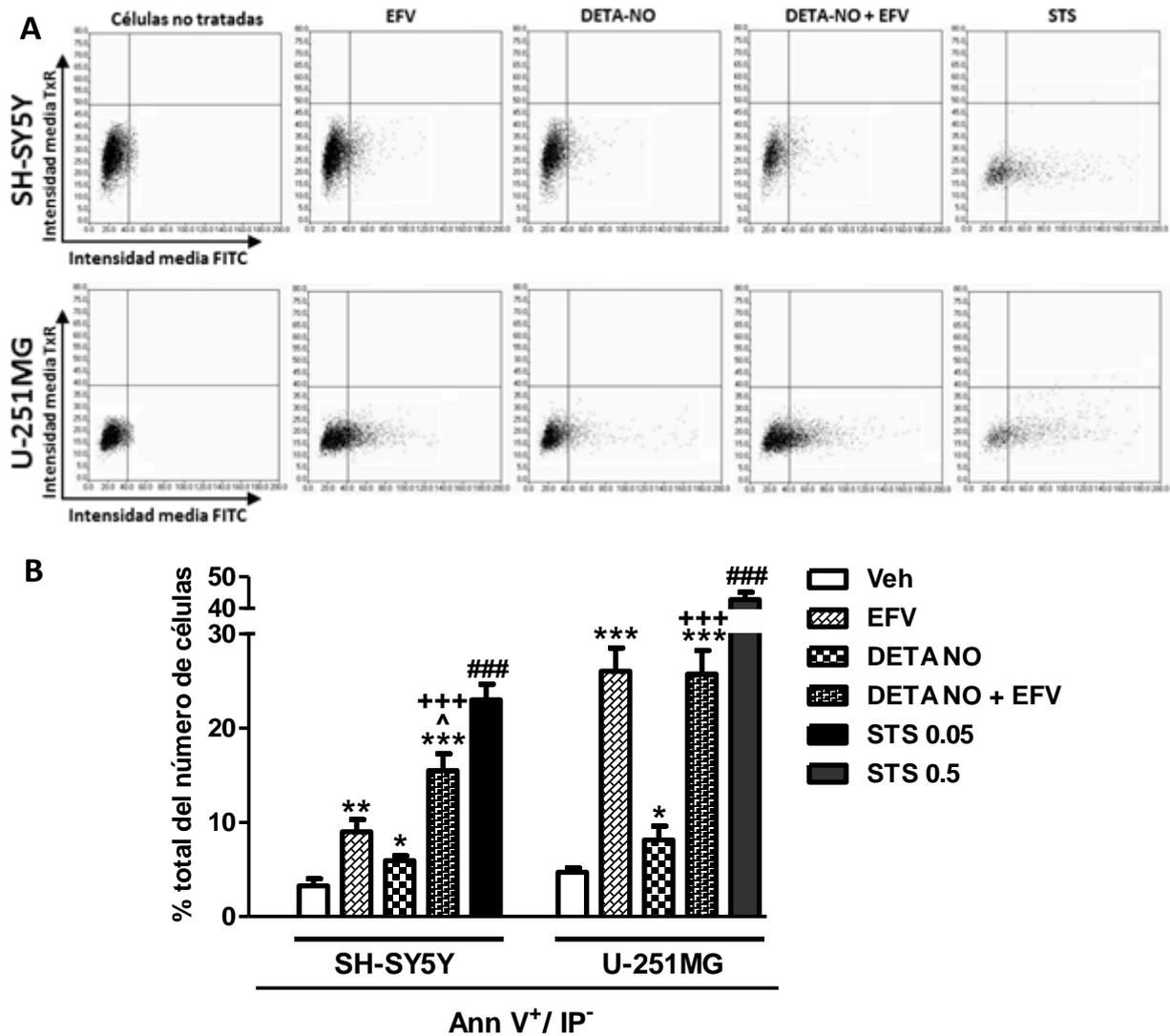


Figura IV.28. Determinación de la activación de apoptosis en células SH-SY5Y y U-251MG después de 24 h de tratamiento con EFV 10  $\mu$ M, DETA-NO (0,3 o 0,5 mM), co-tratamiento de DETA-NO + EFV y STS (control positivo). (A) Citogramas representativos (análisis bivariado de Anexina V/IP) de células sin tratar y tratadas con las diferentes condiciones. (B) El histograma representa el % total del número de células que se encuentran en una población apoptótica. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001 respecto al vehículo. ^ $p$ <0,05 significatividad de datos obtenidos con EFV 10 vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV. +++ $p$ <0,001 significatividad de datos obtenidos con DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV. Los datos de STS fueron analizados individualmente #### $p$ <0,001 respecto a las células sin tratar.

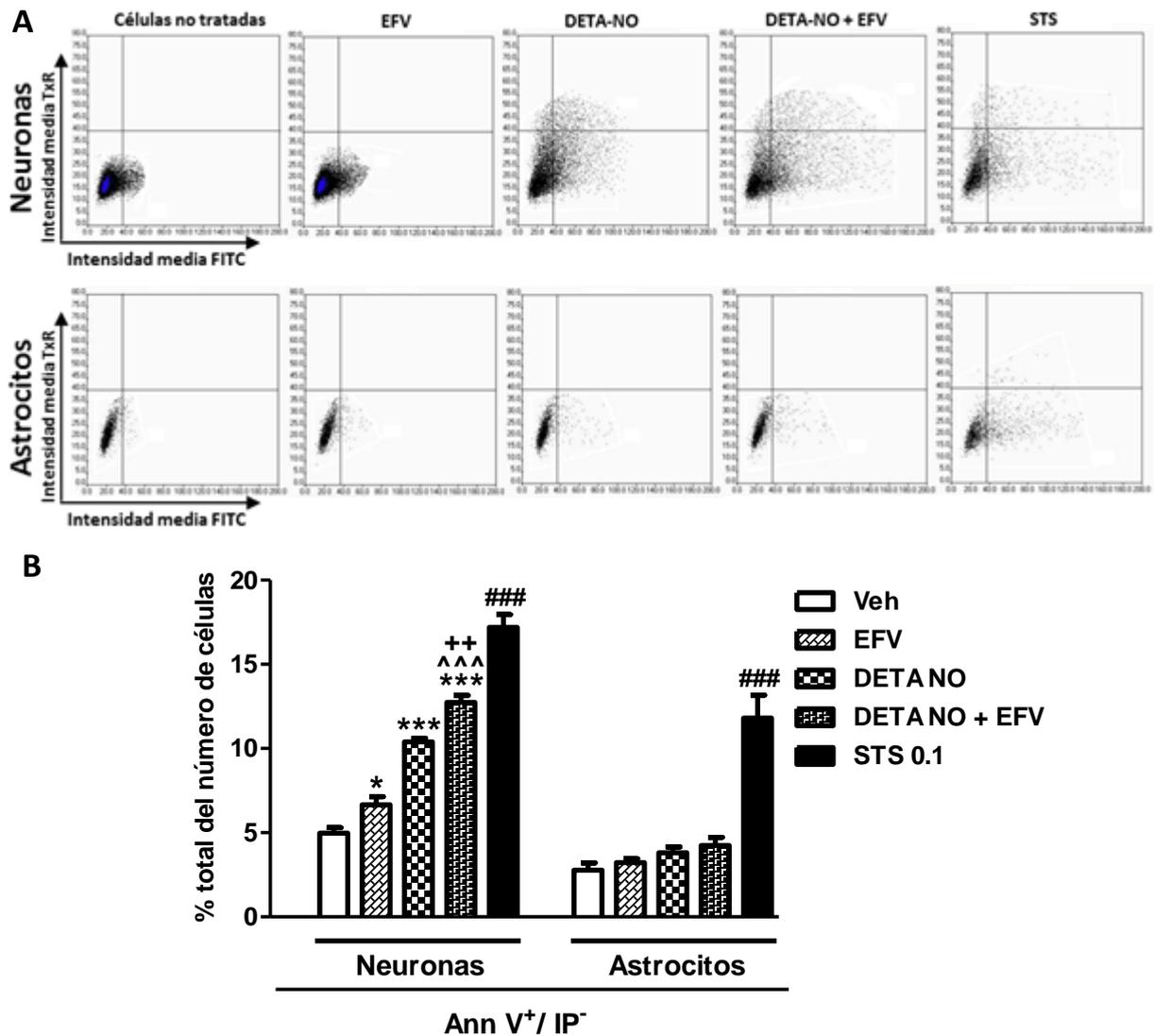


Figura IV.29. Determinación de la presencia de apoptosis en neuronas y astrocytos primarios de rata después de 24 h de tratamiento con EFV 10  $\mu$ M, DETA-NO (0,3 o 0,5 mM), co-tratamiento DETA-NO + EFV y STS (control positivo). (A) Citogramas representativos (análisis bivariado de Anexina V/IP) de células sin tratar y tratadas con las diferentes condiciones. (B) El histograma representa el % total del número de células que se encuentran en una población apoptótica. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron mediante la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. ^^p<0,001 significatividad de los datos de EFV vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV. ++ p<0,01 significatividad de los datos de DETA-NO vs co-tratamiento de DETA-NO con EFV. Los datos de STS fueron analizados separadamente ### p<0,001 respecto a las células sin tratar.

Hay que destacar que en la línea celular U-251MG, la activación de la apoptosis después del tratamiento de 24 h con EFV 10  $\mu$ M es muy marcada (Figura IV.28B.), sin embargo en el mismo período de tiempo, el número de células con respecto al vehículo no sufre ningún descenso cuando son tratadas a la misma concentración de EFV (Figura IV.6.). Al comparar estos resultados, quisimos observar el comportamiento de la proliferación celular durante 72 h en esta línea celular después de estar en presencia de EFV 10  $\mu$ M. Curiosamente EFV después de 48 h de incubación se comporta de forma similar en el crecimiento exponencial de las células U-251MG respecto al vehículo, es hasta las 72 h cuando ya se observa un descenso significativo en la proliferación celular (Figura IV.30.). Dicha disminución en el número de células será muy probablemente responsabilidad de la activación apoptótica sufrida en esta línea celular. Con este resultado podríamos decir que las células U-251MG activan la apoptosis en las primeras 48 h de tratamiento aunque el descenso notable del número de células se observe más tarde. Esto podría explicar la falta del descenso en el número de células observado a 24 h en esta línea celular.

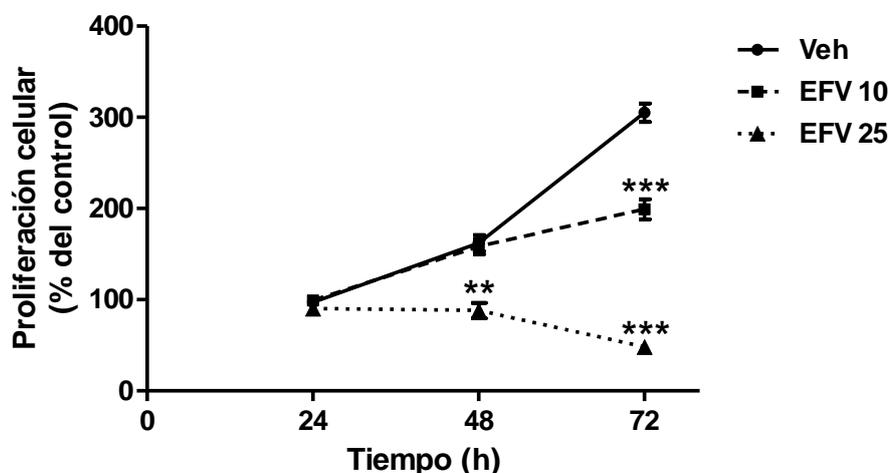


Figura IV.30. Efecto de EFV sobre la proliferación celular (72 h) en células gliales (U-251MG). El grafico representa el crecimiento exponencial de células U-251MG incubadas con EFV ( $\mu$ M) durante 72 h. El número de células fue determinado por citometría estática (fluorescencia media de Hoechst). Los resultados (media  $\pm$  SEM (n=3) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo.

---

## **BLOQUE 4: DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO INDUCIDA POR EFAVIRENZ EN CÉLULAS GLIALES Y NEURONAS**

### **4. EFV INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS GLIALES PERO NO EN NEURONAS**

#### **4.1. EFV activa la óxido nítrico sintasa en su isoforma inducible**

En este experimento, ambos tipos celulares (U-251MG y SH-SY5Y) se trataron con EFV (10 o 25  $\mu\text{M}$ ) durante 6 y 24 h, o un cóctel de LPS (24 h), una mezcla de moléculas pro-inflamatorias capaces de inducir la NOSi. Análisis por WB de la expresión de la NOS reveló que el tratamiento con EFV en células U-251MG condujo a una mayor expresión de la NOSi (Figura IV.31.). Este resultado fue observado sólo con la mayor concentración utilizada del fármaco (25  $\mu\text{M}$ ) y se produjo a un nivel similar a las 6 y 24 h de tratamiento. Además, la activación de la NOSi producida por EFV fue parecida a la inducida por la condición control, el cóctel de LPS. Sin embargo, en las células SH-SY5Y, los tratamientos con EFV a 6 y 24 h no fueron capaces de aumentar la expresión de la NOSn y el mismo resultado fue obtenido con el cóctel de LPS.

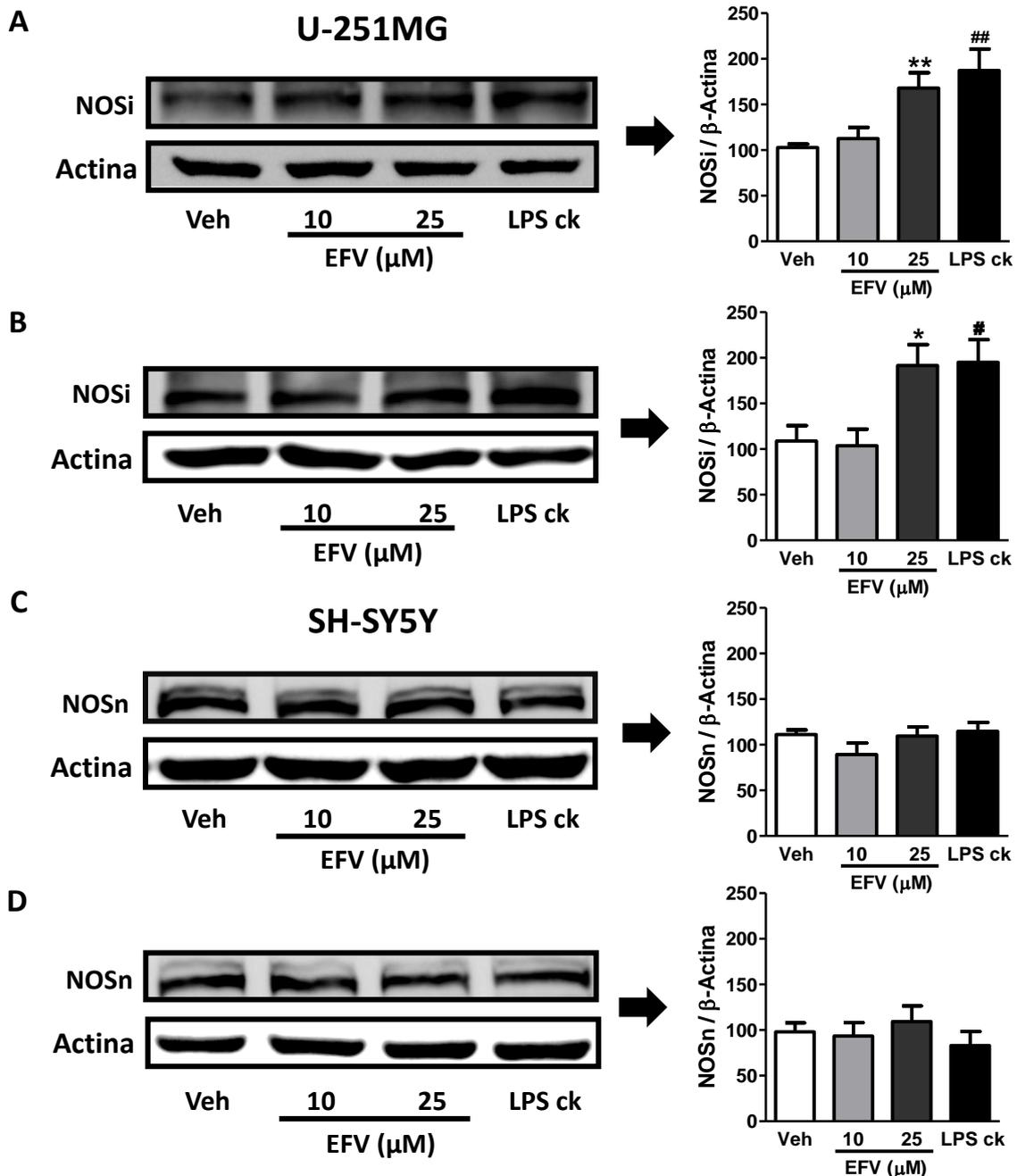


Fig.IV.31. Efecto de EFV sobre la expresión de las isoformas de la NOS. Células de U-251MG y SH-SY5Y fueron expuestas a EFV (10 o 25  $\mu$ M) por 6 h (A y C) y 24 h (B y D) o cóctel de LPS (24 h). La expresión de la NOSi (U-251MG) y NOSn (SH-SY5Y) fue analizada por WB mostrándose imágenes representativas y resultados de la densitometría. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 respecto al vehículo. Los datos del cóctel de LPS fueron analizados individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar. #  $p$ <0,05; ##  $p$ <0,01.

## **4.2. Detección del óxido nítrico producido por EFV**

El aumento de la generación de NO se confirmó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el marcador fluorescente DAR-4M AM. EFV fue capaz de incrementar la producción de NO de manera concentración-dependiente en las células U-251MG, sin embargo, este aumento no fue tiempo-dependiente. En las células de neuroblastoma (SH-SY5Y) diferenciadas a neuronas, no se observó ningún cambio en la producción de NO después de incubarlas con EFV por 6 y 24 h (Figura IV.32B). El control positivo (cóctel de LPS) se aplicó en ambos tipos celulares durante 6 y 24 h, siendo capaz de incrementar los niveles de NO en las células U-251MG, no así, en las células SH-SY5Y como era de esperarse. Curiosamente, mediante esta técnica se pudo observar producción de NO con ambas concentraciones de EFV, un resultado que no se pudo ver con la técnica de WB. Esta discrepancia se puede deber a que la técnica de microscopía de fluorescencia sea más sensible que la de WB.

Este experimento no sólo se realizó en las líneas celulares SH-SY5Y y U-251MG mencionadas anteriormente, sino también en cultivos celulares primarios de neuronas y astrocitos de corteza cerebral de rata, con el fin de descartar si el resultado observado era debido a la naturaleza cancerígena de las líneas celulares empleadas. Los astrocitos fueron incluso más susceptibles a EFV, ya que se observó un aumento significativo en la producción de NO con la menor concentración de la droga a 6 h de tratamiento, además, la generación de NO se mantuvo a las 24 h de tratamiento con ambas concentraciones. Es importante destacar, que no hubo cambios en la señal fluorescente de DAR-4M AM en las neuronas primarias de rata cuando fueron expuestas a EFV (Figura IV.33.), en ninguno de los tiempos estudiados. La falta de producción de NO también se observó después de la exposición al cóctel de LPS como era de esperarse. En general, la evaluación de la producción de NO apoya plenamente los resultados en cuanto a la expresión de la NOS en estos modelos celulares al ser tratados con EFV.

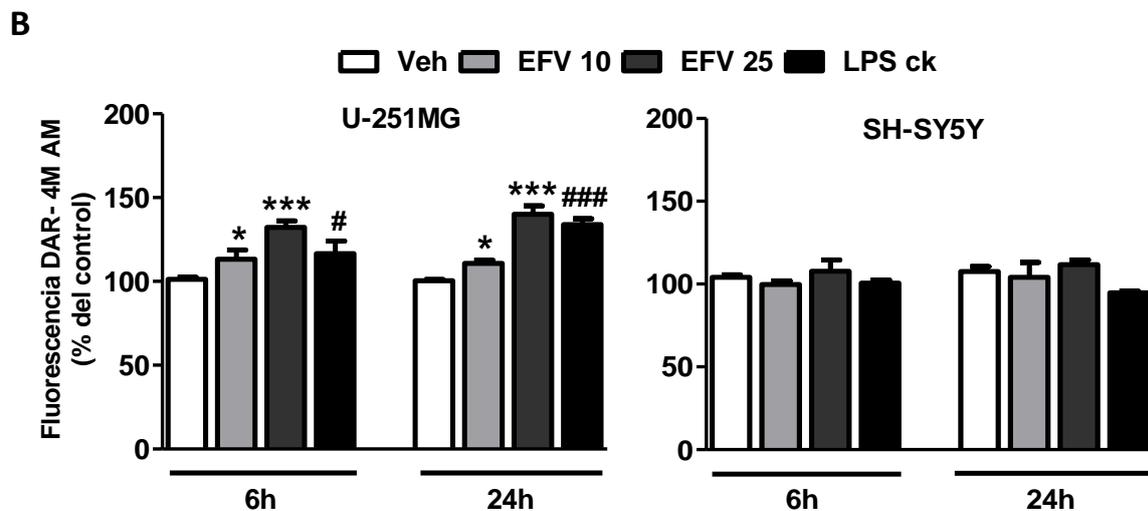
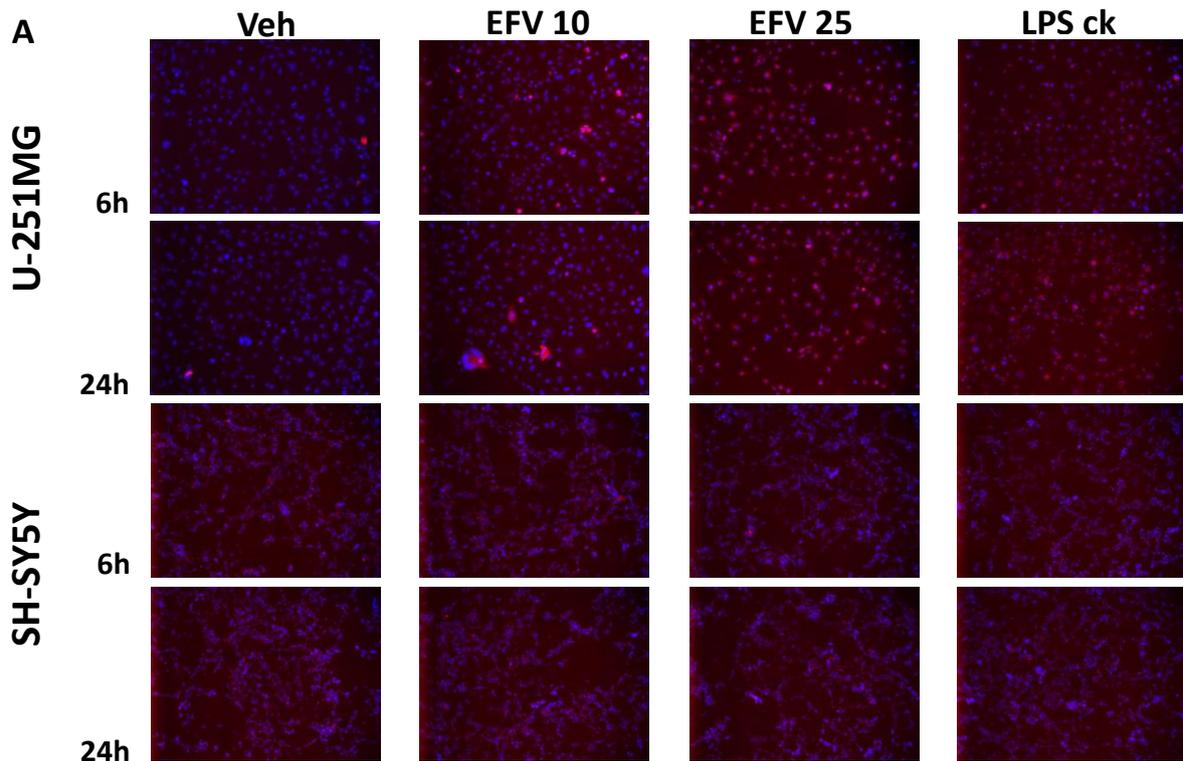


Figura IV.32. Efecto de EFV sobre la producción de óxido nítrico en las células U-251MG y SH-SY5Y. Las células fueron expuestas a EFV (10 o 25  $\mu$ M) o cóctel de LPS por 6 y 24 h y los niveles de NO intracelular fueron detectados mediante microscopía de fluorescencia (DAR-4M AM). (A) Imágenes representativas y (B) cuantificación de la fluorescencia media son mostradas. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al vehículo. El cóctel de LPS fue analizado individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar. #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ .

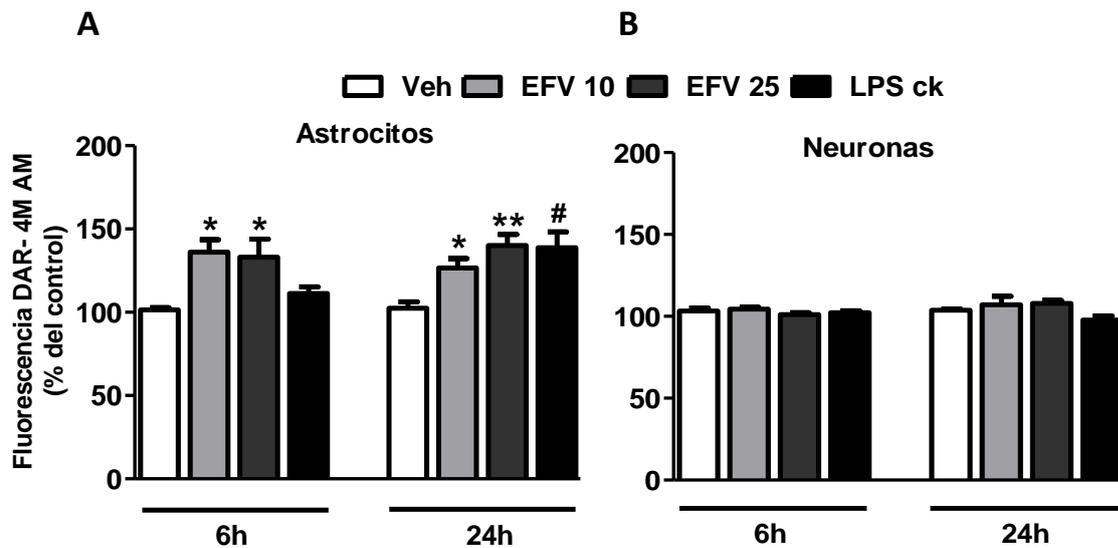


Figura IV.33. Efecto de EFV sobre la producción de óxido nítrico en cultivos primarios de astrocitos y neuronas de rata. Tras la exposición a EFV (10 o 25  $\mu$ M) o cóctel de LPS por 6 y 24 h, los niveles de NO intracelular fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia. Cuantificación de la fluorescencia media de DAR-4M AM en astrocitos (A) y neuronas (B) son mostradas. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-4) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 respecto al vehículo. El cóctel de LPS fue analizado individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar, #  $p$ <0,05.

#### 4.3. Determinación de la participación del óxido nítrico inducido por EFV en la función mitocondrial y bioenergética de las células nerviosas

Hemos descrito anteriormente un efecto directo de EFV sobre las mitocondrias y la bioenergética en los modelos celulares utilizados en el estudio. En particular, el tratamiento con EFV compromete el consumo de  $O_2$  mitocondrial, aumenta la generación de ERO mitocondriales y disminuye el  $\Delta\psi_m$ , siendo esta disfunción mitocondrial capaz de activar la glucólisis solamente en las células gliales y no en las neuronas. Después de haber demostrado que EFV induce la producción de NO en las células gliales, un efecto ausente en las neuronas, se quiso observar si este NO generado tiene participación en la alteración de los parámetros mitocondriales estudiados anteriormente y en la inducción de la glucólisis.

Para ello incubamos a las células gliales (U-251MG) y neuronas (SH-SY5Y) en la presencia de EFV (25  $\mu$ M) o EFV + L-NAME (50  $\mu$ M, un inhibidor farmacológico no selectivo de la NOS) y los parámetros de la función mitocondrial fueron determinados después de 6 h. La incubación conjunta en las células gliales con EFV y L-NAME mostró una recuperación parcial del efecto en el consumo de  $O_2$  producido por la exposición de EFV solo. Esta misma condición se realizó con las células SH-SY5Y, sin obtener una mejora en la tasa de respiración comprometida por EFV (Figura IV.34.). Cuando la generación de superóxido mitocondrial se evaluó en las células gliales por medio de la detección de la sonda fluorescente MitoSOX, se obtuvo un resultado muy similar al observado con el consumo de  $O_2$ . El aumento de la fluorescencia de MitoSOX provocado por EFV fue parcialmente restaurado cuando EFV se administró conjuntamente con L-NAME. Por el contrario, en las neuronas, los niveles de superóxido mitocondrial eran prácticamente los mismos en presencia de EFV y la exposición combinada de EFV + L-NAME (Figura IV.35A.). Cuando se evaluó el  $\Delta\psi_m$  mediante la sonda fluorescente TMRM, no se registró recuperación de este parámetro con L-NAME, ni en las células gliales ni en las neuronas (Figura IV.35B.). Además, en el análisis de la activación de la glucólisis (mediante la producción de lactato) en las células gliales, la incubación conjunta por 6 y 24 h con EFV y L-NAME mostró una disminución significativa de la producción de lactato con respecto a la generada por EFV solo, siendo esta disminución más marcada después de las 24 h de incubación (Figura IV.36.).

En resumen, podemos decir que tanto la disminución de la respiración como la generación de ERO mitocondriales en las células gliales tratadas con EFV es debida parcialmente al incremento de la producción de NO que este fármaco provoca en este tipo celular. De la misma manera, el NO inducido por EFV participa en la activación de la glucólisis en las células gliales. Sin embargo, la caída del  $\Delta\psi_m$  inducida por EFV, parece ser un efecto independiente del NO.

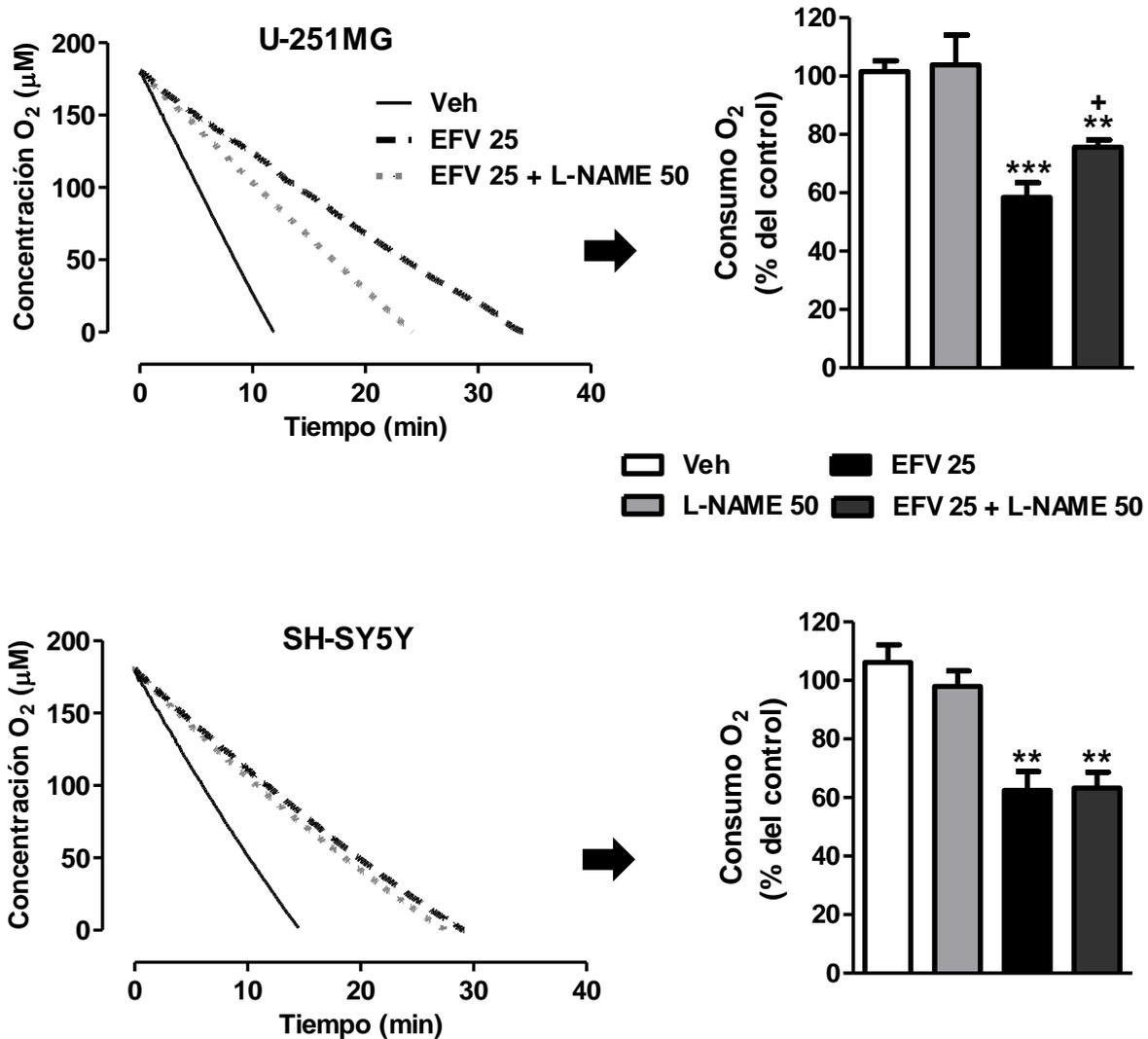


Figura IV.34. Interferencia del óxido nítrico en el consumo de O<sub>2</sub> celular. Células U-251MG y SH-SY5Y fueron expuestas a EFV 25 μM o a un tratamiento conjunto de EFV 25 μM + L-NAME 50 μM durante 6 h. Trazos representativos y la cuantificación de los datos muestran la tasa de consumo de O<sub>2</sub> en ausencia (vehículo) y presencia de EFV o EFV + L-NAME. Los datos (media ± SEM, n=3-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. <sup>+</sup>p<0,05 significatividad de datos obtenidos con EFV vs co-tratamiento de EFV + L-NAME.

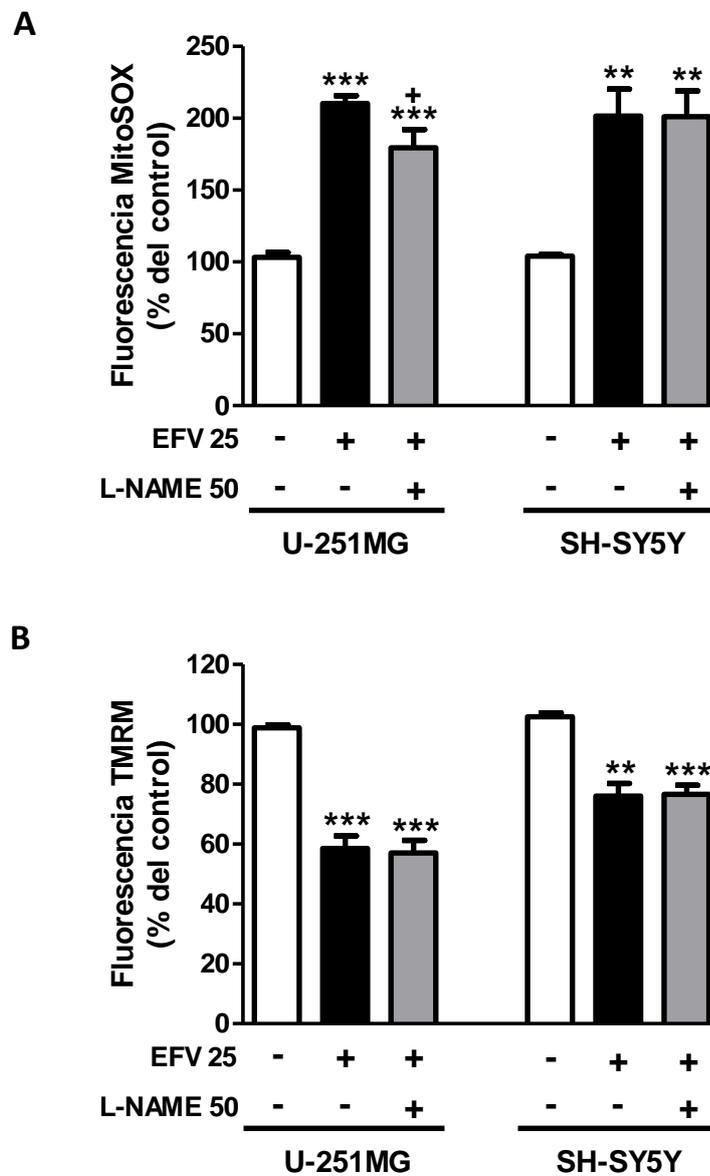


Figura IV.35. Interferencia del óxido nítrico en la función mitocondrial. Células U-251MG y SH-SY5Y fueron expuestas a EFV 25  $\mu$ M o a un tratamiento conjunto de EFV 25  $\mu$ M + L-NAME 50  $\mu$ M durante 6 h. (A) Determinación de la producción de superóxido mitocondrial (fluorescencia media de MitoSOX). (B) Determinación del  $\Delta\psi_m$  (fluorescencia media de TMRM). Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. + p<0,05 significatividad de datos obtenidos con EFV vs co-tratamiento de EFV + L-NAME.

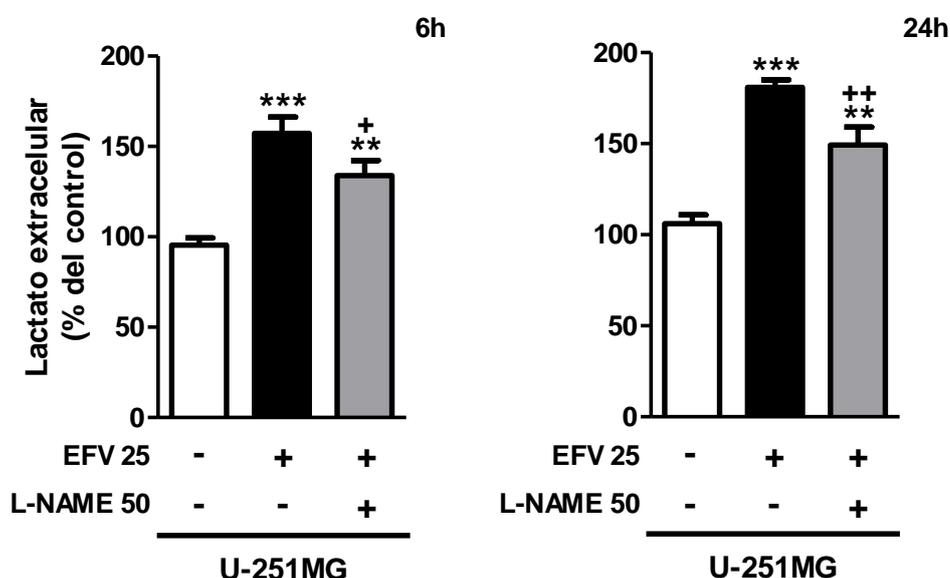


Figura IV.36. Intervención del óxido nítrico en la bioenergética de las células gliales. Determinación de la producción de lactato en células U-251MG expuestas a EFV 25  $\mu$ M o a un tratamiento conjunto de EFV 25  $\mu$ M + L-NAME 50  $\mu$ M durante 6 y 24 h. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=4-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls), \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. + p<0,05; ++ p<0,01 significatividad de datos obtenidos con EFV vs co-tratamiento de EFV + L-NAME.

#### 4.4. Impacto de EFV sobre la actividad del complejo IV de la CTE

Como se ha demostrado anteriormente, EFV es capaz de producir NO en las células gliales, un efecto que no se observa en las neuronas. Por consiguiente, nos dispusimos a determinar si este aumento de los niveles intracelulares de NO tiene algún impacto sobre la actividad del CIV de la CTE, ya que la inhibición reversible de la citocromo c oxidasa por la presencia de NO en astrocitos intactos ha sido ampliamente descrita (Brown G.C., et al., 1995; Gegg M.E., et al., 2003). Conocedores de esto, decidimos profundizar en la medición de la actividad CIV que fue evaluado a un tiempo de incubación más largo (24 h), debido a que no se obtuvieron cambios a tiempos cortos de 1 y 6 h (Figura IV.8.). Después de la exposición por 24 h, EFV condujo a una disminución modesta ( $\pm$  10%) pero significativa en la actividad del CIV de las células gliales (U-251MG), sin registrar alteraciones en las neuronas (SH-SY5Y) (Figura IV.37.).

Este hallazgo está en conformidad con los resultados obtenidos con EFV al inducir la generación de NO en las células gliales pero no en neuronas. En este experimento, se añadió un inhibidor específico del complejo IV (KCN) al medio de incubación, utilizándolo como control positivo. También se evaluó el impacto de la adición de NO exógeno mediante el donador DETA-NO. Ambos inhibidores produjeron una reducción en la actividad del CIV tanto en neuronas como células gliales. Así mismo, la posibilidad de que la presencia de NO fuese la causa de la disminución en la actividad del CIV observada en las células gliales fue confirmada debido a que este efecto fue invertido cuando L-NAME estuvo presente durante todo el tiempo de exposición a EFV.

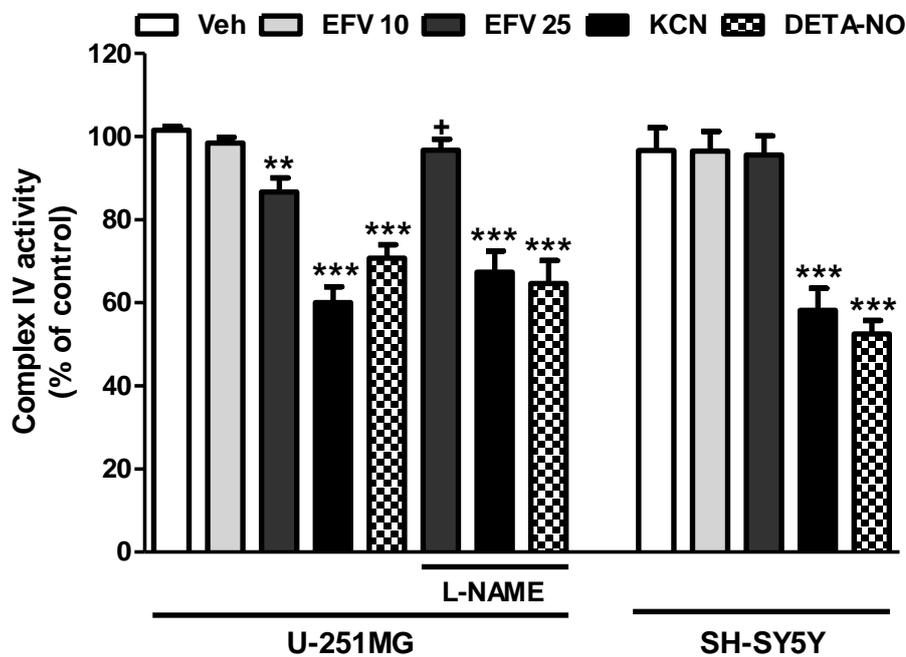


Figura IV.37. Impacto de EFV sobre la actividad del CIV de la CTE mitocondrial. Células U-251MG y SH-SY5Y fueron expuestas a EFV (10 y 25  $\mu$ M) durante 24 h. DETA-NO (0,5 y 0,3 mM) y KCN (200  $\mu$ M) fueron empleados como inhibidores específicos del CIV. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3-5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls) \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al vehículo. + p<0,05 significatividad de datos obtenidos con EFV vs co-tratamiento de EFV + L-NAME. Los inhibidores utilizados como controles positivos se analizaron individualmente con la prueba t de Student respecto a las células sin tratar. ## p<0,01; ### p<0,001.

#### 4.5. Determinación de peroxinitrito intracelular

La reacción rápida y espontánea entre NO y el ion superóxido da lugar a la generación de peroxinitrito. Dicho esto y debido a la capacidad demostrada de EFV para producir altos niveles de superóxido y de generar NO en las células gliales, se quiso analizar si pudiera haber formación de peroxinitrito que estuviera interviniendo sobre la actividad de la CTE. Por tanto, se evaluaron los niveles intracelulares de peroxinitrito en las células U-251MG con la sonda fluorescente DHR 123, después de 6 y 24 h de incubación con EFV, usándose como control positivo SIN-1 (33  $\mu$ M, un rápido generador de peroxinitrito). Como resultado, se observó un ligero aumento de los niveles de peroxinitrito intracelular pero que no llega a ser significativo en cualquiera de los tiempos estudiados (Figura IV.38.).

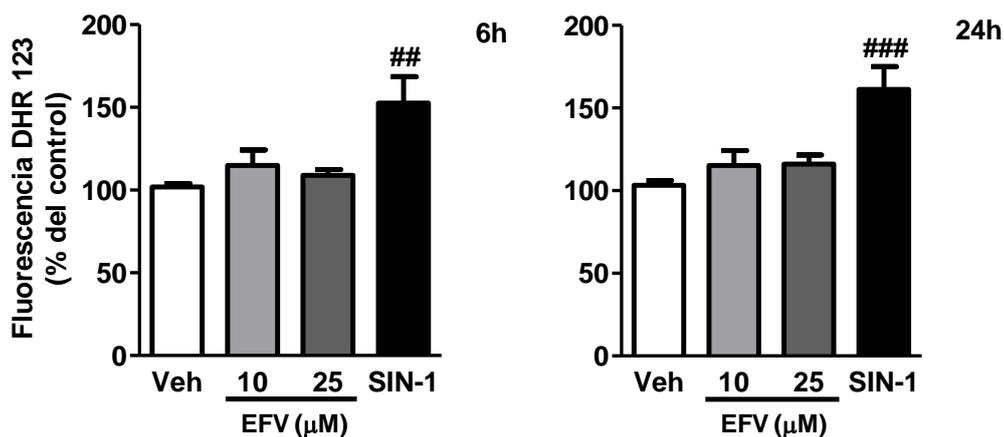


Figura IV.38. Efecto de EFV sobre la producción de peroxinitrito intracelular. Las células U-251MG fueron expuestas a EFV (10 o 25  $\mu$ M) o a SIN-1 (33  $\mu$ M), un control positivo de la producción de peroxinitrito, durante 6 y 24 h, seguidamente los niveles intracelulares de peroxinitrito se evaluaron por microscopía de fluorescencia. Los histogramas muestran la cuantificación de la fluorescencia media de la sonda fluorescente DHR 123. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=5) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls). Fluorescencia media de SIN-1 se analizó individualmente mediante la prueba t de Student respecto a las células sin tratar, ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

#### 4.6. Comparación de los niveles de óxido nítrico inducido por EFV y el donante exógeno, DETA-NO

Este experimento se realizó con el fin de poder comparar los niveles de NO que pueden llegar a generar EFV y el donante exógeno DETA-NO en las células U-251MG, y con eso tener una mejor idea de la afectación producida por el NO según sus niveles presentes en dicha línea celular. Se observó una tendencia creciente en los niveles de NO después de 6 y 24 h de incubación con ambas moléculas, presentando niveles ligeramente más altos el DETA-NO que los alcanzados por EFV en ambos tiempos de estudio (Figura IV.39.). Este resultado nos puede ayudar a entender de manera parcial el porqué de la ausencia de efecto por parte de EFV sobre la actividad del CIV en comparación al efecto inhibitorio que si presenta el DETA-NO sobre este complejo a tiempos cortos de incubación (6 h). Además, puede explicar la diferencia que muestran ambas moléculas sobre la inhibición del CIV después de 24 h, donde la inhibición del DETA-NO es mucho mayor que la provocada por EFV.

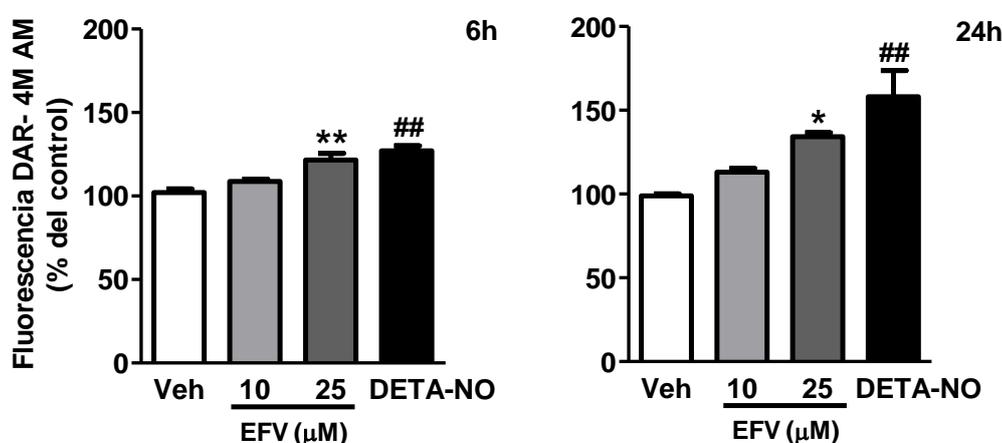


Figura IV.39. Comparación entre los niveles de NO inducidos por EFV y el donante exógeno de NO, DETA-NO. Células U-251MG fueron tratadas con EFV (10 y 25  $\mu$ M) o DETA-NO (0,5 mM) a 6 y 24 h, seguidamente el contenido intracelular de NO se evaluó mediante microscopía de fluorescencia. Los histogramas muestran la cuantificación de la fluorescencia media de la sonda fluorescente DAR-4M AM. Los datos (media  $\pm$  SEM, n=3) se relativizaron respecto a las células no tratadas (considerado 100%) y se analizaron con un análisis de varianza (One-way ANOVA), seguido por un test no paramétrico (Newman-Keuls) \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 significatividad de EFV respecto al vehículo. ## $p$ <0,01 significatividad de DETA-NO respecto al vehículo.

## ***V. DISCUSIÓN***



El desarrollo de la TARGA durante los últimos años ha prolongado considerablemente la supervivencia de las personas infectadas por el VIH en los países desarrollados, convirtiendo la enfermedad mortal en una crónica. En comparación con los anteriores regímenes de combinación, las opciones actuales están asociadas con una mayor supresión viral y menores tasas de interrupción del tratamiento debido a la mejora de su conveniencia y tolerabilidad. Sin embargo, algunos de los agentes empleados también han sido responsables de la aparición de efectos secundarios, generando así un creciente interés sobre los efectos adversos a largo plazo relacionados con el uso de esta terapia, ya que este tratamiento una vez comenzado se tiene que tomar a lo largo de toda la vida.

Debido a las propiedades 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 para el entendimiento de los mecanismos responsables de estos efectos. Si bien un sistema estático de células *in vitro* es claramente diferente a la situación fisiológica 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 y debido a que la evaluación de la neurotoxicidad en las neuronas solas no predicen todos los aspectos posibles de toxicidad, se eligió el uso combinado de células con el mismo origen (cerebro) y metabólicamente competentes como son las líneas celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) y de glioma (U-251MG) humano, las cuales además tienen un sistema P450 activo (Guo A.M. *et al.*, 2008; Mann A. and Tyndale R.F., 2010) necesario para la metabolización de EFV. Con las células SH-SY5Y, se optó por diferenciarlas a un fenotipo neuronal funcionalmente maduro que les permitiera tener similitudes bioquímicas, estructurales, morfológicas y electrofisiológicas con las neuronas (Xie H.R. *et al.*, 2010). Así mismo, para una aproximación más fisiológica y para determinar si algunos efectos observados eran dependientes de sus diferencias metabólicas intrínsecas, varios experimentos se reprodujeron utilizando cultivos primarios de neuronas y astrocitos extraídos de la corteza cerebral de rata (Wistar). Las concentraciones de EFV empleadas (10 y 25  $\mu\text{M}$ ), se escogieron tomando en cuenta la importante variabilidad individual descrita para su farmacocinética. La dosis diaria

recomendada de EFV para adultos (600 mg) por lo general resulta en 3,17 a 12,67  $\mu\text{M}$  en plasma (Staszewski S. *et al.*, 1999), aunque muchos estudios clínicos han demostrado que un gran número de pacientes (hasta un 20%) exhiben niveles más altos, incluso de hasta 73,6  $\mu\text{M}$  (Burger D. *et al.*, 2006; Carr D.F. *et al.*, 2010; Gounden V. *et al.*, 2010). Así mismo, el análisis de la concentración de EFV en plasma de 843 pacientes incluidos en el ensayo de EuroSIDA, reveló que el 14,1% de ellos tenían concentraciones plasmáticas supraterapéuticas, y que la concentración más alta de EFV registrada fue de 80,75  $\mu\text{M}$  (van Luin M. *et al.*, 2009). Además, hay numerosas publicaciones que describen interacciones con ciertos fármacos co-administrados durante el tratamiento antirretroviral, los cuales resultan en un incremento significativo en la  $C_{\text{max}}$  de EFV (Ficha técnica de Sustiva, avalada por la Agencia Europea del Medicamento, 2012). Un gran número de investigaciones han explorado los determinantes genéticos de la eficacia, variabilidad y toxicidad de EFV. Este compuesto en mayor parte (90%) se metaboliza a través del enzima hepática CYP450 2B6 (CYP2B6) y los polimorfismos genéticos en su gen han sido descritos como responsables de las diferencias en la farmacología de EFV. Muchos estudios han sido asociados con altas concentraciones plasmáticas de EFV con polimorfismos CYP2B6 (Kwara A. *et al.*, 2009, Ramachandran G. *et al.* 2009; Gounden V. *et al.*, 2010). En un estudio, pacientes con polimorfismo CYP2B6 516T/T mostraron persistencia de concentraciones plasmáticas de EFV incluso 21 días después de la interrupción del tratamiento lo que puede inducir un mayor riesgo de desarrollar resistencia a EFV (Ribaudeo H.J. *et al.*, 2006).

Es bien conocida la asociación de los agentes antirretrovirales con efectos adversos sobre el SNC (Abers M.S. *et al.*, 2014). La frecuencia y severidad de los eventos adversos neuropsiquiátricos es muy variable, con diferencias entre las clases de antirretrovirales y entre los fármacos individuales en cada clase. Para la combinación más eficaz de la terapia antirretroviral, es imperativo que haya al menos un fármaco que cruza la BHE, ya que el virus entra en el SNC y causa daño. Se sabe que EFV, uno de los agentes antirretrovirales más frecuentemente prescritos, cruza esta barrera y puede reducir la actividad deletérea del VIH sobre el SNC (von Giesen H. J., *et al.* 2002). Sin embargo, muchos pacientes presentan efectos secundarios relacionados con el SNC que van desde mareos, una sensación parecida

a la resaca, problemas de concentración, alteraciones del sueño y nerviosismo, con una incidencia en los ensayos clínicos que va desde 60 a 90% (Fumaz C.R. *et al.*, 2005; Cavalcante G.I. *et al.*, 2010; Abers M.S. *et al.*, 2014). Efectos neurológicos más graves también se han registrado (por lo general en al menos el 2% de los pacientes) e incluyen depresión severa, delirio, paranoia, despersonalización, alucinaciones, ansiedad, comportamiento agresivo, pensamiento anormal y manía (Scourfield A. *et al.*, 2012). En algunos casos, estos efectos son tan graves que requieren la interrupción de la terapia; la frecuencia de este evento varía entre 2 - 13% de los pacientes (Muñoz-Moreno J.A. *et al.*, 2009; Kenedi C.A. and Goforth H.W., 2011) o incluso 16 - 24% de los pacientes (Faggian F. *et al.*, 2005); por ejemplo, en un estudio reciente el 19% de los pacientes que iniciaron un tratamiento que contenía EFV (Atripla) cambió la terapia y el 71% de ellos lo hizo debido a la toxicidad del SNC (Scourfield A. *et al.*, 2012). La toxicidad en el SNC es el principal efecto secundario de EFV y se sabe que esta correlacionado con los niveles de fármaco en plasma (Marzolini C. *et al.*, 2001; Gutiérrez-Valencia A. *et al.*, 2009; Gounden V. *et al.*, 2010). Aunque los valores absolutos de EFV en el LCR se diferencian de los del plasma, los resultados recientes muestran que los niveles libres de proteínas son similares (Avery L.B. *et al.*, 2013). La farmacocinética de EFV en el LCR se estudia como sustituto para la del cerebro, sin embargo, no se puede utilizar como marcador directa y completamente seguro, ya que, la penetración en el LCR puede no ser equivalente a los niveles de la droga en el parénquima cerebral o fluido extracelular. Hay sólo unos pocos estudios que han evaluado la concentración de EFV en LCR; muestran que el EFV cruza la BHE alcanzando una concentración media en el LCR equivalente al 0,4-1,2% de la concentración plasmática (Tashima K.T. *et al.*, 1999; Best B.M. *et al.*, 2011; Yilmaz A. *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios tienen ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta, como la falta de datos disponibles para correlacionar concentraciones supratrapéuticas de EFV en plasma a sus niveles en el LCR y en especial en relación con los pacientes que sufren de HAND y/o enfermedades neurológicas relacionadas con la TARGA. Por otra parte, la BHE puede ser vulnerada debido a una lesión isquémica, hemorragia intracerebral, traumatismos, procesos neurodegenerativos, la inflamación o trastornos vasculares que podrían elevar la penetración del fármaco antirretroviral en el SNC (Weiss N. *et al* 2009; Davidson D.C. *et al* 2012). Es importante destacar que la alteración de la BHE se ha

correlacionado con la gravedad del deterioro neurocognitivo, mientras que en la mayoría de los pacientes asintomáticos la función de la BHE es intacta (Eisfeld C. *et al.*, 2013). Recientemente, estudios en animales han demostrado que la relación cerebro a plasma de fármacos antirretrovirales puede diferir de la relación LCR a plasma (Eisfeld C. *et al.*, 2013), pero hasta donde sabemos no hay tal estudio disponible para EFV. Estas limitaciones pueden explicar en parte por qué a pesar de alcanzar concentraciones terapéuticas, la terapia antirretroviral no es tan efectiva en el SNC como en compartimentos periféricos del cuerpo.

Los requerimientos energéticos del cerebro y los mecanismos por los que se adapta a los retos metabólicos son cuestiones de debate, y en particular la controversia rodea el papel desempeñado por las mitocondrias. Diferencias sustanciales se han reportado entre la bioenergética de los distintos tipos de células - las células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y neuronas (Bolaños J.P. *et al.*, 2010). Los astrocitos son el único tipo de célula neuronal con un depósito de glucógeno y son altamente glucolíticas (Erecińska M. *et al.*, 1995; Bolaños J.P. and Almeida A., 2006). Las neuronas no son capaces de mantener los niveles de ATP tras un impacto en la función mitocondrial, que es crucial para la viabilidad celular, y por lo tanto son más vulnerables que la célula glial (Almeida A. *et al.*, 2001). En el presente trabajo, observamos que EFV a tiempos cortos de tratamientos altera la respiración mitocondrial, aumenta la generación de ERO mitocondriales y disminuye el  $\Delta\Psi_m$  en una manera concentración-dependiente en ambos tipos celulares en estudio. Esta disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo llevaron a una reducción de la proliferación y viabilidad solamente observada en las células SH-SY5Y (diferenciadas a neuronas), sugiriendo un efecto mitotóxico agudo, donde las neuronas son más vulnerables a la respuesta de EFV que las células gliales (U-251MG). Debido al decrecimiento en el consumo de  $O_2$  mitocondrial observado en ambos tipos celulares, se quiso explorar a que nivel en particular es producida esta alteración. Se demostró que en neuronas y células gliales, EFV es capaz de inhibir la actividad del complejo I de la CTE después de 1 h de incubación y que a 6 h esta interferencia es más pronunciada, reflejando un efecto acumulativo dependiente del tiempo probablemente asociado con una mayor inhibición de CI, ya que esta macroproteína de 45 subunidades contiene 8 grupos de sulfuro de hierro que son susceptibles a la inactivación

mediada por superóxido (Melov S. *et al.*, 1999). Estos datos muestran que la acción perjudicial de EFV sobre la función mitocondrial previamente reportada en hepatocitos (Apostolova N. *et al.*, 2010; Blas-García A. *et al.*, 2010) también se produce en las neuronas y células gliales, y proporcionan la evidencia de que las neuronas son más susceptibles que las células gliales a los efectos negativos de este fármaco sobre la viabilidad celular.

Con respecto al estudio de la tasa de consumo de oxígeno (OCR), evaluada en neuronas y células de glía tratadas con EFV bajo condiciones basales, y también la capacidad respiratoria sobre la interferencia farmacológica de la CTE, se pudo observar con respecto a los valores absolutos que EFV es capaz de disminuir en ambas líneas celulares la respiración basal y mitocondrial en una forma dependiente de la concentración, datos que concuerdan con los obtenidos anteriormente con el electrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark. Además, nuestro estudio demostró que las células gliales al ser tratadas con EFV (10 y 25 μM) muestran una disminución en la capacidad respiratoria de reserva, indicando una reducción en la capacidad de suministro de sustrato y de transporte de electrones al momento de responder a un aumento en la demanda de energía y por tanto una disminución en la velocidad máxima a la que la cadena respiratoria puede operar (capacidad respiratoria máxima) al ser comparadas con su respectivo vehículo. Este efecto solo se observó con la concentración mayor de EFV en las células SH-SY5Y, indicando que EFV a poco tiempo de exposición (1 h) hace que sus mitocondrias operen más cerca de su límite bioenergético, siendo esta limitación más destacada en las células gliales. Así mismo, ambas líneas celulares mostraron tener una disminución en la eficiencia mitocondrial relacionada con la producción de ATP, debido a que EFV disminuye de manera dependiente de la concentración la respiración vinculada al ATP. Con respecto a la fuga de protones no se observaron cambios después de incubar las células con EFV, sin embargo, al expresar este componente del consumo de O<sub>2</sub> como porcentaje de la respiración basal, observamos un incremento de la fuga de protones en ambos tipos celulares, sugiriendo que esta moderada alteración podría ser un posible cambio en el  $\Delta\psi_m$  causada por la oxidación de sustratos, aunque no podemos descartar que las alteraciones de la membrana pueden dar cuenta de las diferencias en el flujo pasivo de protones. Por otra parte, la disminución obtenida en los valores absolutos de la respiración

no-mitocondrial de ambos tipos celulares tratados con EFV podría deberse principalmente por el consumo de  $O_2$  de la superficie celular, ya que se ha descrito ser un factor importante en el consumo de  $O_2$  en líneas celulares de cáncer, con una variación considerable del 1% al 80% de las tasas de consumo total de  $O_2$  (Herst P.M. and Berridge M.V., 2007). Otros factores que se han visto involucrados en las alteraciones de la respiración no-mitocondrial son los peroxisomas y la oxidación de sustratos (Abe Y. *et al.*, 2010). Estos datos demuestran la alteración perjudicial que EFV ejerce sobre los componentes del consumo de  $O_2$  en las neuronas y células gliales, reforzando la capacidad de EFV para alterar la función mitocondrial de estos tipos celulares.

Debido a que hay evidencia de la existencia de la comunicación bidireccional entre las células gliales y las neuronas en condiciones fisiológicas/fisiopatológicas (Liu H.T. *et al.*, 2009), se estudió un modelo de interacción (co-cultivo) entre las células gliales y las neuronas en presencia de EFV, para analizar si las células gliales podrían interferir en la alteración de la función mitocondrial de las neuronas, respecto a la generada por EFV en las neuronas cultivadas solas. Nuestros resultados sugieren que la presencia de las células gliales no influye en la respuesta de las neuronas al tratamiento con EFV, ya que, en la producción de superóxido mitocondrial y en el número de células no se produjeron cambios significativos, con la excepción del  $\Delta\psi_m$  donde se pudo observar una ligera mejora, probablemente debido a las funciones neuroprotectoras de las células gliales a insultos nocivos (Rao K.V. *et al.*, 2005).

Las terapias que contienen EFV se prescriben con frecuencia como tratamiento de primera línea para el VIH debido a su eficacia y disponibilidad como tratamiento individual por vía oral administradas en una sola dosis diaria (Fauci A.S. *et al.*, 2013). La eminencia de EFV ha sido cuestionada por la llegada de nuevos antirretrovirales, como el inhibidor de la integrasa raltegravir (RAL), el ITINAN rilpivirina (RPV) y el inhibidor de la proteasa darunavir (DRV). La pretensión principal de estos nuevos medicamentos es obtener un perfil toxicológico más seguro mientras mantienen una eficacia y supresión virológica similar a las de EFV (Nelson M.R. *et al.*, 2013; Rockstroh J.K. *et al.*, 2013; AIDSinfo, 2014). Varios ensayos clínicos han sido realizados con el fin de comparar la seguridad de EFV en el SNC con la de algunos de los

nuevos fármacos anti-VIH, demostrando menos eventos neuropsiquiátricos exhibidos por los nuevos anti-HIV (Mills A.M. *et al* 2013; Rockstroh J.K. *et al.*, 2013). Nuestro estudio y datos recientes *in vitro* han descrito la presencia de una disfunción mitocondrial y alteración en la viabilidad de las neuronas provocada por EFV (Robertson K. *et al.*, 2012; Tovar-y-Romo L.B. *et al.*, 2012), por lo que se quiso determinar el perfil toxicológico *in vitro* de estos tres compuestos antirretrovirales mencionados anteriormente mediante la evaluación de sus efectos sobre los parámetros mitocondriales y celulares en neuronas primarias de rata. Los resultados mostraron que concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes de RIL, RAL y DRV no afectan a la función mitocondrial o ponen en riesgo la viabilidad celular y la supervivencia de las neuronas, a diferencia de lo observado con EFV. Teniendo en cuenta estos resultados, que a su vez están en concordancia con lo descrito por algunos ensayos clínicos, el perfil libre de neurotoxicidad de estos tres fármacos anti-HIV puede ser respaldado, por tanto, parecen ser alternativas más seguras a EFV en términos de los efectos secundarios neurológicos.

En el presente estudio hemos observado que EFV compromete la función mitocondrial de neuronas y células gliales, sin embargo, las implicaciones de estos efectos sobre la viabilidad varían en las dos poblaciones. Misma discrepancia fue observada cuando se analizó la bioenergética celular en dichas poblaciones. En las células glía, EFV activa la AMPK, activando la glucólisis y aumentando el contenido del ATP intracelular, una respuesta que no se observó en las neuronas. El nivel de lactato en el medio extracelular, un indicador de la activación de la glucólisis, se determinó con el fin de aclarar si la concentración de ATP aumentada en células gliales fue el resultado de un aumento en la glucólisis. Se encontró un aumento mayor y dependiente de la concentración en la generación de lactato en las células gliales y una vez más, estos efectos no se observaron en las neuronas (Figura V.1.). Así mismo, co-incubación (6 o 24 h) de las células gliales con el compuesto C, un inhibidor de la AMPK, bloqueó la activación de la glucólisis. Considerado en conjunto, estos resultados demuestran que la glucólisis se activa como consecuencia de la siguiente serie de eventos: la inhibición mitocondrial, la reducción de ATP intracelular y la activación de AMPK. Estos resultados están en línea con los primeros informes insinuando que la inhibición de los

complejos mitocondriales de la CTE con reactivos farmacológicos o fluctuaciones energéticas afectan a las células gliales y a las neuronas de diferentes maneras (Erecińska M. *et al.*, 1995; Moncada S. and Erusalimsky J.D., 2002; Almeida A. *et al.*, 2004). Más recientemente, se describió una reacción diferencial similar a la observada en nuestros experimentos, cuando el complejo IV de la CTE mitocondrial fue inhibido con NO (Bolaños J.P. and Almeida A., 2006). Existen diferencias importantes entre la bioenergética de las células gliales y las neuronas. Las primeras son altamente glucolíticas y capaces de mantener los niveles de ATP, haciéndolas más resistentes que las neuronas a insultos mitocondriales y al estrés bioenergético. Es importante destacar que un escenario de supervivencia de las células gliales y la degeneración neuronal con manifestaciones de disfunción mitocondrial se ha asociado con trastornos neurocognitivos incluyendo la demencia asociada al VIH (Saha R.N. and Pahan K., 2007).

Los mecanismos celulares responsables de los efectos secundarios del SNC relacionados con el EFV no se conocen en profundidad. Un reciente estudio *in vitro* e *in vivo* que explora un gran número de receptores, encontró que EFV actúa principalmente como un agonista parcial de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y en particular los 5-HT<sub>2A</sub>, induciendo síntomas como el LSD y otros alucinógenos en ratones (Gatch M.B. *et al.*, 2013). Además, hay pruebas de acciones inhibitorias del fármaco sobre el metabolismo neuronal, tal como se manifiesta por una reducción de la actividad de la creatina quinasa, una enzima implicada en la homeostasis energética, en diferentes áreas del cerebro de ratón (Streck E.L. *et al.*, 2008). También se ha descrito que EFV (30 µM) altera la viabilidad celular en cultivos primarios de astrocitos de rata (24 h), un efecto que es relacionado con el estrés oxidativo de origen mitocondrial (Brandmann M. *et al.*, 2012). En este contexto, es relevante que se ha mostrado recientemente que EFV afecta al complejo IV mitocondrial en algunas partes del cerebro de ratón (Streck E.L. *et al.*, 2011) y que interfiere con la función mitocondrial en hepatocitos *in vitro* a través de la inhibición aguda y reversible del complejo I, alterando la bioenergética celular y dando lugar a mitofagia y muerte celular (Blas-García A. *et al.*, 2010; Apostolova N. *et al.*, 2011). Asimismo, al metabolito principal de EFV, el 8-hidroxi-efavirenz, se le ha visto relacionado con la inducción de daño o muerte celular en diferentes modelos

celulares, así como, en el incremento del flujo glucolítico en astrocitos (Bumpus N.N., 2011; Tovar-y-Romo L.B. *et al.*, 2012; Brandmann M. *et al.*, 2013). Estas implicaciones también pueden arrojar luz sobre los mecanismos de los efectos secundarios que el fármaco ejerce sobre el SNC.

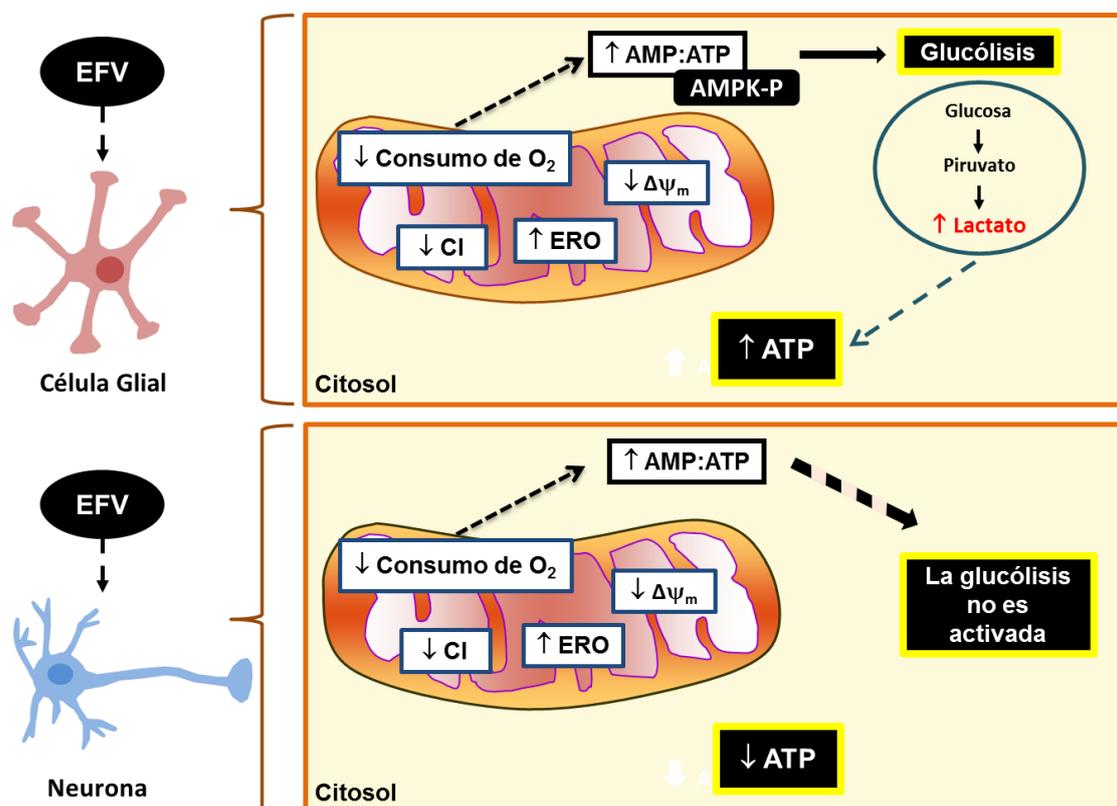


Figura V.1. Representación esquemática del efecto de EFV en la bioenergética de las células gliales y las neuronas. EFV es capaz de producir una disfunción mitocondrial caracterizada por: una inhibición directa en la actividad del Cl de la CTE, disminución en el consumo total de O<sub>2</sub>, incremento en la producción de ERO y disminución del Δψ<sub>m</sub>. Sin embargo, las implicaciones de estos efectos para la bioenergética celular y la supervivencia varían en las dos poblaciones. En las células gliales, el aumento en la relación AMP:ATP provocado por la disfunción mitocondrial causa la activación de la AMPK, dando lugar a la regulación al alza de la glucólisis (incremento del lactato extracelular) y en consecuencia al aumento de los niveles intracelulares de ATP, mientras que esta respuesta no fue observada en las neuronas.

El VIH puede afectar al SNC directamente, produciendo síndromes neurológicos distintos tales como trastornos neurocognitivos asociados con el VIH (HANDs), o indirectamente,

mediante la inducción de la depleción de células T y la inmunodeficiencia con las infecciones oportunistas y las neoplasias. Aunque la terapia antirretroviral ha disminuido la incidencia de la demencia asociada al VIH, parece haber tenido poco impacto en la prevalencia de las formas más leves de HAND, es más, la patogénesis de esta compleja enfermedad también se ha relacionado con la neurotoxicidad directa o indirecta de los fármacos antirretrovirales (Schweinsburg B.C. *et al.*, 2005; Cardenas VA. *et al.*, 2009; Marra C.M. *et al.*, 2009). Los individuos infectados por el VIH son propensos a desarrollar un estado inflamatorio en el cerebro y más del 50% de los pacientes eventualmente sufren algún trastorno neurológico (Heaton R.K. *et al.*, 2010; McArthur J.C. *et al.*, 2010). Este hecho gana mucha relevancia ya que la aparición de HAND también se ha asociado con un mayor riesgo de muerte (Vivithanaporn P. *et al.*, 2010). Por otra parte, el aumento de la toxicidad por EFV se ha asociado con el aumento de la inflamación del SNC. Por ejemplo, los efectos secundarios de EFV relacionados con el SNC son más propensos a aparecer poco después de la iniciación del tratamiento y, por lo general coinciden con el estado inflamatorio que acompaña a la infección por VIH de por sí en pacientes no tratados previamente (Cavalcante G.I. *et al.*, 2010). También hay evidencia de que EFV está asociado con trastornos neurocognitivos en pacientes asintomáticos (Cicarelli N. *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que los ITINAN, pero no otras familias de fármacos anti-VIH, activan las plaquetas e inducen la liberación del mediador inflamatorio sCD40L (ligando CD40 soluble) incrementando sus niveles en el plasma y LCR de individuos infectados por el VIH con deterioro cognitivo (Davidson D.C. *et al.*, 2013). Por último, aunque la asociación no es perfecta, también hay indicios que apuntan a una mayor frecuencia de síntomas en el SNC inducidos por EFV en condiciones en las que la neuroinflamación puede jugar un papel como algunos trastornos mentales (Peyriere H. *et al.*, 2001) o la dependencia química (Lochet P. *et al.*, 2003). La presencia de de síntomas depresivos en la historia clínica del paciente también se ha demostrado que aumenta el riesgo de eventos adversos neuropsiquiátricos inducidos por EFV (Scourfield A. *et al.*, 2012.). Un estudio *in vitro* mostró una producción al alza de citoquinas pro-inflamatorias (interleucina 1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en células de sangre de ratas tratadas con EFV al ser expuestas a estímulos pro-inflamatorios. Es importante destacar que el tratamiento con paroxetina, un antidepresivo impidió el incremento en la formación de citoquinas pro-inflamatorias

(O'Mahony S.M. *et al.*, 2005). Este hallazgo y el hecho de que la inflamación es relevante para el desarrollo de los síntomas depresivos apoyan la idea de que EFV puede actuar como un inductor de un comportamiento depresivo en ratas. En la misma línea, se ha encontrado que EFV puede incrementar los niveles de serotonina en ratas, efecto que se produce en paralelo a una reducción de la actividad del TDO (triptófano-2-3-dioxigenasa) (Cavalcante G.I. *et al.*, 2010), enzima responsable de metabolizar el aminoácido esencial triptófano (precursor de la serotonina). El déficit funcional de las monoaminas y particularmente de la serotonina se ha vinculado con la depresión. Sin embargo, el hecho de que EFV puede interferir con el TDO conduce a un aumento en los niveles de serotonina como se ve en las ratas tratadas con EFV no puede explicar los síntomas depresivos registrados en pacientes con VIH tratados con este fármaco, por lo que, son necesarios análisis más detallados de cómo EFV altera la homeostasis de la serotonina y otros transmisores para ayudar a conocer mejor su relación con el desarrollo o la agravación de la depresión.

El NO es un crucial mediador pro-inflamatorio del SNC asociado con la patogénesis de diferentes condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Esplugues J.V., 2002), así como en el deterioro neurocognitivo de pacientes infectados con el VIH; varios estudios han revelado un aumento del estrés nitrosativo en el LCR de pacientes infectados con el VIH diagnosticados con HAND, reflejado por la presencia de un mayor nivel proteínas modificadas de nitrotirosina, en especial la L-prostaglandina D sintasa (L-PGDS), dando como resultado la pérdida de su actividad enzimática (Li W. *et al.*, 2008b; Beasley A. *et al.*, 2010). La L-PGDS está implicada en el metabolismo del ácido araquidónico y desempeña un papel clave en la regulación del sueño, alergias, sensación de dolor, y en el desarrollo de los órganos reproductores masculinos (Zhou Y. *et al.*, 2010). Además, un mayor nivel de nitrotirosina (la huella de peroxinitrito) se observó en un análisis inmunohistoquímico realizado en tejidos cerebrales de pacientes infectados con el VIH que presentaban demencia respecto a los que no la presentaban (Boven L.A. *et al.*, 1999). Esto es de mucha relevancia debido a que la nitración de tirosina ha sido implicada en varias enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Butterfield D.A. *et al.*, 2011), la esclerosis lateral amiotrófica (Franco M.C. *et al.*, 2013) y la enfermedad de Parkinson

(Danielson S.R. *et al.*, 2009). Otro estudio reciente, donde se analizaron cerebros humanos (post mórtem) de individuos que tenían infección por VIH sin encefalitis y con encefalitis/HAND y que fueron comparados con cerebros de individuos sanos, describió que proteínas nitradas fueron predominantemente presentes en los individuos infectados por el VIH con encefalitis/HAND, y, que curiosamente, las modificaciones se encuentran predominantemente en las regiones variables de inmunoglobulina (Uzasci L. *et al.*, 2014). Todo esto sugiere que el estrés nitrosativo además de tener consecuencias funcionales importantes también puede afectar a la patogénesis de los trastornos neurocognitivos asociados con el VIH. Además, el NO modula la respiración mitocondrial a través de una inhibición reversible del complejo IV, aunque también puede actuar de una manera compleja en la mitocondria. Cabe remarcar que, las células gliales son más resistentes que las neuronas a la presencia de NO en exceso. Aunque inicialmente se pensó que esta resistencia podría ser un resultado de su robusto sistema antioxidante, más recientemente esta ha sido atribuida a la activación de la glucólisis y la captación de glucosa (Bolaños J.P. and Almeida A., 2006). Es importante destacar que existe clara evidencia experimental y clínica para implicar al NO en los síntomas del SNC provocados por el VIH. Los estudios en animales sugieren que la inducción de la NOSi por la gp41 (glicoproteína de la envoltura del VIH-1) y la producción de NO son importantes mediadores de la neurotoxicidad provocada por esta proteína (Adamson D.C. *et al.*, 1999). De manera más relevante, el aumento de la producción de NO se ha relacionado con la demencia asociada al VIH, cuya gravedad se ha correlacionado con los niveles de expresión de la NOSi, lo que sugiere una asociación con el medio neuroinflamatorio que rodea a la infección por VIH (Adamson D.C. *et al.*, 1999; Boven L.A. *et al.*, 1999; Li W. *et al.*, 2008b; Uzasci L. *et al.*, 2014).

En la presente tesis, también se evaluó si los efectos de EFV se exacerban en presencia de un estímulo pro-inflamatorio. Para ello, se realizó un co-tratamiento de EFV y NO, este último fue utilizado debido a su doble acción, tanto como un estimulador pro-inflamatoria como un modulador mitocondrial y se empleó en forma de DETA-NO (donador de NO exógeno). Se determinó que tanto el DETA-NO y EFV alteraron la función mitocondrial en células gliales y en neuronas, mientras que sólo en el primer tipo de células se desencadenó la activación de

la AMPK y, a su vez, de la glucólisis. Cabe destacar que no se detectó aumento en los niveles de ATP cuando las células gliales se incubaron solo con DETA-NO, probablemente debido al mayor consumo de ATP necesario para el mantenimiento y/o incremento en el  $\Delta\psi_m$  (Almeida A. *et al.*, 2001). La co-exposición de DETA-NO + EFV dio lugar a una potenciación clara de sus efectos individuales sobre los parámetros mitocondriales en ambas neuronas y células gliales, y el aumento de la generación de ATP y la producción de lactato en estas últimas. En términos de la viabilidad celular, el co-tratamiento DETA-NO + EFV no aumentó el descenso en el número de células gliales, pero hizo agravar el efecto perjudicial del NO sobre las neuronas (Figura V.2.). Así mismo, en la determinación de la presencia de apoptosis, un resultado similar fue observado en las líneas celulares de cáncer humano y en las células primarias de rata, donde el efecto de la inducción de apoptosis se vio potenciado por el co-tratamiento DETA-NO + EFV solamente en las neuronas. Un problema a veces relacionado con estos modelos experimentales es el uso de los donadores de NO, ya que muchos de estos (como los del grupo S-nitrosotiol) tienen efectos biológicos independientes al NO. Para obtener conclusiones útiles, es recomendable comprobar si los efectos de un donador de NO se deben al NO o a la molécula donante, esto se realiza bloqueando el efecto del donador de NO con un eliminador de NO (como la hemoglobina o PTIO) (Brown G.C, 2010). Con respecto a lo anterior se evaluó si el efecto del DETA-NO observado en las células gliales y en neuronas diferenciadas era debido al NO liberado y para ello, en los tratamientos con DETA-NO se adicionó el PTIO observándose que el incremento del superóxido mitocondrial fue totalmente revertido, y parcialmente revertido el efecto en el número de células, lo que sugirió que los efectos observados después de la incubación con DETA-NO eran producidos por el NO.

El hecho que los efectos de EFV se exacerban en presencia de un estímulo pro-inflamatorio como lo es el NO puede ser de gran importancia, ya que el exceso de NO podría mediar vías pro-inflamatorias en el cerebro mediante la activación de la muerte celular por apoptosis o estrés oxidativo/nitrosativo, ambos documentados en pacientes infectados por VIH (Li W. *et al.*, 2005; Li W. *et al.*, 2008).

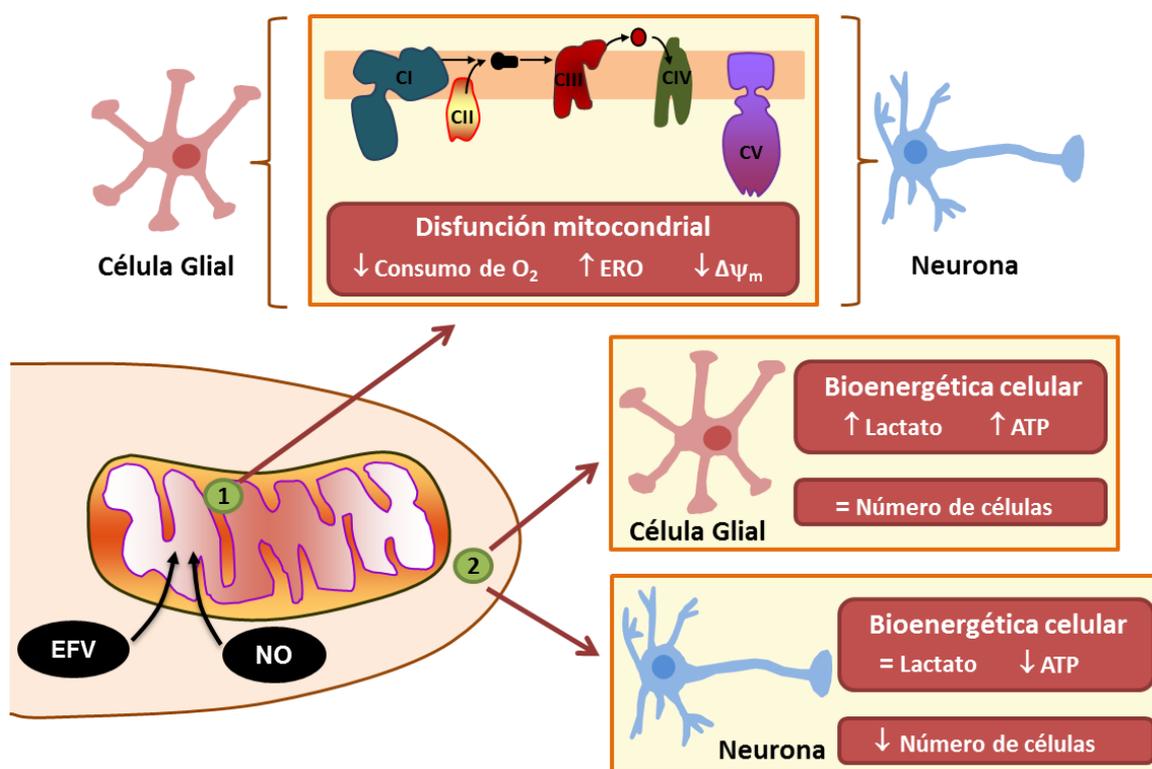


Figura V.2. Los efectos de EFV sobre las células gliales y neuronas se vieron agravados en presencia de un estímulo pro-inflamatorio. El NO (en forma de DETA-NO), un estimulador pro-inflamatorio y modulador mitocondrial, se utilizó en co-tratamiento con EFV dando lugar a: (1) una clara potenciación sobre sus efectos individuales ejercidos en los parámetros mitocondriales de las células gliales y neuronas, y (2) el co-tratamiento (NO + EFV) provocó una mayor generación de ATP y producción de lactato en las células gliales, por el contrario, disminuyó los niveles de ATP en las neuronas. Además, en términos de viabilidad celular el co-tratamiento no aumentó el descenso en el número de células gliales producido por el NO, pero hizo agravar el efecto dañino del NO en las neuronas.

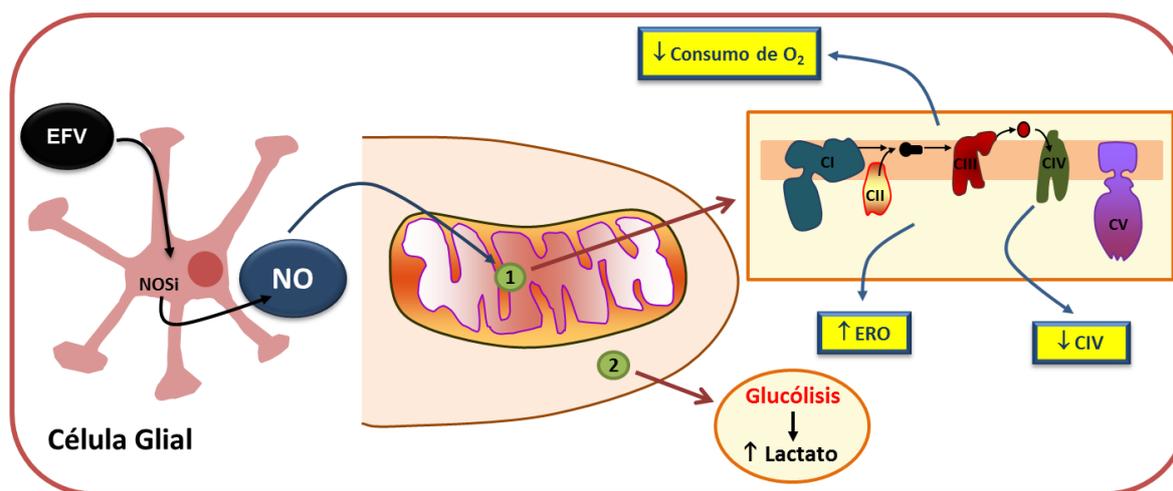
En el presente estudio también se pretendió profundizar sobre los mecanismos por los que EFV altera la función mitocondrial; esto se realizó mediante la evaluación de su capacidad de regular la expresión de NO en neuronas y células gliales. Nuestros resultados demuestran que las concentraciones clínicamente relevantes de EFV inducen la expresión de la NOS<sub>i</sub> y por lo tanto la producción de NO en las células gliales, y que el NO generado de esta manera participa en los efectos inhibitorios mitocondriales de EFV. En cambio, inducción de la isoforma de la NOS predominante en las neuronas (NOS<sub>n</sub>) no fue registrada después de la

exposición a EFV. Es bien conocido que el NO interfiere con la función mitocondrial y que la magnitud de este efecto depende de la cantidad de NO presente. Está ampliamente descrito que las cantidades de NO producidos después de la expresión de la NOSi por mediadores inflamatorios, resultan en daño persistente del CIV, y que además de esta acción, también se sabe que el NO puede actuar de una manera compleja en la mitocondria. En primer lugar, su reacción con superóxido genera peroxinitrito, un radical perjudicial cuya producción se potencia en situaciones de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, el cual puede inhibir persistentemente la actividad del CI y del CIV (Szabó C., 2003). En segundo lugar, el NO puede interferir con la actividad del CIII e incrementar la producción de superóxido mitocondrial al impedir la transferencia de electrones (Poderoso J.J. *et al.*, 1996). Con respecto al papel del NO en la mitocondria anteriormente mencionado, nuestros resultados mostraron que no se encontró aumento de los niveles intracelulares de peroxinitrito en las células gliales (U-251MG) al incubarse con EFV en cualquiera de los períodos de tiempo estudiados (6 y 24 h). Sin embargo, no podemos descartar la formación de peroxinitrito ya que la detección podría tener limitación. Es decir, la medición se realizó utilizando la sonda fluorescente DHR 123 que detecta el contenido peroxinitrito intracelular sin ubicación específica (Crow J.P., 1997), sin embargo su nivel intramitocondrial podría ser mayor. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que EFV conduce a un incremento importante en la producción de superóxido mitocondrial y el peroxinitrito sólo se genera a nivel local cuando NO encuentra condiciones de estrés oxidativo. Además, se pudo observar en las células gliales que largos períodos de exposición a EFV (25  $\mu$ M) resultaron en una disminución de la actividad del CIII y CIV (6 y 24 h respectivamente), un efecto que es consistente con el aumento del nivel intracelular de NO que sólo fue detectado en estas células. Como control en estos experimentos se empleó DETA-NO, cuya adición comprometía la actividad CIV tan pronto como 1 h después de tratamiento. Así mismo, el nivel de NO detectado después de la adición de DETA-NO (evaluado con la sonda fluorescente DAR-4M AM) fue ligeramente más alto que el alcanzado por la exposición a EFV, lo que en parte puede explicar la ausencia del efecto inducido por EFV sobre el CIV a tiempos cortos. Así mismo, la posibilidad de que la presencia de NO fuese la causa de la disminución en la actividad del CIV observada en las células gliales fue confirmada debido a que este efecto fue invertido cuando un inhibidor de

la NOS (L-NAME) estuvo presente durante todo el tiempo de exposición a EFV. Esta disminución de la actividad del CIV causada por EFV, está parcialmente de acuerdo con un estudio realizado en ratones (homogenado cerebral) tratados con EFV que describe la inhibición de la actividad del CIV en diferentes áreas del cerebro (Streck E.L. *et al.*, 2011), sin embargo, este estudio no mostró alteración en el CI. Estas discrepancias apuntan a la necesidad de analizar en más profundidad el efecto de EFV sobre la CTE mitocondrial. Además, se deben tener en cuenta las diferencias en las condiciones experimentales. *In vitro* las preparaciones de células y de tejidos están expuestas a concentraciones de O<sub>2</sub> atmosféricas ( $\pm$  175 - 200  $\mu$ M), mientras que *in vivo* son sometidas a concentraciones de O<sub>2</sub> que son un orden de magnitud inferior ( $\pm$  10 - 30  $\mu$ M). Esto implica que las concentraciones de NO necesarios para bloquear la actividad de la CcO *in vivo* son mucho más bajas que las necesarias para afectar a la actividad de la enzima en condiciones experimentales *in vitro*, y sugieren que el metabolismo energético neuronal se vería comprometido en condiciones patológicas asociadas con la reducción del suministro de sangre al cerebro, como en el caso de un accidente cerebrovascular. Sin embargo, se ha informado que el estado reducido de la CcO en el tejido cerebral de ratas adultas sometidas a isquemia transitoria no es impedida por la administración exógena de inhibidores de la NOS (De Visscher G. *et al.*, 2002), lo que va en contra de un posible papel de la inhibición reversible de la CcO por el NO *in vivo*. Sin embargo, estos resultados han sido cuestionados puesto que no está claro si, en el cerebro adulto, los inhibidores de la NOS utilizados cruzaron la BHE (Cooper C.E. and Brown G.C., 2008). En consecuencia, el papel del NO en la modulación de forma reversible de la actividad cerebral de la CcO *in vivo* aún no se ha aclarado por completo.

Además, nuestros resultados demostraron que el incremento de los niveles de NO en las células gliales tuvo efecto sobre su función mitocondrial, ya que la inhibición farmacológica no selectiva de las isoformas de la NOS revirtió parcialmente las acciones de EFV sobre la respiración mitocondrial y la generación de superóxido, efecto que no se observó en las neuronas, sugiriendo una clara implicación de la participación específica de la NOS<sub>i</sub> en las acciones de este fármaco anti-VIH sobre las células gliales. También demostramos que el NO derivado de la NOS<sub>i</sub> parece ser relevante para los efectos bioenergéticos de EFV observados

en las células gliales, ya que participó en la regulación de la glucólisis que sigue a la interferencia mitocondrial inducida por este fármaco (Figura V.3.). Teniendo en cuenta que el tratamiento del VIH es de por vida, más investigaciones son imprescindibles para evaluar si el NO inducido por EFV juega un papel en el desarrollo a largo plazo de los síntomas neuroinflamatorios del VIH en el SNC, tales como HAND.



**Figura V.3.** El NO inducido por EFV interfiere con la función mitocondrial y la bioenergética en las células gliales. EFV es capaz de regular a la alza a la isoforma inducible de la NOS (NOSi), produciendo así NO en las células gliales, efecto que no fue observado en las neuronas. El incremento de los niveles de NO mediados por EFV tuvo un efecto sobre: (1) la función mitocondrial de las células gliales, al participar en la disminución del consumo total de O<sub>2</sub>, en el incremento del superóxido mitocondrial y en la reducción de la actividad de la citocromo c oxidasa (CIV), (2) la bioenergética en las células gliales, ya que participa en la regulación de la glucólisis (incrementando el lactato extracelular) seguida de la interferencia mitocondrial inducida por EFV. Los efectos provocados por EFV en las células gliales fueron parcial o totalmente restaurados cuando la NOS fue farmacológicamente inhibida, implicando claramente una participación específica de la NOSi en las acciones de este fármaco.

En esta línea, es relevante recordar que las células gliales son un importante reservorio de VIH que puede promover la existencia de un medio inflamatorio confinado en el que las neuronas estarían continuamente bajo la acción del NO. La relevancia de esta hipótesis y, específicamente, en el contexto de efectos sobre el SNC inducidos por EFV necesita más evaluación, pero, como ya se ha mencionado, un escenario de supervivencia de las células

gliales y degeneración de las neuronas con signos de disfunción mitocondrial y severo estrés oxidativo se ha asociado con HAND (Saha R.N. and Pahan K., 2007). A pesar de una extensa investigación, la patogénesis de HAND todavía no está clara. Sin embargo, los estudios se centran en los factores que contribuyen a la patogénesis, incluyendo al virus en sí y sus productos virales, a la inflamación sistémica y persistente del SNC, el envejecimiento en el cerebro infectado por el VIH, la distribución del subtipo del VIH, el uso concomitante de drogas de abuso (en particular, cocaína y metanfetamina) y el potencial de neurotoxicidad de los antirretrovirales (Antinori A. *et al.*, 2007; Grant I., 2008). Aunque la forma más severa de HAND es poco frecuente debido a la terapia antirretroviral, la persistencia de las formas más leves funcionalmente importantes de HAND persisten hasta en la mitad de las personas infectadas por el VIH. Teniendo este hecho en cuenta y debido a que EFV es uno de los antirretrovirales más neurotóxicos, su conexión con las causas que desarrollan a HAND deben de ser analizadas. Sin embargo, un estudio reciente en Shanghai, China ha mostrado que más de la mitad (59,2%) de los pacientes infectados por el VIH ( $CD4^+ \leq 350$  células/ $\mu$ L) desarrollaron HAND y que este resultado está asociado con el hecho de ser una persona mayor, ser mujer, tener un bajo nivel de educación, y con recibir tratamiento con EFV durante un largo período (Wang Z. *et al.*, 2013). Además, EFV conlleva a un riesgo mayor de HAND que otros antirretrovirales, ya que en un estudio, casi el 50% de los pacientes que estaban bajo terapia con EFV durante más de un año mostraron deterioro cognitivo, en particular en el funcionamiento ejecutivo (Ciccarelli N. *et al.*, 2011). Otro estudio describe una menor mejoría en la función neurocognitiva de sujetos neuro-asintomáticos infectados por el VIH hasta 48 semanas después de haber iniciado la terapia antirretroviral que contenía EFV en comparación con otras terapias que no lo contenían (Winston A. *et al.*, 2012). Así mismo, nuestros datos son compatibles con la evidencia previa de que EFV exacerba parámetros asociados con la inflamación del SNC, puesto que tiene la capacidad de inducir la liberación del ligando CD40 soluble, mediador inflamatorio que se ha visto estar a niveles elevados tanto en el plasma y en LCR de los individuos infectados con VIH que presentan deterioro cognitivo, y cuyo exceso puede contribuir a la permeabilidad *in vivo* de la BHE, teniendo así un papel creciente e importante en la patogénesis de la neuroinflamación asociada al VIH (Davidson D.C. *et al.*, 2013). También, un estudio reciente *in vivo* e *in vitro* ha

descrito que EFV tiene la capacidad de generar a través del estrés oxidativo beta-amiloides (A $\beta$ ) en el cerebro, péptidos que son neurotóxicos, y mediadores de la inflamación, relacionando de esta forma a EFV con la neurodegeneración, específicamente con la enfermedad de Alzheimer (Brown L.A. *et al.*, 2014). Este resultado es de gran relevancia debido a que se sabe que existen similitudes patológicas entre HAND y la enfermedad de Alzheimer (Clifford D.B. *et al.*, 2009).

En conclusión, nuestro estudio demuestra que el tratamiento de neuronas y células gliales con concentraciones plasmáticas relevantes de EFV ejerce un efecto directo y específico en su balance energético y viabilidad a través de un mecanismo que implica la disfunción aguda mitocondrial, que depende de la concentración y del tiempo de exposición al fármaco. Esta acción podría ser exacerbada en condiciones neuroinflamatorias (presencia de NO) como las que a menudo se presentan en pacientes infectados por VIH. Además, EFV es capaz de inducir la síntesis de NO y, en consecuencia, este NO parece ser relevante en la interferencia mitocondrial y en los efectos bioenergéticos generados por EFV en las células gliales, un efecto que no ocurre en las neuronas. Debido al hecho de que EFV es un fármaco ampliamente utilizado en la TARGA y que el tratamiento del VIH es de por vida, dichas respuestas celulares a la exposición a EFV, pueden arrojar luz sobre los mecanismos de los efectos adversos de este fármaco en el SNC, incluyendo los síntomas neuropsiquiátricos que aparecen poco después del inicio del tratamiento con EFV, que a veces es acompañado de la neuroinflamación, y de efectos a largo plazo, como lo es HAND.



## **VI. CONCLUSIONES**



1. En ambos tipos celulares, gliales y neuronas, EFV produce una alteración en la función mitocondrial manifestada por la inhibición directa del Complejo I de la CTE, disminución en el consumo total de O<sub>2</sub>, incremento de la producción de ERO mitocondriales y reducción del  $\Delta\Psi_m$ .
2. La disfunción mitocondrial producida por EFV ejerce como consecuencia un efecto citotóxico dependiente de la concentración que se manifiesta como disminución de la viabilidad celular y del número de células. Este efecto se observó después de 24 h de tratamiento y fue mayor en las neuronas que en las células gliales.
3. A poco tiempo de exposición (1 h), EFV provoca en ambos tipos celulares una disminución tanto en la capacidad respiratoria de reserva, así como, en la capacidad respiratoria máxima, haciendo que sus mitocondrias operen más cerca de su límite bioenergético.
4. Concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes de los nuevos anti-VIH, RPV, RAL y DRV no afectan a la función mitocondrial o ponen en riesgo la viabilidad celular de las neuronas, a diferencia de lo observado con EFV.
5. EFV genera una respuesta diferencial en la bioenergética de las células gliales y de las neuronas, manifestada por la activación de la AMPK de una forma dependiente de la concentración en las células gliales, dando lugar a la regulación al alza de la glucólisis y en consecuencia al incremento de los niveles de ATP intracelular, respuestas que no se observaron en las neuronas.
6. Los efectos mitocondriales de EFV sobre las células gliales y neuronas se agravan en presencia del NO, mientras que los efectos en la bioenergética de las células gliales se ven potenciados, exhibidos por una mayor producción de lactato extracelular e incremento en los niveles de ATP intracelular. Situación contraria se observa en las

neuronas, donde la presencia del NO disminuye aún más los niveles de ATP intracelular.

7. En términos de viabilidad celular el co-tratamiento de NO y EFV no provoca un mayor descenso en el número de células gliales al producido por el NO pero sí agrava el efecto dañino del NO en las neuronas. Además este co-tratamiento, respecto a sus efectos individuales, no produce alteraciones en la activación de la apoptosis en las células gliales, sin embargo, provoca una mayor activación de la apoptosis en las neuronas.
  
8. En células gliales pero no en neuronas, EFV induce la expresión a la alza de la isoforma inducible de la NOS, incrementando así la producción de NO, efecto que interviene en la alteración de la función mitocondrial y en la respuesta bioenergética provocadas por este fármaco en las células gliales.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



**Abdul-Ghani M.A., DeFronzo R.A.** Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2008; 8:173-8.

**Abe Y., Sakairi T., Kajiyama H., Shrivastav S., Beeson C., Kopp J.B.** Bioenergetic characterization of mouse podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299:C464-76.

**Abers M.S., Shandera W.X., Kass J.S.** Neurological and psychiatric adverse effects of antiretroviral drugs. *CNS Drugs* 2014; 28:131-45.

**Adamson D.C., Wildemann B., Sasaki M., Glass J.D., McArthur J.C., Christov V.I., Dawson T.M., Dawson V.L.** Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* 1996; 274:1917-21.

**Adamson D.C., McArthur J.C., Dawson T.M., Dawson V.L.** Rate and severity of HIV-associated dementia (HAD): correlations with Gp41 and iNOS. *Mol Med* 1999; 5:98-109.

**AIDSinfo (a service of the U.S. Department of Health and Human Services).** Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. <http://aidsinfo.nih.gov/Guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv-guidelines/10/initiating-art-in-treatment-naïve-patients> (16 May 2014, date last accessed).

**Almeida A. and Medina J.M.** A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998; 2:209-14.

**Almeida A. and Bolaños J.P.** A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2001; 77:676-90.

**Almeida A., Almeida J., Bolaños J.P., Moncada S.** Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:15294-9.

**Almeida A., Moncada S., Bolaños J.P.** Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6:45-51.

**Almeida A., Bolaños J.P., Moreno S.** Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 2005; 25:8115-21.

**Anderson P.L., Lamba J., Aquilante C.L., Schuetz E., Fletcher C.V.** Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 441-49.

**Amacher D.E.** Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. *Curr Med Chem* 2005; 12:1829-39.

**Anthony I.C., Ramage S.N., Carnie F.W., Simmonds P., Bell J.E.** Influence of HAART on HIV-related CNS disease and neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64:529-36.

**Anthony I.C. and Bell J.E.** The Neuropathology of HIV/AIDS. *Int Rev Psychiatry* 2008; 20:15-24.

**Antinori A., Arendt G., Becker J.T., Brew B.J., Byrd D.A., Cherner M., Clifford D.B., Cinque P., Epstein L.G., Goodkin K., Gisslen M., Grant I., Heaton R.K., Joseph J., Marder K., Marra C.M., McArthur J.C., Nunn M., Price R.W., Pulliam L., Robertson K.R., Sacktor N., Valcour V., Wojna V.E.** Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007; 69:1789-99.

**Arendt G., de Nocker D., von Giesen H.J., Nolting T.** Neuropsychiatric side effects of efavirenz therapy. *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6:147-54.

**Argilés J.M., Busquets S., López-Soriano F.J.** The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:1145-52.

**Atluri V.S., Kanthikeel S.P., Reddy P.V., Yndart A., Nair M.P.** Human synaptic plasticity gene expression profile and dendritic spine density changes in HIV-infected human CNS cells: role in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *PLoS One* 2013; 8:e61399.

**Apostolova N., Gomez-Sucerquia L.J., Moran A., Alvarez A., Blas-García A., Esplugues J.V.** Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br J Pharmacol* 2010; 160:2069-84.

**Apostolova N., Blas-García A., Esplugues J.V.** Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol- $\gamma$  inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:715-25.

**Apostolova N., Gomez-Sucerquia L.J., Alegre F., Funes H.A., Victor V.M., Barrachina M.D., Blas-García A., Esplugues J.V.** ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *J Hepatol* 2013; 59:780-9.

**Avery L.B., Sacktor N., McArthur J.C., Hendrix C.W.** Protein-free efavirenz concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma are equivalent: applying the law of mass action to predict protein-free drug concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:1409-14.

**Baliga R.S., Liu C., Hoyt D.G., Chaves A.A., Bauer J.A.** Vascular endothelial toxicity induced by HIV protease inhibitor: evidence of oxidant-related dysfunction and apoptosis. *Cardiovasc Toxicol* 2004; 4:199-206.

**Balzarini J.** Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives. *Pharm World Sci* 1994; 16:113-26.

**Bal-Price A. and Brown G.C.** Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* 2000; 75:1455-64.

**Bal-Price A., Moneer Z., Brown G.C.** Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 2002(a); 40:312-23.

**Bal-Price A., Matthias A., Brown G.C.** Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem* 2002(b); 80:73-80.

- Banerjee A., Zhang X., Manda K.R., Banks W.A., Ercal N.** HIV proteins (gp120 and Tat) and methamphetamine in oxidative stress-induced damage in the brain: potential role of the thiol antioxidant N-acetylcysteine amide. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1388-98.
- Banki K., Hutter E., Gonchoroff N.J., Perl A.** Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by transaldolase. *J Biol Chem* 1998; 273: 11944-53.
- Barker J.E., Bolaños J.P., Land J.M., Clark J.B., Heales S.J.R.** Glutathione protects astrocytes from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/astrocytic trafficking and neurodegeneration. *Dev Neurosci* 1996; 18:391-96.
- Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L.** Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.
- Beasley A., Anderson C., McArthur J., Sacktor N., Nath A., Cotter R.** Characterization of Nitrotyrosine-Modified Proteins in Cerebrospinal Fluid. *Clin. Proteomics* 2010; 1:29-41.
- Bell G.I., Burant C.F., Takeda J., Gould G.W.** Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 1993; 268:19161-64.
- Bell J.E.** An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology* 2004; 45:549-59.
- Beltrán B., Mathur A., Duchon M.R., Erusalimsky J.D., Moncada S.** The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:14602-7.
- Ben-Romano R., Rudich A., Etzion S., Potashnik R., Kagan E., Greenbaum U., Bashan N.** Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir Ther* 2006; 11:1051-60.

**Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D.** Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J Neurochem* 1996; 66:2329-37.

**Best B.M., Koopmans P.P., Letendre S.L., Capparelli E.V., Rossi S.S., Clifford D.B., Collier A.C., Gelman B.B., Mbeo G., McCutchan J.A., Simpson D.M., Haubrich R., Ellis R., Grant I.; CHARTER Group.** Efavirenz concentrations in CSF exceed IC50 for wild-type HIV. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:354-7.

**Bilgrami M. and O'Keefe P.** Neurologic diseases in HIV-infected patients. *Handb Clin Neurol* 2014; 121:1321-44.

**Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5:9-19.

**Blas-García A., Apostolova N., Ballesteros D., Monleón D., Morales J.M., Rocha M., Victor V.M., Esplugues J.V.** Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. *Hepatology*. 2010; 52:115-25.

**Blas-García A., Esplugues J.V., Apostolova N.** Twenty years of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: time to reevaluate their toxicity. *Curr Med Chem* 2011(a); 18:2186-95.

**Blas-García A., Apostolova N., Esplugues J.V.** Oxidative stress and mitochondrial impairment after treatment with anti-HIV drugs: clinical implications. *Curr Pharm Des* 2011(b); 17:4076-86.

**Block M.L., Zecca L., Hong J.S.** Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:57-69.

**Bolaños J.P., Peuchen S., Heales S.J.R., Land J.M., Clark J.B.** Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1994; 63:910–16.

**Bolaños J.P., Heales S.J.R, Land J.M., and Clark J.B.** Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 1995; 64:1965–72.

**Bolaños J.P., García-Nogales P., and Almeida A.** Provoking neuroprotection by peroxynitrite. *Curr Pharm Design* 2004; 10:867–77.

**Bolaños J.P. and Almeida A.** Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:955-65.

**Bolaños J.P. and Heales S.J.** Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. *Front Neuroenergetics* 2010; 2:1.

**Bolaños J.P., Almeida A., Moncada S.** Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* 2010; 35:145-9.

**Bonfoco E., Krainc C., Ankarcrona M., Nicotera P., and Lipton S.A.** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-Daspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7162–66.

**Bonfanti P., Valsecchi L., Parazzini F., Carradori S., Pusterla L., Fortuna P., Timillero L., Alessi F., Ghiselli G., Gabbuti A., Di Cintio E., Martinelli C., Faggion I., Landonio S., Quirino T.** Incidence of adverse reactions in HIV patients treated with protease inhibitors: a cohort study. Coordinamento Italiano Studio Allergia e Infezione da HIV (CISAI) Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:236–45.

**Bonthius D.J., Luong T., Bonthius N.E., Hostager B.S., Karacay B.** Nitric oxide utilizes NF-kappaB to signal its neuroprotective effect against alcohol toxicity. *Neuropharmacology* 2009; 56:716-31.

**Borutaite V., Budriunaite A., Brown G.C.** Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1459:405-12.

**Borutaite V. and Brown G.C.** S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757:562-6.

**Boven L.A., Gomes L., Hery C., Gray F., Verhoef J., Portegies P., Tardieu M., Nottet H.S.** Increased peroxynitrite activity in AIDS dementia complex: implications for the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Immunol* 1999; 162:4319-27.

**Boveris A. and Cadenas E.** Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 1975; 54:311-4.

**Brandmann M., Tulpule K., Schmidt M.M., Dringen R.** The antiretroviral protease inhibitors indinavir and nelfinavir stimulate Mrp1-mediated GSH export from cultured brain astrocytes. *J Neurochem* 2012; 120:78-92.

**Brandmann M., Nehls U., Dringen R.** 8-Hydroxy-efavirenz, the primary metabolite of the antiretroviral drug Efavirenz, stimulates the glycolytic flux in cultured rat astrocytes. *Neurochem Res* 2013; 38:2524-34.

**Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H.** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347:768-70.

**Brinkman K., ter Hofstede H.J., Burger D.M., Smeitink J.A., Koopmans P.P.** Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998; 12:1735-44.

**Brorson J.R., Schumacker P.T., and Zhang H.** Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy metabolism. *J Neurosci* 1999; 19:147-58.

**Brown G.C., Bolaños J.P., Heales S.J., Clark J.B.** Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett* 1995; 193:201-4.

**Brown G.C. and Borutaite V.** Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1440-50.

**Brown G.C. and Bal-Price A.** Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 2003; 27:325-55.

**Brown G.C. and Borutaite V.** Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1658:44-9.

**Brown G.C.** Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010; 23:153-65.

**Brown G.C. and Neher J.J.** Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 2010; 41:242-7.

**Brown L.A., Jin J., Ferrell D., Sadic E., Obregon D., Smith A.J., Tan J., Giunta B.** Efavirenz promotes  $\beta$ -secretase expression and increased A $\beta$ 1-40,42 via oxidative stress and reduced microglial phagocytosis: implications for HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *PLoS One* 2014; 9:e95500.

**Bumpus N.N., Kent U.M., Hollenberg P.F.** Metabolism of efavirenz and 8-hydroxyefavirenz by P450 2B6 leads to inactivation by two distinct mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318:345-51.

**Bumpus N.N.** Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 257:227-34.

**Burger D., van der Heiden I., la Porte C., van der Ende M., Groeneveld P., Richter C., Koopmans P., Kroon F., Sprenger H., Lindemans J., Schenk P., van Schaik R.** 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* 2006; 61:148-54.

**Bustamante J., Czerniczyniec A., Lores-Arnaiz S.** Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; 12:1034-40.

**Butterfield D.A., Reed T., Sultana R.** Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 2011; 45:59-72.

**Cardenas V.A., Meyerhoff D.J., Studholme C., Kornak J., Rothlind J., Lampiris H., Neuhaus J., Grant R.M., Chao L.L., Truran D., Weiner M.W.** Evidence for ongoing brain injury in human immunodeficiency virus-positive patients treated with antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2009; 15:324-33.

**Carilla-Latorre S., Gallardo M.E., Annesley S.J., Calvo-Garrido J., Graña O., Accari S.L., Smith P.K., Valencia A., Garesse R., Fisher P.R., Escalante R.** MidA is a putative methyltransferase that is required for mitochondrial complex I function. *J Cell Sci* 2010; 123:1674-83.

**Carling D.** The AMP-activated protein kinase cascade—aunifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:18–24.

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

**Caron-Debarle M., Lagathu C., Boccara F., Vigouroux C., Capeau J.** HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 2010; 16:218-29.

**Carr D.F., la Porte C.J., Pirmohamed M., Owen A., Cortes C.P.** Haplotype structure of CYP2B6 and association with plasma efavirenz concentrations in a Chilean HIV cohort. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1889-93.

**Cataldi A.** Cell responses to oxidative stressors. *Curr Pharm Des* 2010; 16:1387-95.

**Cavalcante G.I., Capistrano V.L., Cavalcante F.S., Vasconcelos S.M., Macêdo D.S., Sousa F.C., Woods D.J., Fonteles M.M.** Implications of efavirenz for neuropsychiatry: a review. *Int J Neurosci* 2010; 120(12):739-45.

- Chandra S., Mondal D., Agrawal K.C.** HIV-1 protease inhibitor induced oxidative stress supresses glucose stimulated insulin release: protection with tymoquinone. *Exp Biol Med* 2009; 234:442-452.
- Chen M., Sun H.Y., Li S.J., Das M., Kong J.M., Gao T.M.** Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals* 2009; 17:162-8.
- Chiao S.K., Romero D.L., Johnson D.E.** Current HIV therapeutics: mechanistic and chemical determinants of toxicity. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; 12:53-60.
- Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., Kim Y.M.** Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:1075-9.
- Ciccarelli N., Fabbiani M., Di Giambenedetto S., Fanti I., Baldonero E., Bracciale L., Tamburrini E., Cauda R., De Luca A., Silveri M.C.** Efavirenz associated with cognitive disorders in otherwise asymptomatic HIV-infected patients. *Neurology* 2011; 76:1403-9.
- Circu M.L. and Aw T.Y.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 749-62.
- Clark L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z.** Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* 1953; 6:189-93.
- Clarke D.D. and Sokoloff L.** Circulation and energy metabolism. In: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D., editors. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and clinical aspects*, 6th ed. New York: Raven Press, 1999; 637–69.
- Clifford D.B., Fagan A.M., Holtzman D.M., Morris J.C., Teshome M., Shah A.R., Kauwe J.S.** CSF biomarkers of Alzheimer disease in HIV-associated neurologic disease. *Neurology* 2009; 73:1982-7.
- Clumeck N., Pozniak A., Raffi F., EACS Executive Committee.** European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med* 2008; 9:65-71.

- Cooper C.E. and Giulivi C.** Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C1993-2003.
- Cooper C.E. and Brown G.C.** The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40:533-9.
- Court O., Kumar A., Parrillo J.E., Kumar A.** Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002; 6:500-8.
- Crandall K.A.** Human Immunodeficiency Viruses (HIV). In: eLS-John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2001. <http://www.esl.net> [doi:10.1038/npg.els.0000417].
- Crow J.P.** Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1997; 1:145-57.
- Culmsee C., Monnig J., Kemp B.E., Mattson M.P.** AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* 2001; 17:45-58.
- Dalakas M.C., Semino-Mora C., Leon-Monzon M.** Mitochondrial alterations with mitochondrial DNA depletion in the nerves of AIDS patients with peripheral neuropathy induced by 2030- dideoxycytidine (dideoxycytidine). *Lab Invest* 2001; 81:1537-44.
- Danielson S.R., Held J.M., Schilling B., Oo M., Gibson B.W., Andersen J.K.** Preferentially increased nitration of alpha-synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. *Anal Chem* 2009; 81:7823-8.
- Davidson D.C., Hirschman M.P., Sun A., Singh M.V., Kasischke K., Maggirwar S.B.** Excess soluble CD40L contributes to blood brain barrier permeability in vivo: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. *PLoS One* 2012; 7:e51793.

**Davidson D.C., Jackson J.W., Maggirwar S.B.** Targeting platelet-derived soluble CD40 ligand: a new treatment strategy for HIV-associated neuroinflammation? *J Neuroinflammation* 2013; 10:144.

**Davis C.W., Hawkins B.J., Ramasamy S., Irrinki K.M., Cameron B.A., Islam K., Daswani V.P., Doonan P.J., Manevich Y., Madesh M.** Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48:306-17.

**Dawson V.L., Dawson T.M., Uhl G.R., Snyder S.H.** Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3256-9.

**de Béthune M.P.** 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* 2010; 85:75-90.

**de Moura M.B., dos Santos L.S., Van Houten B.** Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51: 391-405.

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

**De Clercq E.** Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33:307-20.

**De Cock K.M., Adjorlolo G., Ekpini E., Sibailly T., Kouadio J., Maran M., Brattegaard K., Vetter K.M., Doorly R., Gayle H.D.** Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA* 1993; 270:2083-6.

**Delgado-Esteban M., Almeida A., Bolaños J.P.** D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J Neurochem* 2000; 75:1618-24.

**Desta Z., Saussele T., Ward B., Bliedernicht J., Li L., Klein K., Flockhart D.A., Zanger U.M.** Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* 2007; 8:547-58.

**De Visscher G., Springett R., Delpy D.T., Van Reempts J., Borgers M., van Rossem K.** Nitric oxide does not inhibit cerebral cytochrome oxidase in vivo or in the reactive hyperemic phase after brief anoxia in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:515-9.

**Dringen R.** Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62:649-71.

**Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.

**Duprez L., Wirawan E., Vanden Berghe T., Vandenabeele P.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 2009; 11:1050-62.

**Eisfeld C., Reichelt D., Evers S., Husstedt I.** CSF penetration by antiretroviral drugs. *CNS Drugs* 2013; 27:31-55.

**Ellis R.J., Marquie-Beck J., Delaney P., Alexander T., Clifford D.B., McArthur J.C., Simpson D.M., Ake C., Collier A.C., Gelman B.B., McCutchan J.A., Morgello S., Grant I; CHARTER Group.** Human immunodeficiency virus protease inhibitors and risk for peripheral neuropathy. *Ann Neurol* 2008; 64:566–72.

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

**Erecińska M., Deas J., Silver I.A.** The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes. *J Neurochem* 1995; 65:2765-72.

**Esplugues J.V.** NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 2002; 135:1079-95.

**Evans S.R., Ellis R.J., Chen H., Yeh T.M., Lee A.J., Schifitto G., Wu K., Bosch R.J., McArthur J.C., Simpson D.M., Clifford D.B.** Peripheral neuropathy in HIV: prevalence and risk factors. *AIDS* 2011; 25:919–28.

**Evans W.E. and McLeod H.L.** Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348:538-49.

**Faggian F., Lattuada E., Lanzafame M., Antolini D., Concia E., Vento S.** Recreational substance use and tolerance of efavirenz in HIV-1 infected patients. *AIDS Care* 2005; 17:908-10.

**Fauci A.S., Folkers G.K., Dieffenbach C.W.** HIV-AIDS: much accomplished, much to do. *Nat Immunol* 2013; 14:1104-7.

**Feeney E.R. and Mallon P.W.** Impact of mitochondrial toxicity of HIV-1 antiretroviral drugs on lipodystrophy and metabolic dysregulation. *Curr Pharm Des* 2010; 16:3339-51.

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

**Fernández-Checa J.C., Fernández A., Morales A., Marí M., García-Ruiz C., Colell A.** Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol Disor Drug Targets* 2010; 9: 439-454.

**Ferrari L.F. and Levine J.D.** Alcohol consumption enhances antiretroviral painful peripheral neuropathy by mitochondrial mechanisms. *Eur J Neurosci* 2010; 32:811-8.

**Ferrer-Sueta G. and Radi R.** Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 2009; 4:161-77.

**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.** The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987 Jul; 317:185-91.

**Fisslthaler B., Fleming I.** Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* 2009; 105:114-27.

**Franco M.C., Ye Y., Refakis C.A., Feldman J.L., Stokes A.L., Basso M., Melero Fernández de Mera R.M., Sparrow N.A., Calingasan N.Y., Kiaei M., Rhoads T.W., Ma T.C., Grumet M., Barnes S., Beal M.F., Beckman J.S., Mehl R., Estévez A.G.** Nitration of Hsp90 induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E1102-11.

**Fumaz C.R., Tuldrà A., Ferrer M.J., Paredes R., Bonjoch A., Jou T., Negro E., Romeu J., Sirera G., Tural C., Clotet B.** Quality of life, emotional status, and adherence of HIV-1-infected patients treated with efavirenz versus protease inhibitor-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:244-53.

**Fumaz C.R., Muñoz-Moreno JA, Moltó J, Negro E, Ferrer MJ, Sirera G, Pérez-Alvarez N, Gómez G, Burger D, Clotet B.** Long-term neuropsychiatric disorders on efavirenz-based approaches: quality of life, psychologic issues, and adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:560-5.

**Fuentes-Prior P. and Salvesen G.S.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004; 384:201-32.

**Galluzzi L., Kepp O., Trojel-Hansen C., Kroemer G.** Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 2012; 111:1198-207.

**Gannon P., Khan M.Z., Kolson D.L.** Current understanding of HIV-associated neurocognitive disorders pathogenesis. *Curr Opin Neurol* 2011; 24:275-83.

**García-Nogales P., Almeida A., Bolaños J.P.** Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *J Biol Chem* 2003; 278:864-74.

**Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R.** Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336:385-8.

- Gaskill P.J., Calderon T.M., Coley J.S., Berman J.W.** Drug induced increases in CNS dopamine alter monocyte, macrophage and T cell functions: implications for HAND. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013; 8:621-42.
- Gatch M.B., Kozlenkov A., Huang R.Q., Yang W., Nguyen J.D., González-Maeso J., Rice K.C., France C.P., Dillon G.H., Forster M.J., Schetz J.A.** The HIV antiretroviral drug efavirenz has LSD-like properties. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38:2373-84.
- Gazzard B.G.** Controversies in current treatment guidelines. *J HIV Ther* 2008; 13:1-3.
- Gazzard B., Duvivier C., Zagler C., Castagna A., Hill A., van Delft Y., Marks S.** Phase 2 double-blind, randomized trial of etravirine versus efavirenz in treatment-naive patients: 48-week results. *AIDS* 2011; 25:2249-58.
- Gegg M.E., Beltran B., Salas-Pino S., Bolanos J.P., Clark J.B., Moncada S., Heales S.J.** Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* 2003; 86:228-37.
- Gelman B.B., Nguyen T.P.** Synaptic proteins linked to HIV-1 infection and immunoproteasome induction: proteomic analysis of human synaptosomes. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5:92-102.
- Gelman B.B.M. D.J.** HIV-1 Neuropathology. In: Gendelman HEG I., Everall I.P., Fox H.S., Gelbard H.A., Lipton S.A., Swindells S., editors. *The Neurology of AIDS*. New York: Oxford University Press; 2012 pp. 518–535.
- Gerlier D. and Thomasset N.** Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94:57-63.
- Gesida.** [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 2014)]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1-117.

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

**Golde S., Chandran S., Brown G.C., Compston A.** Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. *J Neurochem* 2002; 82:269-82.

**Goldstein S., Russo A., Samuni A.** Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with \*NO, \*NO<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>-. *J Biol Chem* 2003; 278:50949-55.

**Gounden V., van Niekerk C., Snyman T., George J.A.** Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. *AIDS Res Ther* 2010; 7:32. doi: 10.1186/1742-6405-7-32.

**Grant I.** Neurocognitive disturbances in HIV. *Int Rev Psychiatry* 2008; 20:33-47.

**Guo A.M., Sheng J., Scicli G.M., Arbab A.S., Lehman N.L., Edwards P.A., Falck J.R., Roman R.J., Scicli A.G.** Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327:10-9. doi: 10.1124/jpet.108.140889.

**Gutiérrez-Valencia A., Viciano P., Palacios R., Ruiz-Valderas R., Lozano F., Terrón A., Rivero A., López-Cortés L.F.; Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas.** Stepped-dose versus full-dose efavirenz for HIV infection and neuropsychiatric adverse events: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009; 151:149-56.

**Hagen T., Taylor C.T., Lam F., Moncada S.** Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF-1 alpha. *Science* 2003; 302:1975-78.

**Halliwell B. and Cross C.E.** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 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.; International AIDS Society-USA.** Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2008; 300:555-70.

**Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D., Cadenas E.** Voltage dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 2003; 278:5557-63.

**Hao Z., Cooney D.A., Farquhar D., Perno C.F., Zhang K., Masood R., Wilson Y., Hartman N.R., Balzarini J., Johns D.G.** Potent DNA chain termination activity and selective inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by 2', 3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate. *Mol. Pharmacol* 1990; 37:157-63.

**Hara M., Matsuda Y., Hirai K., Okumura N., Nakagawa H.** Characteristics of glucose transport in neuronal cells and astrocytes from rat brain in primary culture. *J. Neurochem* 1981; 52:902-08.

**Hara M.R., Thomas B., Cascio M.B., Bae B.I., Hester L.D., Dawson V.L., Dawson T.M., Sawa A., Snyder S.H.** Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:3887-9.

**Hardie D.G.** AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:774-85.

**Hausladen A. and Fridovich I.** Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 1994; 269:29405-08.

**He J., Kang H., Yan F., Chen C.** The endoplasmic reticulum-related events in S-nitrosoglutathione-induced neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Brain Res* 2004; 1015:25-33.

Heaton R.K., Clifford D.B., Franklin D.R. Jr., Woods S.P., Ake C., Vaida F., Ellis R.J., Letendre S.L., Marcotte T.D., Atkinson J.H., Rivera-Mindt M., Vigil O.R., Taylor M.J., Collier A.C., Marra C.M., Gelman B.B., McArthur J.C., Morgello S., Simpson D.M., McCutchan J.A., Abramson I., Gamst A., Fennema-Notestine C., Jernigan T.L., Wong J., Grant I; CHARTER Group. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 2010; 75:2087-96.

Heaton R.K., Franklin D.R., Ellis R.J., McCutchan J.A., Letendre S.L., Leblanc S., Corkran S.H., Duarte N.A., Clifford D.B., Woods S.P., Collier A.C., Marra C.M., Morgello S., Mindt M.R., Taylor M.J., Marcotte T.D., Atkinson J.H., Wolfson T., Gelman B.B., McArthur J.C., Simpson D.M., Abramson I., Gamst A., Fennema-Notestine C., Jernigan T.L., Wong J., Grant I; CHARTER Group; HNRC Group. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol* 2011; 17:3-16.

Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernández E., Maestre C., Moncada S., Bolaños J.P. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 2009; 11:747-52.

Herst P.M. and Berridge M.V. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767:170-7.

Hibbs J.B., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157:87-94.

Hofman P. and Nelson A.M. The pathology induced by highly active antiretroviral therapy against human immunodeficiency virus: an update. *Curr Med Chem* 2006; 13:3121-32.

Hulgan T., Morrow J., D'Aquila RT., Raffanti S., Morgan M., Rebeiro P., Hass D.W. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1711-17.

**Hulgan T., Haas D.W., Haines J.L., Ritchie M.D., Robbins G.K., Shafer R.W., Clifford D.B., Kallianpur A.R., Summar M., Canter J.A.** Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretrovirals therapy: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 2005; 19:1341–9.

**Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S.** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61:866-79.

**Jacobson J., Duchen M.R., Hothersall J., Clark J.B., Heales S.J.** Induction of mitochondrial oxidative stress in astrocytes by nitric oxide precedes disruption of energy metabolism. *J Neurochem* 2005; 95:388-95.

**Jagtap P. and Szabó C.** Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:421-40.

**Jamaluddin M.S., Lin P.H., Yao Q., Chen C.** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2010; 208:104-11.

**Jekabsone A., Neher J.J., Borutaite V., Brown G.C.** Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitises neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J Neurochem* 2007; 103:346-56.

**Jena A., Sachdeva R.K., Sharma A., Wanchu A.** Adverse drug reactions to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral regimen: a 24-week prospective study. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2009; 8:318-22.

**Jezek P. and Hlavatá L.** Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:2478-503.

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

**Karamchand L., Dawood H., Chuturgoon A.A.** Lymphocyte mitochondrial depolarization and apoptosis in HIV-1-infected HAART patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 48:381-8.

**Kasischke K.A., Vishwasrao H.D., Fisher P.J., Zipfel W.R., Webb W.W.** Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 2004; 305:99-103.

**Kaul M., Zheng J., Okamoto S., Gendelman H.E., Lipton S.A.** HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 1:878-92.

**Kwara A., Lartey M., Sagoe K.W., Rzek N.L., Court M.H.** CYP2B6 (c.516G-->T) and CYP2A6 (\*9B and/or \*17) polymorphisms are independent predictors of efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 67:427-36. doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03368.x.

**Kawahara K., Oyadomari S., Gotoh T., Kohsaka S., Nakayama H., Mori M.** Induction of CHOP and apoptosis by nitric oxide in p53-deficient microglial cells. *FEBS Lett* 2001; 506:135-9.

**Kenedi C.A. and Goforth H.W.** A systematic review of the psychiatric side-effects of efavirenz. *AIDS Behav* 2011; 15:1803-18.

**Keswani S.C., Pardo C.A., Cherry C.L., Hoke A., McArthur J.C.** HIV-associated sensory neuropathies. *AIDS* 2002; 16:2105-17.

**King J. and Aberg J.A.** Clinical impact of patient population differences and genomic variation in efavirenz therapy. *AIDS* 2008; 22:1709-17.

**Kirkinezos I.G. and Moraes C.T.** Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12:449-57.

**Klegeris A., McGeer E.G., McGeer P.L.** Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 2007; 20:351-7.

**Knowles R.G. and Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249–58.

**Kohler J.J. and Lewis W.** A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen* 2007; 48:166-72.

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

**Krawczyk M., Bonfrate L., Portincasa P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 695-708.

**Labbe G., Pessayre D., Fromenty B.** Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22:335-53.

**Lage R., Diéguez C., Vidal-Puig A., López M.** AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 2008; 14:539-49.

**Landriscina M., Fabiano A., Altamura S., Bagalà C., Piscazzi A., Cassano A., Spadafora C., Giorgino F., Barone C., Cignarelli M.** 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* 2005; 90:5663-71.

**Le Bras M., Clément M.V., Pervaiz S., Brenner C.** Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 2005; 20: 205-19.

**Lecoœur H., Langonné A., Baux L., Rebouillat D., Rustin P., Prévost M.C., Brenner C., Edelman L., Jacotot E.** Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp Cell Res* 2004; 294:106-17.

**Lewis W., Day B.J., Copeland W.C.** Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:812-22.

**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.** Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *AIDS* 2006; 20:675-84.

**Li W., Galey D., Mattson M.P., Nath A.** Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox Res* 2005; 8:119-34.

**Li W., Huang Y., Reid R., Steiner J., Malpica-Llanos T., Darden T.A., Shankar S.K., Mahadevan A., Satishchandra P., Nath A.** NMDA receptor activation by HIV-Tat protein is clade dependent. *J Neurosci* 2008(a); 28:12190-8.

**Li W., Malpica-Llanos T.M., Gundry R., Cotter R.J., Sacktor N., McArthur J., Nath A.** Nitrosative stress with HIV dementia causes decreased L-prostaglandin D synthase activity. *Neurology* 2008(b); 70:1753-62.

**Lin M.T. and Beal M.F.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443:787-795.

**Lipsky J.J.** Zalcitabine and didanosine. *Lancet* 1993; 341:30-2.

**Liu H.T., Akita T., Shimizu T., Sabirov R.Z., Okada Y.** Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol* 2009; 587(Pt 10):2197-209.

**Liu X., Jana M., Dasgupta S., Koka S., He J., Wood C., Pahan K.** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J Biol Chem* 2002; 277:39312-9.

**Loaiza A. Porrás O.H., Barros L.F.** Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 2003; 23:7337-42.

**Lochet P., Peyrière H., Lotthé A., Mauboussin J.M., Delmas B., Reynes J.** Long-term assessment of neuropsychiatric adverse reactions associated with efavirenz. *HIV Med* 2003; 4:62-6.

**Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.** Molecular Cell Biology. New York: W. H. Freeman. 5th edition. 2003.

**Loko M.A., Bani-Sadr F., Winnock M., Lacombe K., Carrieri P., Neau D., Morlat P., Serfaty L., Dabis F., Salmon D.; ANRS CO 13 HEPAVIH Study Group.** Impact of HAART exposure and associated lipodystrophy on advanced liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Viral Hepat.* 2011; 18:e307-14.

**Lü J.M., Lin P.H., Yao Q., Chen C.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14:840-60.

**Lucas S.M., Rothwell N.J., Gibson R.M.** The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S232-40.

**Lunt S.Y. and Vander Heiden M.G.** Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:441-64.

**Ly J.D., Grubb D.R., Lawen A.** The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; 8:115-28.

**Ma T.C., Mihm M.J., Bauer J.A., Hoyt K.R.** Bioenergetic and oxidative effects of free 3-nitrotyrosine in culture: selective vulnerability of dopaminergic neurons and increased sensitivity of non-dopaminergic neurons to dopamine oxidation. *J Neurochem* 2007; 103:131-44.

**Maagaard A. and Kvale D.** Long term adverse effects related to nucleoside reverse transcriptase inhibitors: clinical impact of mitochondrial toxicity. *Scand J Infect Dis* 2009; 41:808-17.

**Maggiolo F.** Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:910-28.

**Maher F., Vannucci S.J., Simpson I.A.** Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 1994; 8:1003-11.

**Maher F.** Immunolocalization of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in primary cultured neurons and glia. *J Neurosci Res* 1995; 42:459–69.

**Maher F., Davies-Hill T.M., Simpson I.A.** Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem J* 1996; 315:827–31.

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

**Mander P. and Brown G.C.** Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2005; 2:20.

**Mander P., Borutaite V., Moncada S., Brown G.C.** Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res* 2005; 79:208-15.

**Manfredi R., Calza L., Chiodo F.** Efavirenz versus nevirapine in current clinical practice : a prospective, open-label observational study. *J Acquir Immun Defic Syndr* 2004; 35: 492-502.

**Mann A. and Tyndale R.F.** Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *Eur J Neurosci* 2010; 31:1185-93. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07142.x.

**Martin J.L., Brown C.E., Matthews-Davis N., Reardon J.E.** Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2743-9.

**Marra C.M., Zhao Y., Clifford D.B., Letendre S., Evans S., Henry K., Ellis R.J., Rodriguez B., Coombs R.W., Schifitto G., McArthur J.C., Robertson K.; AIDS Clinical Trials Group 736 Study Team.** Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* 2009; 23:1359-66.

**Marzolini C., Telenti A., Decosterd L.A., Greub G., Biollaz J., Buclin T.** Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001; 15:71-5.

**Matthews T., Salgo M., Greenberg M., Chung J., DeMasi R., Bolognesi D.** Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:215-25.

**Mattson M.P.** Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 2000; 1: 120-29.

**McArthur J.C., Steiner J., Sacktor N., Nath A.** Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann Neurol* 2010; 67:699-714.

**Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., Miziorko H., Epstein C.J., Wallace D.C.** Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:846-51.

**Merrill J.E.** Interleukin-2 effects in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 594:188-99.

**Merrill J.E., Murphy S.P., Mitrovic B., Mackenzie-Graham A., Dopp J.C., Ding M., Griscavage J., Ignarro L.J., and Lowenstein C.J.** Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997; 48:372-384.

**Mills A., Crofoot G., Ortiz R., Rashbaum B., Towner W., Ward D., Brinson C., Kulkarni R., Garner W., Ebrahimi R., Cao H., Cheng A., Szwarcberg J.** Switching from twice-daily raltegravir plus tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine to once-daily

elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in virologically suppressed, HIV-1-infected subjects: 48 weeks data. *HIV Clin Trials* 2014; 15:51-6.

**Mills A.M., Antinori A., Clotet B., Fourie J., Herrera G., Hicks C., Madruga J.V., Vanveggel S., Stevens M., Boven K.; ECHO and THRIVE study groups.** Neurological and psychiatric tolerability of rilpivirine (TMC278) vs. efavirenz in treatment-naïve, HIV-1-infected patients at 48 weeks. *HIV Med* 2013; 14:391-400.

**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.** 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* 1985; 82:7096-100.

**Mocroft A., Ledergerber B., Katlama C., Kirk O., Reiss P., d'Arminio Monforte A., Knysz B., Dietrich M., Phillips A.N., Lundgren J.D.** Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 2003; 362:22-9.

**Möllsten A., Marklund S.L., Wessman M., Svensson M., Forsblom C., Parkkonen M., Brismar K., Groop P.H., Dahlquist G.** A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2007; 56:265-9.

**Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.

**Moncada S., Higgs A., Furchgott R.** International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997; 49:137-42.

**Moncada S. and Erusalimsky J.D.** Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:214-20.

**Moore R.D., Wong W.E., Keruly J.C., McArthur J.C.** Incidence of neuropathy in HIV-infected patients on monotherapy versus those on combination therapy with didanosine, stavudine and hydroxyurea. *AIDS* 2000; 14:273-8.

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

**Moss D.W. and Bates T.E.** Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci* 2001; 13:529-38.

**Mothobi N.Z. and Brew B.J.** Neurocognitive dysfunction in the highly active antiretroviral therapy era. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25:4-9.

**Muñoz-Moreno J.A., Fumaz C.R., Ferrer M.J., González-García M., Moltó J., Negro E., Clotet B.** Neuropsychiatric symptoms associated with efavirenz: prevalence, correlates, and management. A neurobehavioral review. *AIDS Rev* 2009; 11:103-9.

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

**Murphy S., Simmons M.L., Agulló L., García A., Feinstein D.L., Galea E., Reis D.J., Minc-Golomb D., and Schwartz J.P.** Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 1993; 16:323–28.

**Murphy S.** Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 2000; 29:1-13.

**Natarajan C., Yao S.Y., Zhang F., Sriram S.** Activation of NOD2/RIPK2 pathway induces mitochondrial injury to oligodendrocyte precursor cells in vitro and CNS demyelination in vivo. *J Neuroimmunol* 2013; 265:51-60.

**Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R.** Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 6-20.

**Nelson D.L. and Cox M.M.** Lehninger Principles of Biochemistry. WH Freeman and Co, 2005; 4th ed. New York, NY.

**Nelson M.R., Elion R.A., Cohen C.J., Mills A., Hodder S.L., Segal-Maurer S., Bloch M., Garner W., Guyer B., Williams S., Chuck S., Vanveggel S., Deckx H., Stevens M.** Rilpivirine versus efavirenz in HIV-1-infected subjects receiving emtricitabine/tenofovir DF: pooled 96-week data from ECHO and THRIVE Studies. *HIV Clin Trials* 2013; 14:81-91.

**Nicholls D.G. and Budd S.L.** Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80:315-60.

**Nohl H., Gille L., Staniek K.** Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:719-23.

**Nomura Y. and Kitamura Y.** Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci Res* 1993; 18:103-07.

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

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

**O'Mahony S.M., Myint A.M., Steinbusch H., Leonard B.E.** Efavirenz induces depressive-like behaviour, increased stress response and changes in the immune response in rats. *Neuroimmunomodulation* 2005; 12:293-8.

**OMS and ONUSIDA, 2013.** In <http://www.who.int/features/qa/71/es/index.html>.

**Ortiz-Masiá D., Hernández C., Quintana E., Velázquez M., Cebrián S., Riaño A., Calatayud S., Esplugues J.V., Barrachina M.D.** iNOS-derived nitric oxide mediates the increase in TFF2 expression associated with gastric damage: role of HIF-1. *FASEB J* 2010; 24:136-45.

**Padurariu M., Ciobica A., Lefter R., Serban I.L., Stefanescu C., Chirita R.** The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub* 2013; 25:401-9.

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

**Panos G., Samonis G., Alexiou V.G., Kavarnou G.A., Charatsis G., Falagas M.E.** Mortality and morbidity of HIV infected patients receiving HAART: a cohort study. *Curr HIV Res* 2008; 6:257-60.

**Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S.** The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin Immunol* 1993; 5:157-63.

**Pauwels P.J., Opperdoes F.R., Trouet A.** Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells. *J Neurochem* 1985; 44:143-8.

**Pellegrini M. and Baldari C.T.** Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr Mol Med* 2009; 9: 392-98.

**Pellerin L. and Magistretti P.J.** Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:10625–29.

**Pérez-Molina J.A., Fernández-González F., Hernangómez S., González C., Miralles P., López-Bernaldo De Quirós J.C., Bouza E.** Differential characteristics of HIV-infected penitentiary patients and HIV-infected community patients. *HIV Clin Trials* 2002; 3:139-47.

**Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A.** Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 2011; 50:98-115

**Pesin J.A. and Orr-Weaver T.L.** Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24:475-99.

**Petit F., Fromenty B., Owen A., Estaquier J.** Mitochondria are sensors for HIV drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:258-64.

**Pettersen J.A., Jones G., Worthington C., Krentz H.B., Keppler O.T., Hoke A., Gill M.J., Power C.** Sensory neuropathy in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients: protease inhibitor-mediated neurotoxicity. *Ann Neurol* 2006; 59:816–24.

**Peyriere H., Mauboussin J.M., Rouanet I., Fabre J., Reynes J., Hillaire-Buys D.** Management of sudden psychiatric disorders related to efavirenz. *AIDS* 2001; 15:1323-4.

**Phan V., Thai S., Choun K., Lynen L., van Griensven J.** Incidence of treatment-limiting toxicity with stavudine-based antiretroviral therapy in cambodia: a retrospective cohort study. *PLoS ONE* 2012; 7:e30647.

**Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobó N., Schöper F., Boveris A.** Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328:85–92.

**Porrás O.H., Loaiza A., Barros L.F.** Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004; 24:9669-73.

**Porrás O.H., Ruminot I., Loaiza A., Barros L.F.** Na(+)-Ca(2+) cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia* 2008; 56:59-68.

**Poyton R.O., Ball K.A., Castello P.R.** Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20:332-40.

**Ramachandran G., Ramesh K., Hemanth Kumar A.K., Jagan I., Vasantha M., Padmapriyadarsini C., Narendran G., Rajasekaran S., Swaminathan S.** Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine. *J Antimicrob Chemother* 2009 ;63:841-3. doi: 10.1093/jac/dkp033.

**Rahman B., Kussmaul L., Hamprecht B., Dringen R.** Glycogen is mobilized during the disposal of peroxides by cultured astroglial cells from rat brain. *Neurosci Lett.* 2000; 290:169-72.

**Rao K.V., Panickar K.S., Jayakumar A.R., Norenberg M.D.** Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res* 2005; 30:1311-8.

**Rees D.D., Palmer R.J.M., and Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3375–78.

**Ribaudo H.J., Haas D.W., Tierney C., Kim R.B., Wilkinson G.R., Gulick R.M., Clifford D.B., Marzolini C., Fletcher C.V., Tashima K.T., Kuritzkes D.R., Acosta E.P.; Adult AIDS Clinical Trials Group Study.** Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation: an Adult AIDS Clinical Trials Group Study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:401-7.

**Rich P.R. and Maréchal A.** The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem* 2010; 47:1-23.

**Riobó N.A., Clementi E., Melani M., Boveris A., Cadenas E., Moncada S., and Poderoso J.J.** Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 2001; 359:139–145.

**Robbins G.K., De Gruttola V., Shafer R.W., Smeaton L.M., Snyder S.W., Pettinelli C., Dubé M.P., Fischl M.A., Pollard R.B., Delapenha R., Gedeon L., van der Horst C., Murphy R.L., Becker M.I., D'Aquila R.T., Vella S., Merigan T.C., Hirsch M.S.; AIDS Clinical Trials Group 384 Team.** Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2003; 349:2293-303.

**Robertson K., Liner J., Meeker R.B.** Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol* 2012; 18:388-99.

**Robertson K.R., Smurzynski M., Parsons T.D., Wu K., Bosch R.J., Wu J., McArthur J.C., Collier A.C., Evans S.R., Ellis R.J.** The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS* 2007; 21:1915-21.

**Rockstroh J.K., DeJesus E., Lennox J.L., Yazdanpanah Y., Saag M.S., Wan H., Rodgers A.J., Walker M.L., Miller M., DiNubile M.J., Nguyen B.Y., Teppler H., Leavitt R., Sklar P.; STARTMRK Investigators.** Durable efficacy and safety of raltegravir versus efavirenz when combined with tenofovir/emtricitabine in treatment-naive HIV-1-infected patients: final 5-year results from STARTMRK. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63:77-85.

**Rodríguez-Nóvoa S., Barreiro P., Jiménez-Nacher I., Rendón A., Soriano V.** Pharmacogenetics in HIV therapy. *AIDS Rev* 2005; 7:103-12.

**Ronnett G.V., Ramamurthy S., Kleman A.M., Landree L.E., Aja S.** AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J Neurochem* 2009; 109 Suppl 1:17-23.

**Russo A., Terrasi M., Agnese V., Santini D., Bazan V.** Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7:vii115-23.

**Russwurm M., Russwurm C., Koesling D., Mergia E.** NO/cGMP: the past, the present, and the future. *Methods Mol Biol* 2013; 1020:1-16.

**Saha R.N. and Pahan K.** Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:929-47.

**Saha R.N. and Pahan K.** Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:1866-78.

**Salter M., Knowles R.G., Moncada S.** Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291:145-9.

**Sánchez S., Jiménez C., Carrera A.C., Diaz-Nido J., Avila J., Wandosell F.** A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* 2004; 44:231-42.

**Sato N.** Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1:S1-6.

**Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J.** Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11:173-86.

- Savvides S.N., Scheiwein M., Bohme C.C., Arteel G.E., Karplus P.A., Becker K., Schirmer R.H.** Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2002; 277:2779-84.
- Schweinsburg B.C., Taylor M.J., Alhassoon O.M., Gonzalez R., Brown G.G., Ellis R.J., Letendre S., Videen J.S., McCutchan J.A., Patterson T.L., Grant I.; HNRC Group.** Brain mitochondrial injury in human immunodeficiency virus-seropositive (HIV+) individuals taking nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Neurovirol* 2005; 11:356-64.
- Scourfield A., Zheng J., Chinthapalli S., Waters L., Martin T., Mandalia S., Nelson M.** Discontinuation of Atripla as first-line therapy in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 2012; 26:1399-401.
- Sen N., Hara M.R., Kornberg M.D., Cascio M.B., Bae B.I., Shahani N., Thomas B., Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H., Sawa A.** Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2008; 10:866-73.
- Severinghaus J.W. and Astrup P.B.** History of blood gas analysis. VI. Oximetry. *J Clin Monit* 1986; 2:270-88.
- Sharpe M.A. and Cooper C.E.** Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem* 1998; 273:30961-72.
- Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L.A., MacArthur P.H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V.M., Gladwin M.T.** Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res* 2007; 100:654-61.
- Silva A.C., Rodrigues B.S., Micheletti A.M., Tostes S. Jr., Meneses A.C., Silva-Vergara M.L., Adad S.J.** Neuropathology of AIDS: An Autopsy Review of 284 Cases from Brazil Comparing the Findings Pre- and Post-HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) and Pre- and Postmortem Correlation. *AIDS Res Treat* 2012; 2012:186850.

**Simioni S., Cavassini M., Annoni J.M., Rimbault Abraham A., Bourquin I., Schiffer V., Calmy A., Chave J.P., Giacobini E., Hirschel B., Du Pasquier R.A.** Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS* 2010; 24:1243-50.

**Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Konorev E., Kalyanaraman B.** The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361:331-9.

**Small C.I., Lyles G.A., and Breen K.C.** Inducible form of nitric oxide synthase expression in rat cortical neuronal cells in vitro. *Neurobiol Dis* 2004; 17:70–6.

**Smith J.A. and Daniel R.** Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol* 2006; 1:217-26.

**Smith R.A., Hartley R.C., Cochemé H.M., Murphy M.P.** Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33:341-52.

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

**Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.

**Someya S. and Prolla T.A.** Mitochondrial oxidative damage and apoptosis in age-related hearing loss. *Mech Ageing Dev* 2010; 131:480-6.

**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.** 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* 1999 16; 341:1865-73.

**Steckert A.V., Valvassori S.S., Moretti M., Dal-Pizzol F., Quevedo J.** Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res* 2010; 35:1295-1301.

**Stegmüller J. and Bonni A.** Moving past proliferation: new roles for Cdh1-APC in postmitotic neurons. *Trends Neurosci* 2005; 28:596-601.

**Streck E.L., Scaini G., Rezin G.T., Moreira J., Fochesato C.M., Romão P.R.** Effects of the HIV treatment drugs nevirapine and efavirenz on brain creatine kinase activity. *Metab Brain Dis* 2008; 23:485-92.

**Streck E.L., Ferreira G.K., Scaini G., Rezin G.T., Gonçalves C.L., Jeremias I.C., Zugno A.I., Ferreira G.C., Moreira J., Fochesato C.M., Romão P.R.** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and nevirapine inhibit cytochrome C oxidase in mouse brain regions. *Neurochem Res* 2011; 36:962-6.

**Szabó C.** Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003; 140-141:105-12.

**Szewczyk A. and Wojtczak L.** Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002; 54:101-27.

**Takahashi S., Izawa Y., Suzuki N.** Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments. *ASN Neuro* 2012; 4(2).

**Takuma K., Phuagphong P., Lee E., Mori K., Baba A., Matsuda T.** Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J Biol Chem* 2001; 276:48093-9.

**Tangpong J., Sompol P., Vore M., St Clair W., Butterfield D.A., St Clair D.K.** Tumor necrosis factor alpha-mediated nitric oxide production enhances manganese superoxide dismutase nitration and mitochondrial dysfunction in primary neurons: an insight into the role of glial cells. *Neuroscience* 2008; 151:622-9.

**Tashima K.T., Caliendo A.M., Ahmad M., Gormley J.M., Fiske W.D., Brennan J.M., Flanigan T.P.** Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) suppression and efavirenz drug concentrations in HIV-1-infected patients receiving combination therapy. *J Infect Dis* 1999; 180:862-4.

**Taylor C.T. and Moncada S.** Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:643-7.

**Teppler H., Brown D.D., Leavitt R.Y., Sklar P., Wan H., Xu X., Lievano F., Lehman H.P., Mast T.C., Nguyen B.Y.** Long-term safety from the raltegravir clinical development program. *Curr HIV Res* 2011; 9:40–53.

**Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C.A., Harris C.C., Roberts D.D., Wink D.A.** The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45:18-31.

**Tiranti V., Chariot P., Carella F., Toscano A., Soliveri P., Girlanda P., Carrara F., Fratta G.M., Reid F.M., Mariotti C., Zeviani M.** Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer(UCN) gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1421-7.

**Tovar-y-Romo L.B., Bumpus N.N., Pomeratz D., Avery L.B., Sacktor N., McArthur J.C., Haughey N.J.** Dendritic spine injury induced by the 8-hydroxy metabolite of efavirenz. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343:696-703.

**Turchan J., Pocernich C.B., Gairola C., Chauan A., Schifitto G., Butterfield D.A., Buch S., Narayan O., Sinai A., Geiger J., Berger J.R., Elford H., Nath A.** Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology*; 60:307-14.

**Turrens J.F.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552(Pt 2):335-44.

**Uzasci L., Bianchet M.A., Cotter R.J., Nath A.** Identification of nitrated immunoglobulin variable regions in the HIV-infected human brain: implications in HIV infection and immune response. *J Proteome Res* 2014; 13:1614-23.

**van Luin M., Bannister W.P., Mocroft A., Reiss P., Di Perri G., Peytavin G., Molto J., Karlson A., Castagna A., Beniowski M., Lundgren J.D., Burger D.M.; EuroSIDA Study Group.** Absence

of a relation between efavirenz plasma concentrations and toxicity-driven efavirenz discontinuations in the EuroSIDA study. *Antivir Ther* 2009; 14:75-83.

**von Giesen H.J., Köller H., Theisen A., Arendt G.** Therapeutic effects of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on the central nervous system in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:363-7.

**Vallance P. and Collier J.** Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 1994; 309:453-7.

**Vassimon H.S., Deminice R., Machado A.A., Monteiro J.P., Jordao A.A.** The association of lipodystrophy and oxidative stress biomarkers in HIV-infected men. *Curr HIV Res* 2010; 8: 364-69.

**Vivithanaporn P., Heo G., Gamble J., Krentz H.B., Hoke A., Gill M.J., Power C.** Neurologic disease burden in treated HIV/AIDS predicts survival: a population-based study. *Neurology* 2010; 75:1150-8.

**Walker U.A., Setzer B., Venhoff N.** Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS* 2002; 16:2165-73.

**Wallace D.C., Fan W., Procaccio V.** Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 2010; 5:297-348.

**Wang Z., Zheng Y., Liu L., Shen Y., Zhang R., Wang J., Lu H.** High prevalence of HIV-associated neurocognitive disorder in HIV-infected patients with a baseline CD4 count  $\leq$  350 cells/ $\mu$ L in Shanghai, China. *Biosci Trends* 2013; 7:284-9.

**Ward B.A., Gorski J.C., Jones D.R., Hall S.D., Flockhart D.A., Desta Z.** 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* 2003; 306:287-300.

**Weiss N., Miller F., Cazaubon S., Couraud P.O.** The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788:842-57.

**Wensing A.M., van Maarseveen N.M., Nijhuis M.** Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res* 2010; 85:59-74.

**Whitehead T.P., Kricka L.J., Carter T.J., Thorpe G.H.** Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1979; 25:1531-46.

**Winston A., Puls R., Kerr S.J., Duncombe C., Li P.C., Gill J.M., Taylor-Robinson S.D., Emery S., Cooper D.A.; Altair Study Group.** Dynamics of cognitive change in HIV-infected individuals commencing three different initial antiretroviral regimens: a randomized, controlled study. *HIV Med* 2012; 13:245-51.

**Wolf G.** Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol* 1997; 12:251-61.

**Wu G., Abraham T., Saad N.** Dolutegravir for the treatment of adult patients with HIV-1 infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12:535-44.

**Wyss-Coray T.** Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 2006; 12:1005-15.

**Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y.** SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2010 20; 123:1086-92.

**Xu W., Liu L., Charles I.G., Moncada S.** Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signaling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nat Cell Biol* 2004; 6:1129-34.

**Yilmaz A., Watson V., Dickinson L., Back D.** Efavirenz pharmacokinetics in cerebrospinal fluid and plasma over a 24-hour dosing interval. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:4583-5.

**Youle R.J. and Strasser A.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:47-59.

**Yung H.W., Bal-Price A.K., Brown G.C., Tolkovsky A.M.** Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem* 2004; 89:812-21.

**Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gómez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183:1533-44.

**Zhang J., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H.** Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263:687-9.

**Zheng Y.H., Lovsin N., Peterlin B.M.** Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* 2005; 97:225-34.

**Zhou Y., Shaw N., Li Y., Zhao Y., Zhang R., Liu Z.J.** Structure-function analysis of human l-prostaglandin D synthase bound with fatty acid molecules. *FASEB J* 2010; 24:4668-77.

**Zipp F. and Aktas O.** The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2006; 29:518-27.

***ANEXO***



## PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA RELACIONADA CON ESTA TESIS

- Autores p.o. de firma: BLAS-GARCÍA A, POLO M, ALEGRE F, **FUNES HA**, APOSTOLOVA N, VICTOR M. VICTOR, ESPLUGUES JV. Título: Purine analogues used in anti-HIV therapy inhibit mitochondrial function and increase acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*. En revisión.
- Autores: APOSTOLOVA N, **FUNES HA**, BLAS-GARCIA A, ALEGRE F, POLO M, ESPLUGUES JV. Título: Involvement of nitric oxide in the mitochondrial action of efavirenz: a differential effect on neurons and glial cells. *Journal of Infectious Diseases*. En revisión.
- Autores: POLO M, ALEGRE F, **FUNES HA**, BLAS-GARCIA A, VICTOR VM, ESPLUGUES JV, APOSTOLOVA N. Título: Mitochondrial (dys)function a factor underlying the variability of EFV-induced hepatotoxicity? *British Journal of Pharmacology* 2014.
- Autores: BLAS-GARCÍA A, POLO M, ALEGRE F, **FUNES HA**, MARTINEZ E, APOSTOLOVA N, ESPLUGUES JV. Título: Lack of mitochondrial toxicity of darunavir, raltegravir and rilpivirine in neurons and hepatocytes: a comparison with Efavirenz. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014. PMID: 25011651.
- Autores: **FUNES HA**, APOSTOLOVA N, ALEGRE F, BLAS-GARCIA A, ALVAREZ A, MARTI-CABRERA M, ESPLUGUES JV. Título: Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: a clue to understanding the central nervous system side effects of Efavirenz. *Journal of Infectious Diseases* 2014. PMID: 24813473.
- Autores: APOSTOLOVA N, GOMEZ-SUCERQUIA LJ, ALEGRE F, **FUNES HA**, VICTOR VM, BARRACHINA MD, BLAS-GARCIA A, ESPLUGUES JV. Título: ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *Journal of Hepatology* 2013 Oct; 59(4):780-9. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.005.



