

Per a poder transferir els mitocondris d'un pacient a les cèl·lules ρ^0 , cal primer eliminar el nucli de les cèl·lules obtingudes del pacient —és a

dir, generar citoplasts. Si els híbrids es preparen a partir de plaquetes, aquest pas no és necessari. Sovint s'utilitzen fibroblasts extrets de biòpsia de



pell. Els nuclis s'eliminen mitjançant un tractament amb citocalasina B seguit de centrifugació de la placa amb les cèl·lules "cap per avall" (es força la sortida del nucli a través de la membrana cel·lular), però sempre queden algunes cèl·lules amb nucli que poden fusionar-se amb les ρ^0 . Tant si es fusionen com si no, s'aniran perdent progressivament a causa de la presència de bromodesoxiuridina al medi selectiu.

La fusió entre els citoplasts i les cèl·lules ρ^0 es pot fer per microinjecció o, més freqüentment, amb polietilenglicol en un excés de cèl·lules ρ^0 . Els híbrids transmitocondrials se seleccionen amb la utilització d'un medi selectiu amb bromodesoxiuridina i sense uridina ni piruvat. Les altres cèl·lules presents després de la fusió (ρ^0 , cèl·lules del pacient no enucleades, híbrids ρ^0 -cèl·lules no enucleades) moriran perquè no podran créixer en el medi selectiu. Els híbrids resultants tindran proporcions variables de molècules de mtDNA mutant, i caldrà separar els clons diferents i determinar el grau d'heteroplàsmia de cadascun. Algunes setmanes després de la fusió es poden iniciar els estudis bioquímics i genètics per a caracteritzar els híbrids. Si es detecten alteracions, aquestes seran conseqüència de problemes als mitocondris del pacient, i si els híbrids mostren un fenotip normal això serà indicatiu que l'origen dels símptomes del pacient són nuclears.

TRACTAMENT DE LES MALALTIES MITOCONDRIALS

Les dades sobre la prevalença de les malalties mitocondrials són molt escasses. Existeix algun treball que calcula la prevalença de mutacions concretes al mtDNA però manquen estimacions més generals. En aquest sentit l'any 2000 Chinnery *et al.* determinaren que 12,5 de cada 100.000 individus (tant adults com nens) patien alguna malaltia causada per mutacions al mtDNA o tenien risc de patir-la (Chinnery 2000a). Aquests investigadors opinen que les mutacions patogèniques al mtDNA són una causa freqüent de morbiditat crònica. És molt probable que les malalties mitocondrials representin una de les categories diagnòstiques més grans dins de les malalties neurogenètiques en adults.

Malauradament, encara no es disposa de teràpies efectives per a guarir les malalties mitocondrials. El tractament aplicat als pacients es basa majoritàriament en teràpies d'ajuda, com pot ser la cirurgia en casos de ptosi i cataractes, o la col·locació de marcapassos en malalts amb deficiències cardíaques. En alguns casos s'han

utilitzat substàncies antioxidants per a intentar evitar l'increment de radicals lliures que sembla existir en diverses malalties mitocondrials. L'ubiquinona s'ha fet servir amb resultats positius en alguns pacients amb MELAS i KSS, però manquen estudis clínics més generals que demostrin la seva eficàcia. Altres tractaments han consistit a administrar compostos que desfan el bloqueig a la CRM causat per un defecte a algun dels complexos enzimàtics. Les vitamines C i E, el succinat, la riboflavina, i la nicotinamida en són exemples.

A banda d'aquestes aproximacions farmacològiques s'han seguit altres estratègies amb efecte directe sobre el mtDNA. Taylor *et al.* sintetitzaren àcids nucleics peptídics (PNA) amb la intenció d'inhibir selectivament la replicació del mtDNA mutant (Taylor 1997). Els PNA són complementaris a seqüències de mtDNA humanes que contenen una mutació puntual o el punt de trencament d'una deleció. En experiments lliures de cèl·lules van funcionar, és a dir, es va inhibir la replicació del mtDNA mutant però no la del mtDNA salvatge. Per tal d'introduir el PNA dins dels mitocondris de cèl·lules en cultiu s'ha conjugat aquesta molècula al catió trifenílfosfoni, un catió lipofílic (Muratovska 2001). Si bé s'ha aconseguit la introducció de la molècula al mitocondri, la proporció de mtDNA mutant/mtDNA salvatge en cultius de fibroblasts o mioblasts no varia després de 30 dies d'incubació en un excés molar de ph-PNA, probablement perquè el PNA lligat al mtDNA de cadena senzilla és desplaçat per la maquinària replicativa o bé perquè els PNA no hibriden amb mtDNA de cadena senzilla durant la replicació. Actualment s'intenta el disseny de PNA que hibridin a mtDNA de doble cadena per a formar una triple hèlix estable.

En alguns pacients amb mutacions heteroplàsmiques al mtDNA s'ha vist que mentre el percentatge de molècules mutants és elevat a les fibres musculars, a les cèl·lules satèl·lit que les acompanyen és baix o insignificant. Aquestes cèl·lules romanen inactives fins que són requerides per al creixement o reparació muscular. L'any 1997 es va provar d'aprofitar la presència de cèl·lules satèl·lit sense mtDNA mutant al múscul d'un pacient KSS que presentava una mutació puntual a un dels gens pels tRNA a les fibres musculars. A aquest pacient se li van practicar dues biòpsies a la mateixa zona del bíceps dret en un interval de temps de tres mesos. La primera va mostrar que la proporció de molècules mutants era del 94% i, el que és més



rellevant, va provocar necrosi en el múscul, fet que va activar les cèl·lules satèl·lit. A la segona biòpsia es va poder comprovar l'absència total de molècules mutants en totes les fibres analitzades (Shoubridge 1997). Per a certs pacients amb el genotip adequat, els autors proposen com a mètode alternatiu a una necrosi massiva provocada, la realització d'un programa d'exercicis que inclogui nombroses contraccions musculars excèntriques. Les lesions microscòpiques que generen aquestes contraccions provoquen que les cèl·lules satèl·lit es fusionin amb les miofibril·les danyades, i per tant podrien aturar l'increment de molècules mutants en múscul.

La introducció d'un gen mitocondrial normal homòleg del mutant a un pacient hauria de corregir la funció alterada, però ara per ara no és possible introduir d'una forma efectiva gens dins del mitocondri en cèl·lules en cultiu. L'alternativa d'incorporar les còpies salvatges al nucli cel·lular perquè la proteïna normal es sintetitzi al citoplasma i es transporti més tard al mitocondri és també força complicada. Cal afegir la seqüència per a un pèptid senyal que vagi al mitocondri, i cal tenir en compte les diferències entre els codis genètics mitocondrial i nuclear. S'han de resoldre, doncs, alguns problemes tècnics prou importants abans de poder plantejar una **teràpia gènica** per a les malalties mitocondrials.

DIAGNÒSTIC PRENATAL

Malgrat el diagnòstic prenatal per a malalties mitocondrials basat en l'anàlisi del mtDNA és possible tècnicament, es coneixen pocs casos en què s'hagi realitzat. L'heteroplàsmia és el principal obstacle amb el que es topa a l'hora de fer un diagnòstic prenatal amb confiança per les raons exposades anteriorment¹⁴. El percentatge d'heteroplàsmia pot variar en el temps i entre diferents teixits, aleshores és lògic que hi hagi dubtes sobre si la proporció de molècules mutants en amniocentesis o vellositats coriòniques serà la mateixa que en altres teixits del fetus. A més, la segregació mitòtica pot fer que aquesta proporció variï durant el desenvolupament embrionari i després del naixement. Afortunadament aquest no sembla ser el cas per a les mutacions 8993G i 8993C (White 1999b) (associades a la síndrome

de Leigh i la NARP), per la qual cosa el diagnòstic prenatal és en aquest cas factible (White 1999a).

Pel que fa a moltes altres mutacions caldrà recopilar totes les dades possibles sobre l'herència de mutacions heteroplàsmiques (estem parlant de mutacions heteroplàsmiques que afecten la línia germinal i que per tant es poden transmetre a la descendència). La dimensió del coll d'ampolla genètic i el moment en què s'esdevé són d'una importància vital per a poder oferir diagnòstic prenatal. Si la selecció de les molècules de mtDNA que poblaran els teixits del nou-nat té lloc a la fase embrionària serà difícil que l'examen de les vellositats coriòniques (o dels oòcits en dones amb l'ovulació superestimada) doni una informació útil. En canvi, si el coll d'ampolla i la segregació de les molècules de mtDNA mutants i normals ocorre abans, durant l'oogènesi, el percentatge de molècules mutants a les vellositats coriòniques o als oòcits serà representatiu del que tindrà el descendent de la mare heteroplàsmica (Poulton 1998).

El grup del doctor Arnold Munnich a França ha fet diagnòstic prenatal en base a les dades d'activitat enzimàtica dels complexos de la CRM en cèl·lules de l'amni i del còrion (Faivre 2000). Aquesta estratègia és certament esperançadora, però té l'inconvenient que requereix una segona amniocentesis per a evitar falsos negatius que poden originar-se en estudiar mostres de 8 a 12 setmanes de gestació.

¹⁴ Vegeu l'apartat **Hi ha correlació genotip/fenotip en les malalties mitocondrials?** (pàg. 22).



7 MALALTIES ESTUDIADES

En aquest capítol es presenten les malalties que han centrat el nostre estudi des del punt de vista d'un grup genètic mitocondrial. En primer lloc es tracta la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON), una de les malalties mitocondrials clàssiques que s'ha descobert associada a mutacions puntuals al mtDNA des de fa poc més de tretze anys. Molt relacionada amb aquesta ja que els símptomes són extremadament coincidents hi ha l'ambliopia alcohol-tabac (TAA). Vam tenir l'oportunitat d'estudiar el mtDNA d'un grup de pacients afectats per aquesta malaltia.

La tercera malaltia presentada en aquesta memòria és la síndrome de Wolfram (WS). El nostre grup porta anys recopilant i estudiant mostres de pacients amb WS, i aquesta tasca va permetre identificar alteracions al mtDNA d'alguns pedigrís amb WS (Barrientos 1996b; Barrientos 1996c). Aquest darrer treball va demostrar l'existència d'un gen a la regió 4p16 que predisposa a delecions múltiples al mtDNA de famílies amb WS. Dos anys més tard es va identificar un gen responsable d'aquesta síndrome al cromosoma 4 (Inoue 1998; Strom 1998) i el nostre grup, a banda d'examinar el mtDNA dels nous pacients WS, va estudiar el gen nuclear de totes les famílies.

Per últim es presenten els resultats sobre una malaltia que apareix secundàriament després d'un procés infecciós. Es tracta de la lipodistròfia que pateixen moltes persones infectades amb el virus d'immunodeficiència humana (HIV). Cada cop més treballs atribueixen l'aparició de la lipodistròfia a la utilització de medicaments antivírics, i el nostre grup es va plantejar estudiar si la lipodistròfia podia ser conseqüència d'alteracions al funcionament mitocondrial, ja que prèviament s'havia descrit que la zidovudina (o AZT, un dels primers antivírics utilitzats) provocava depleció del mtDNA en alguns pacients (Arnaudo 1991; Casademont 1996).

LHON

L'atròfia òptica de Leber va ser reconeguda com una forma de neuropatia òptica hereditària a mitjans del segle XIX per Von Graefe, i més tard anomenada en honor a Theodor Leber (1840–1917), l'oftalmòleg alemany que va definir amb rigor les seves característiques clíniques i el seu patró d'herència. Aquesta malaltia representa la causa més freqüent de pèrdua de visió en homes joves, amb una incidència estimada d'un cas cada 50.000 individus. Generalment la pèrdua de visió s'inicia a la segona o tercera dècada de vida de forma indolora i aguda o subaguda. L'afectació dels dos ulls pot ser simultània o pot aparèixer primer en un ull, i en un període variable de sis a 22 setmanes afectar també l'altre (Riordan-Eva 1995). La pèrdua d'agudes visual acostuma a ser greu i pot arribar a la ceguesa total; a més, és normalment irreversible.

El primer símptoma d'un pacient LHON és la visió borrosa que va empitjorant al llarg de setmanes o mesos fins al punt més greu de cada pacient (no poder comptar dits, ceguesa...). Les troballes oftalmològiques més típiques són:

escotoma¹⁵ central o cecocentral, pseudoedema¹⁶ a la capa de fibres nervioses, hiperèmia¹⁷ al disc òptic i microangiopatia peripapil·lar, que normalment implica capil·lars tortuosos a la retina i capil·lars telangiectàsics¹⁸. Durant la fase aguda primerenca (FIGURA 10, pàg. 34) els potencials visuals evocats¹⁹ es troben alterats, les amplituds es troben disminuïdes i les latències es prolonguen. A la fase atròfica els potencials evocats s'han perdut pràcticament, la qual cosa indica la pèrdua de la funció de les cèl·lules ganglionars de la retina²⁰. En canvi, els fotoreceptors, la capa de

¹⁵ Àrea del camp visual en què la visió és nul·la o molt feble.

¹⁶ Estat de tumefacció sense retenció hídrica.

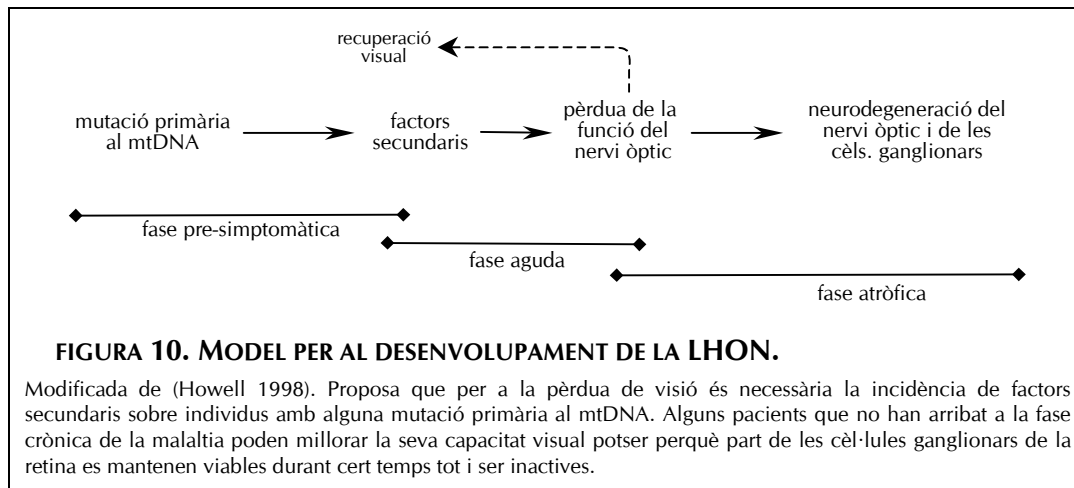
¹⁷ Acumulació de sang.

¹⁸ La telangiectasi és una dilatació dels vasos capil·lars que forma una varietat d'angioma.

¹⁹ Prova que avalua la conducció d'impulsos elèctrics des del nervi òptic al còrtex occipital del cervell.

²⁰ La llum captada per l'ull incideix en primer lloc a la capa de fibres nervioses i a la de cèl·lules ganglionars, sota la qual es localitzen els vasos sanguinis de la retina. És aquí on els nervis comencen, recollint els impulsos de la retina i enviant-los al cervell.





cèl·lules bipolars i l'epiteli pigmentari retinal²¹ mantenen la seva funcionalitat, d'acord amb els resultats d'electroretinogrames i electrooculogrames. També acostuma a mantenir-se la resposta pupil·lar.

La participació de factors ambientals en aquesta malaltia la suggereix, entre moltes altres observacions, un article sobre dos bessons monozigòtics amb mutacions LHON dels quals un pateix la malaltia i l'altre, després de sis anys, no (Johns 1993).

Alguns treballs han investigat la neuropatologia de la LHON però normalment sobre pacients que havien perdut la visió molts anys abans de morir. Per aquest motiu, les observacions neuropatològiques extretes poden ser diferents a les que s'obtidrien a la fase aguda de la malaltia. Tenint això en compte, s'ha vist que en pacients LHON existeix degeneració de la capa de cèl·lules ganglionars i del nervi òptic, sense que s'hagi observat cap procés inflamatori (Howell 1998).

MUTACIONS AL MTDNA

La importància de la LHON en opinió de Riordan-Eva i Harding rau precisament en les seves conseqüències tan greus sobre gent jove, i en els efectes que pot tenir el diagnòstic d'aquesta malaltia hereditària en altres membres de la família (Riordan-Eva 1995). L'atròfia òptica de Leber s'hereta per via materna, mostra una penetració molt variable i afecta més a homes que a dones, sense que se'n coneguin les causes. S'ha associat a més de 20 mutacions al mtDNA que es recullen a la **TAULA 4**, modificada de Wallace et

al. (Wallace 1999b), però tan sols unes poques (mutacions primàries) contribueixen d'una manera clara a la pèrdua de visió. La resta, considerades mutacions secundàries, poden contribuir a la LHON augmentant la probabilitat que es doni l'atròfia òptica, o potser estan associades a altres mutacions clínicament importants en el mateix haplotip de mtDNA. En l'actualitat es considera que hi ha quatre **mutacions primàries**: 11778A, 3460A, 14484C i 14459A. Aquesta darrera és poc freqüent, però és la més greu ja que causa LHON i/o distonia generalitzada. Les tres primeres s'han detectat en més del 90% dels casos LHON europeus. La mutació **11778A** és la majoritària i es troba al 50% dels pacients, mentre que la 3460A i la 14484C són presents a aproximadament el 15% dels afectats. En pacients asiàtics en canvi, la mutació 11778A predomina en el 95% dels casos. Wallace *et al.* indiquen que aquestes diferències entre poblacions de diversos continents suggereixen que els *backgrounds* genètics poden afectar l'expressió de les mutacions LHON (Wallace 1999b).

La mutació **14459A** canvia una alanina molt conservada per una valina a la posició 72 del polipèptid ND6 de la NADH deshidrogenasa. La mutació 11778A es considera la segona mutació més greu, i transforma una arginina molt conservada per una histidina en la posició 340 de la subunitat ND4. Va ser la primera mutació LHON descrita, i la primera mutació al mtDNA associada a una malaltia mitocondrial (Wallace 1988). Aquesta mutació es detecta predominantment en homoplàsmia —només s'ha observat un 15% de pacients heteroplàsmics—, i afecta a molts més homes que dones: per cada dona que la presenta n'hi ha més de quatre homes afectats. Tan sols un 4% dels pacients amb aquesta mutació ha experimentat recuperació visual.

²¹ Aquestes tres són capes cel·lulars adjacents i progressivament més internes de la retina.



La següent mutació primària en ordre de gravetat és la **3460A**, que canvia una alanina moderadament conservada per una treonina a la posició 52 del gen ND1. Té un pronòstic menys greu que la mutació 11778A perquè en un 22% dels casos s'ha observat recuperació parcial de la capacitat visual. Tant aquesta mutació com la majoritària 11778A han estat detectades en un petit percentatge de pacients amb esclerosi múltiple (MS). Alguns grups han cercat aquestes mutacions primàries en individus amb MS, però mentre uns mantenen que la relació entre aquestes malalties podria ser causada per l'associació de la MS a un determinat haplotip del mtDNA (Kalman 1998; Reynier 1999), altres afirmen que tenir una mutació LHON primària és un factor de risc per a desenvolupar MS (Vanopdenbosch 2000). En un estudi amb 103 pacients MS Mojon *et al.* no van detectar les mutacions 11778 i 3460, pel que la presència d'aquestes mutacions LHON deu ser poc freqüent en pacients amb esclerosi múltiple no seleccionats (Mojon 1999).

La mutació **14484C** és la més benigna de les mutacions primàries. Canvia una metionina dèbilment conservada per una valina, a la posició 64 del gen ND6, i s'acostuma a trobar en homoplàsmia, tot i que també s'han descrit casos heteroplàsmics. Allò que més destaca de la mutació 14484C és que un 37–50% dels pacients que la presenten experimenten recuperació visual (Riordan-Eva 1995). La recuperació no succeeix fins passats molts mesos —fins i tot anys— del començament de la pèrdua de visió, generalment superat un any de l'inici.

Pel que fa a les **mutacions LHON secundàries**, la seva patogenicitat és més qüestionada. Es troben sempre en homoplàsmia (fins i tot en individus sans) conjuntament amb mutacions primàries. Algunes d'elles són relativament freqüents entre pedigrís LHON i també entre controls (per exemple les mutacions 13708A i 4216C, **TAULA 4**). Per aquest motiu es pensa que són polimorfismes, o bé variants que afecten el risc de patir LHON, i aleshores serien importants des d'un punt de vista patogènic. En un estudi

TAULA 4. MUTACIONS ASSOCIADES A LHON

Mutació ^A	Tipus ^B	Canvi	Grau de canvi ^C	% pacients europeus	% controls	Heteroplàsmia	% Penetració familiars	% Penetració homes
MTND6*LDYT14459A	I	A72V	E	rara	0	+	61	58
MTND4*LHON11778A	I	R340H	E	50	0	+/-	33-60	82
MTND1*LHON3460A	I	A52T	M	15	0	+/-	14-75	40-80
MTND6*LHON14484C	I	M64V	B	15	0	+/-	27-80	68
MTND2*LHON5244A	I	G259S	E	rara	0	+	-	-
MTND5*LHON13730A	I	G465E	M	rara	0	+	-	-
MTCO3*LHON9804A	I?	A200T	E	1,5	0	-	?	?
MTND3*LHON10663C	I?	V65A	B	rara	0	-	56	60
MTATP6*LHON9101C	I?	I192T	B	rara	0	-	-	-
MTND4*LDYT11696G	I?	V315I	B	rara	0	-	?	?
MTND6*LHON14482G	I?	M64I	B	rara	0	-	?	89
MTND6*LHON14498T	I?	Y59C	M	rara	0	+	31	50
MTND6*LHON14568T	I?	G36S	B	rara	0	-	-	-
MTND6*LDYT14596A	I?	I26M	M	rara	0	+	?	?
MTCYB*LHON15257A	I-II	D171N	E	9	0,4	-	-	-
MTND5*LHON13708A	II	A458T	M	30	6	-	-	-
MTND1*LHON3394C	II	Y30H	E	rara	0,9	-	-	-
MTND1*LHON4160C	II	L285P	E	rara	0	-	76	54
MTND1*LHON4216C	II	Y304H	B	~40	13	-	-	-
MTND2*LHON4917G	II	D150N	E	3	3	-	-	-
MTCO1*LHON7444A	II	Ter→K	-	5	1	-	-	-
MTCO3*LHON9438A	II	G78S	E	2,5	4,6	-	-	?
MTCYB*LHON15812A	II	V357M	M	4	0,1	-	-	-

Modificada de Wallace *et al.* (Wallace 1999b). Les 10 primeres mutacions segueixen un ordre decreixent de gravetat.

^A Nomenclatura de les mutacions al mtDNA que indica el gen mutant, la malaltia a la que està associada i la posició del canvi.

^B I i II indiquen mutació primària i secundària, respectivament. I-II, mutació intermèdia, o primària/secundària segons els grups.

^C B, M i E mostren si el canvi es produeix en un residu poc, moderadament o elevadament conservat, respectivament.



dels haplotips de mtDNA de 37 pacients LHON italians, el grup de Torroni *et al.* determinà que les mutacions secundàries 4216C, 4917G, 13708A, 15257A i 15812A són polimorfismes antics, i que les mutacions primàries 3460A, 11778A i 14484C són recents i resultat de múltiples successos mutacionals independents (Torroni 1997). El fet que s'hagin pogut crear recentment pot explicar per què s'han trobat en heteroplàsmia en certes famílies.

L'anàlisi filogenètica de les tres mutacions LHON més freqüents ha mostrat que s'han distribuït de manera diferent entre els diversos haplogrups de mtDNA presents a Europa. D'una banda, la mutació 3460 sembla repartida a l'atzar entre tots els haplogrups. De l'altra, les mutacions 11778 i 14484 es detecten a tots els haplogrups europeus però amb una preferència clara per l'haplogrup J, amb una freqüència aproximada sis vegades superior a la que es podria esperar a l'atzar (Brown 1997; Torroni 1997). Torroni *et al.* creuen que la probabilitat d'expressar la LHON augmenta quan les mutacions 11778 i 14484 es presenten dins de l'haplogrup J, és a dir, quan estan associades als polimorfismes que defineixen aquest haplogrup. Segons la seva hipòtesi aquestes mutacions primàries ocorrien a l'atzar en tots els tipus de mtDNA, i en donar-se a l'haplogrup J s'incrementaria el risc de l'expressió de l'atròfia òptica. En fer una selecció de famílies LHON també s'estaria seleccionant aquest haplogrup.

L'anàlisi de l'haplogrup J indica que la combinació de mutacions secundàries 4216 + 13708 és una bona candidata per a augmentar la penetració de les mutacions primàries. Ambdues alteren aminoàcids de la NADH deshidrogenasa i podrien afectar la funció del complex I si coincideixen amb les canvis provocats per les mutacions 11778 o 14484. Malgrat l'observació anterior, és molt difícil comprovar si la penetració incompleta i variable de l'atròfia òptica de Leber és conseqüència dels diferents haplogrups al mtDNA ja que aquesta segur es veu afectada per múltiples factors ara per ara desconeguts.

Totes les variants que coincideixen a l'haplogrup J modifiquen d'alguna manera el complex I de la CRM. Pot tenir aquest fet alguna significació des d'un punt de vista evolutiu? Wallace *et al.* es pregunten com és que essent aquest un haplogrup més deleteri que la resta ha pogut assolir freqüències polimòrfiques en la població europea (Wallace 1999b), i proposen que l'haplogrup J hauria estat seleccionat durant els períodes de glaciació. Cal recordar que entre

les funcions mitocondrials hi ha la producció de calor. Aquesta funció té lloc a costa de la generació d'ATP mitjançant l'OXPPOS ja que ambdós processos necessiten l'energia potencial emmagatzemada en el gradient electroquímico mantingut a través de la membrana mitocondrial interna. En èpoques passades d'intens fred deu haver existit un fort avantatge selectiu sobre les mutacions que desacoblessin l'OXPPOS per generar calor. Contràriament, aquestes mutacions serien neutres en condicions "d'excés calòric", i per tant es podrien mantenir a la població amb freqüències polimòrfiques; però incrementarien l'expressió de la LHON si coincidissin amb una mutació lleument patogènica com per exemple la 14484C (Wallace 1999b).

FUNCIONAMENT DE LA CRM

Atès que les mutacions més freqüents associades a l'atròfia òptica de Leber afecten a subunitats del complex I de la CRM, caldria esperar-ne un funcionament anormal en pacients LHON. Tanmateix, les dades obtingudes en nombrosos treballs sobre mostres d'individus LHON han estat molt més diverses del que es preveia. És probable que les causes siguin diferències de procediments entre els laboratoris en aspectes molt importants: tipus cel·lular estudiat (leucòcits, plaquetes, limfòcits, fibroblasts, múscul esquelètic), avaluació de la respiració sobre la cèl·lula sencera o bé a partir dels mitocondris aïllats, mètodes per aïllar la fracció mitocondrial, substrats i tampons utilitzats, etc.

Tenint tot això molt en compte es pot dir que la mutació primària 11778A no sembla causar una reducció en l'activitat específica del complex I, però sí redueix a la meitat la velocitat del funcionament de la CRM quan s'utilitzen substrats lligats al NADH (emprats pel complex I), cosa no observada si el substrat usat és el succinat, captat pel complex II (FIGURA 3, pàg. 11) (Larsson 1991). Quant a la mutació 3460A, s'ha detectat una disminució de l'activitat específica del complex I d'aproximadament el 80%, també en familiars no afectes (Howell 1991), el que exemplifica la penetració incompleta de la LHON i indica que la mutació primària és necessària però no suficient per a causar la malaltia. L'estudi de la CRM en pacients amb la mutació 14484 ha aportat resultats completament oposats en bona part causats per les raons exposades anteriorment, i també per la coexistència d'altres mutacions al mtDNA, fet que afegeix confusió a les dades obtingudes.



Un treball més recent del grup del Dr Wallace en el qual estudien limfoblasts i cíbrids mitocondrials amb les mutacions 11778A, 3460A i 14484C en homoplàsmia presenta els següents resultats: els limfoblasts amb les mutacions 11778, 3460 i 14484 tenen la capacitat respiratòria reduïda entre 30-36%, 20-28% i 10-15%, respectivament. Pel que fa a l'activitat específica del complex I, les reduccions són del 20 i el 79% per les mutacions 11778 i 3460, respectivament; la mutació 14484 no afecta aquesta activitat. Els cíbrids amb les mutacions 11778 i 3460 també mostren reduccions significatives mentre que els que contenen la mutació 14484 no es veuen afectats i presenten uns valors polarogràfics dins del rang de normalitat (Brown 2000).

En considerar totes aquestes dades bioquímiques cal tenir present que s'han obtingut a partir de teixits que no són els afectats per l'atròfia òptica de Leber, i per tant no es pot inferir que el funcionament de la CRM a les cèl·lules que conformen el nervi òptic sigui el mateix que l'observat a limfoblasts o altres tipus cel·lulars.

AFFECTACIÓ DEL NERVI ÒPTIC

De quina manera el funcionament alterat de la CRM podria provocar la degeneració del nervi òptic? S'ha proposat que les anomalies de la CRM en pacients LHON produeix que s'inflin les cèl·lules ganglionars i els àxons, mitjançant un mecanisme que activaria el porus de transició mitocondrial (pàg. 13) i el canal NMDA (*N*-metil-*D*-aspartat) sensible al potencial redox. Se sap que quantitats excitotòxiques de glutamat poden activar l'apoptosi en cèl·lules nervioses, fenomen que podria estar involucrat en la degeneració del nervi òptic i les cèl·lules ganglionars, més que no pas la necrosi (Howell 1998). En la degeneració nerviosa descrita en l'atròfia òptica de Leber no s'ha identificat inflamació, característica de processos necròtics però no dels apoptòtics. Per contra, en diverses situacions s'ha observat mort cel·lular programada a les cèl·lules ganglionars que, a més, s'inhibeix amb la sobreexpressió de Bcl-2.

Per què en el cas de la mutació 11778A el programa de mort cel·lular es compleix gairebé invariablement mentre que això no és així per a la mutació 14484C? La degeneració provocada per la mutació 11778 és superior a l'originada per la 14484 (FIGURA 10), però els motius encara són desconeguts. És possible que les diverses mutacions LHON provoquin la producció de

quantitats diferents de radicals lliures, estant aquests directament implicats en mecanismes excitotòxics i d'apoptosi (Howell 1998).

AMBLIOPIA ALCOHOL-TABAC (TAA)

L'ambliopia és una disminució de la visió no deguda a causa orgànica de la que existeixen diversos tipus. L'ambliopia tòxica pot ser causada pel consum d'alcohol i tabac o per nutrició deficient; no és, en realitat, una veritable ambliopia ja que hi ha lesió orgànica del nervi òptic, però aquesta es detecta temps després de la pèrdua visual. L'ambliopia alcohol-tabac també s'anomena neuritis o neuropatia tòxica alcoholotabàquica.

Clínicament la TAA es caracteritza per anomalies visuals, presència d'escotomes als dos ulls i per una visió dels colors alterada, majoritàriament pel verd i el vermell. A més, l'agudesia visual es redueix molt substancialment (Krumsiek 1985). El mecanisme exacte pel qual el consum d'aquestes substàncies tòxiques deriva en la pèrdua de la visió no es coneix, però se sap que el consum crònic d'etanol provoca la hipoplàsia —desenvolupament incomplet— del nervi òptic (Ferriero 1992; Pinazo-Duran 1997). Quant als efectes directes sobre el mitocondri, afecta la integritat estructural i funcional dels mitocondris de fetge i augmenta el dany oxidatiu del mtDNA hepàtic (Cahill 1997), el que podria contribuir a deleccions múltiples al mtDNA hepàtic (Mansouri 1997). El consum crònic d'etanol alenteix el funcionament dels ribosomes mitocondrials i, conseqüentment, la síntesi proteica disminueix. El retard en la producció dels components de la CRM redueix la velocitat de formació d'ATP en aquests mitocondris hepàtics. Per una altra banda, s'hi produeix una quantitat superior d'espècies ROS, tant si l'exposició a l'etanol és crònica com si és aguda (Cunningham 2001).

Paral·lelament, l'alcohol pot comportar malnutrició per dos motius: primer, perquè en alguns casos els malalts a penes s'alimenten i subsisteixen amb les calories que aporta l'alcohol; segon, perquè l'etanol causa malabsorció i dany cel·lular a través de citotoxicitat directa (Lieber 1993). La manca de determinades vitamines freqüentment observada entre alcohòlics pot produir anomalies visuals que en ocasions es redueixen sota un programa d'abstinència i dieta amb suplement de vitamines B₁, B₂ i B₁₂.

Per causa de la gran semblança que existeix entre aquests símptomes i els de l'atròfia òptica de Leber certs pacients LHON —individus que



presenten mutacions LHON primàries— han estat diagnosticats erròniament com a ambliòpics TAA. La disponibilitat de l'anàlisi del mtDNA ha proporcionat una eina per a evitar aquest diagnòstic equivocat i diferenciar les dues malalties (Cullom 1993; Borruat 1994).

L'alcohol i el tabac són considerats com a potencials factors secundaris en l'etiologia de l'atròfia òptica de Leber. Fins i tot s'ha suggerit un consum superior d'aquestes substàncies tòxiques entre pacients LHON, malgrat això no s'ha arribat a demostrar (Riordan-Eva 1995). Així doncs ens trobem amb dues malalties amb una simptomatologia molt similar, però mentre al rerafons de l'ambliopia no sembla existir una causa genètica concreta, aquesta és molt evident en la LHON. La concurrència de certs factors pot desenvolupar l'atròfia òptica en individus genèticament predisposats. S'ha descrit el cas d'un home de 38 anys que pertany a una família LHON (ell mateix presenta la mutació 11778) que després d'un temps amb teràpia antivírica l'abandona per problemes d'hepatotoxicitat i, cinc mesos més tard, comença a notar els primers indicis de la LHON, amb pèrdua visual en ambdós ulls (Shaikh 2001).

D'una manera similar, el consum elevat d'alcohol o tabac pot desencadenar la pèrdua visual en individus amb mutacions LHON que en una altra situació potser no la manifestarien.

SÍNDROME DE WOLFRAM O DIDMOAD

PRESENTACIÓ CLÍNICA

L'any 1938 Wolfram i Wagener van descriure una família amb vuit fills en la qual quatre germans presentaven atròfia òptica i diabetis mellitus (Wolfram 1938). Des d'aquesta primera descripció hi ha hagut més d'un centenar d'articles que directa o indirectament s'han referit a la síndrome de Wolfram (WS, MIM 222300). Aquesta síndrome és coneguda també per l'acrònim DIDMOAD, que correspon a les inicials en anglès de diabetis insípida, diabetis mellitus, atròfia òptica i sordesa, ja que aquestes quatre malalties afecten molt freqüentment als pacients WS.

²²La majoria de pacients pateix primer la diabetis mellitus, a una mediana d'edat de sis

anys (rang: tres setmanes–16 anys). Es tracta d'una diabetis depenent d'insulina, no autoimmune ni relacionada amb el complex principal d'histocompatibilitat. Més tard es desenvolupa l'atròfia òptica, a una mediana d'edat d'onze anys (rang: sis setmanes–19 anys). El malalt perd agudesa visual i la visió de colors. Els camps visuals abans de la pèrdua de visió ja revelen escotomes centrals, i els pacients cecs perden reflexes pupil·lars (Barrett 1997b). L'existència d'aquestes dos símptomes és suficient per a diagnosticar la síndrome de Wolfram (FIGURA 11).

La diabetis insípida apareix a aproximadament el 75% dels pacients, amb una edat mediana de

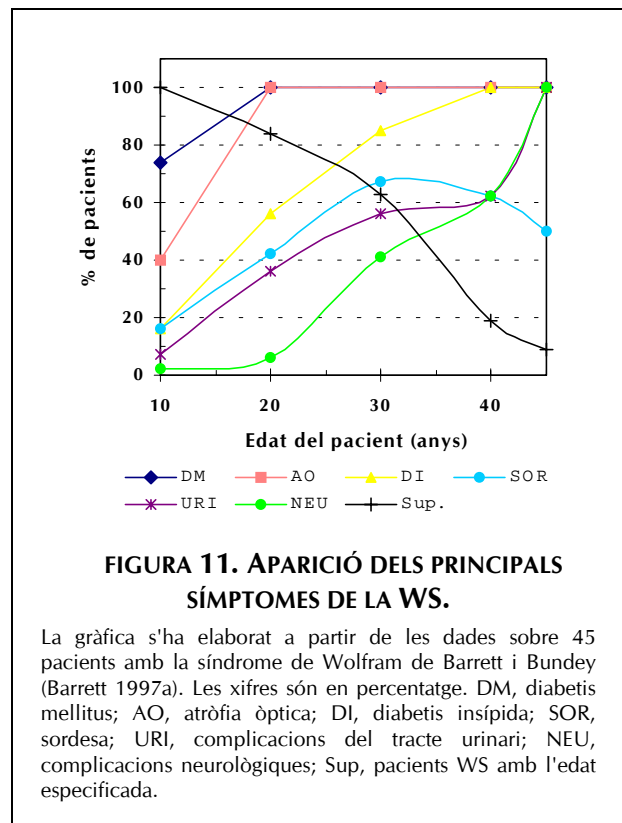


FIGURA 11. APARICIÓ DELS PRINCIPALS SÍMPTOMES DE LA WS.

La gràfica s'ha elaborat a partir de les dades sobre 45 pacients amb la síndrome de Wolfram de Barrett i Bunday (Barrett 1997a). Les xifres són en percentatge. DM, diabetis mellitus; AO, atròfia òptica; DI, diabetis insípida; SOR, sordesa; URI, complicacions del tracte urinari; NEU, complicacions neurològiques; Sup., pacients WS amb l'edat especificada.

14 anys (rang: tres mesos–40 anys). La sordesa neurosensorial es diagnostica en dues tercers parts dels pacients WS a una edat mediana de 16 anys (rang: 5–39 anys). A més d'aquests símptomes, sovint es donen altres complicacions en malalts amb la síndrome de Wolfram. Dues tercers parts dels afectats tenen problemes al tracte urinari a una mediana d'edat de 20 anys. Són nombrosos els casos amb bufeta atònica²³ i

²² Les dades que es presenten seguidament corresponen a un estudi que va identificar i caracteritzar tots els pacients WS del Regne Unit l'any 1995 (Barrett 1995).

²³ Bufeta dilatada i amb poca capacitat de contracció, sense que hi hagi evidència de lesió al SNC.



bufeta neurogènica²⁴, amb problemes comuns com ara incontinència i infeccions repetides (Aboseif 1993). Les alteracions neurològiques són força freqüents i acostumen a aparèixer cap els 30 anys, normalment amb atàxia truncal que causa pas inestable i caigudes. També s'ha observat miòclon²⁵ sobtat, reflexes reduïts de les extremitats, nistagme²⁶ horitzontal, disàrtria²⁷, apnees, pèrdua del gust i d'olfacte, i hemiparesi²⁸ (Scolding 1996).

Els individus amb WS a més poden patir problemes psiquiàtrics. En un grup de 68 afectes dels Estats Units, 41 (60%) havien tingut episodis de depressió greu, psicosi, o síndrome orgànica de cervell, i també impulsos d'agressió verbal i física (Swift 1990). Posteriorment s'estudià la freqüència de trastorns psiquiàtrics entre els familiars de pacients WS i es comparà amb l'exhibida pels cònjuges dels casos WS, descobrint que els primers —heterozigots pel gen causant de la WS— tenien una clara predisposició a patir-les (Swift 1991).

Alguns pacients WS presenten hipogonadisme, problemes gastrointestinals i respiratoris.

Com a resultat d'aquesta gran quantitat de símptomes, la síndrome de Wolfram provoca la mort dels pacients als 30 anys (25–49 anys) deguda a fallades respiratòries o insuficiències renals conseqüència d'infeccions (Kinsley 1995; Barrett 1997a).

EL CERVELL A LA WS

La síndrome de Wolfram és una malaltia neurodegenerativa progressiva amb els múltiples símptomes suara esmentats. Alguns treballs han examinat el cervell de pacients WS mitjançant ressonància magnètica i també estudis neuropatològics de teixits *post mortem*. L'observació macroscòpica del cervell d'un pacient WS mostra atròfia notable dels bulbs i tractes olfactoris, i atròfia dels nervis i quiasma òptics. Microscòpicament s'observa la disminució de fibres nervioses als nervis òptics, quiasma i tractes

²⁴ Qualsevol anomalia en el funcionament de la bufeta urinària deguda a una lesió en el SNC o perifèric.

²⁵ Contracció reflexa repetitiva d'un múscul o grups de músculs.

²⁶ Espasme reflex i repetitiu dels músculs motors del globus ocular que provoca el moviment involuntari d'aquest en diferents sentits.

²⁷ Dificultat per a comunicar-se mitjançant la parla.

²⁸ Reducció de la capacitat motora d'un costat del cos.

òptics centrals; pèrdua neuronal als cossos geniculats laterals, i també als col·licles superiors; reducció de neurones als nervis coclears (Genis 1997). En altres ocasions també s'ha descrit distròfia dels àxons generalitzada (Shannon 1999).

Galluzzi *et al.* creuen que el conjunt d'alteracions detectades en aquests estudis expliquen els símptomes més freqüents a la WS (Galluzzi 1999): la diabetis mellitus pot ser conseqüència de degeneració hipotalàmica, tot i que també s'ha descrit manca de cèl·lules β productores d'insulina als illots pancreàtics de dos malalts amb WS (Karasik 1989); l'atròfia òptica reflecteix la degeneració nerviosa de les vies visuals: atròfia, pèrdua axonal substancial i desmielinització dels nervis òptics, quiasmes, tractes i radiacions resulten en la degeneració dels col·licles superiors i dels cossos geniculats laterals; la diabetis insípida es creu relacionada amb l'atròfia i la degeneració de l'hipotàlem, amb pèrdua de neurones secretores de vassopresina als nuclis supraòptics i paraventriculars (Gabreels 1998), i degeneració del lòbul posterior de la pituitària.

GENÈTICA DE LA WS

La síndrome de Wolfram es transmet d'una forma autosòmica recessiva amb una prevalença d'un cas cada 770.000 persones al Regne Unit (Barrett 1995), i d'un cada 100.000 a Amèrica del Nord²⁹ (Fraser 1977). En nombroses ocasions s'ha observat consanguinitat entre les famílies WS.

El fet que la majoria de símptomes de la síndrome de Wolfram coincidissin amb els de moltes malalties mitocondrials va fer pensar si la WS no seria una d'aquestes. Diversos grups investigaren aquesta possibilitat a partir dels casos WS disponibles. Bunday *et al.* detectaren en un pacient anomalies mitocondrials morfològiques i bioquímiques, però no al mtDNA (Bunday 1992). L'any següent, l'Agnès Rötig i els seus col·laboradors descrigueren deficiències en les activitats dels complexos de la CRM i una deleció de 7,6 kb al mtDNA d'una nena amb WS (Rotig 1993). Bu i Rotter proposaren aleshores un model segons el qual la WS estaria originada per defectes al genoma mitocondrial o bé per alteracions al genoma nuclear que interferirien en el funcionament del mitocondri (Bu 1993), model al que donaren suport altres grups (Bunday 1993;

²⁹ Aquesta diferència pot ser conseqüència de criteris disperss a l'hora d'establir els criteris mínims per al diagnòstic de la malaltia.



Vora 1993). Més tard es descrigué l'existència de la mutació LHON 11778 a un noi de 19 anys afectat per la WS (Pilz 1994). També va aparèixer un treball en el qual s'estudiaven els mitocondris d'un malalt des d'un punt de vista bioquímic, histològic i genètic, sense trobar-se cap irregularitat excepte una mutació puntual a la posició 12308 del mtDNA, considerada un polimorfisme (Jackson 1994).

L'any 1994 Polymeropoulos *et al.* determinen mitjançant anàlisi de lligament sobre 11 pedigrís WS que el gen responsable de la malaltia es troba a la regió 4p16 (Polymeropoulos 1994). Malgrat Polymeropoulos defèn que el pacient estudiat per Rötig *et al.* no és un cas WS típic amb herència autosòmica recessiva, segueixen apareixent articles als quals es detecten alteracions mitocondrials en pacients WS (Bezold 1995; Barrientos 1996b; Barrientos 1996c). En Toni Barrientos, dins del grup de la doctora Nunes, demostrà que un locus a 4p16 predisposava a delecions múltiples del mtDNA en pacients WS, i proposà un model de transmissió semidominant segons el qual els individus homozigots pel gen mutant tindrien abundants delecions al mtDNA; els heterozigots tindrien un risc més gran de patir delecions que els no portadors, fet que els originaria alguna de les manifestacions fenotípiques característiques de la WS: diabetis i sordesa, o problemes psiquiàtrics (Barrientos 1996c).

Uns mesos més tard, s'acotà millor la regió en què es trobava el gen per la WS i es demostrà la seva heterogeneïtat genètica (Collier 1996). Hofmann *et al.* proposaren que l'haplogrup que ells anomenaren B del mtDNA (caracteritzat per les variants del mtDNA 4917, 10463, 13368, 14233 i 15928) era un factor de risc per a la WS (Hofmann 1997a), i que aquesta síndrome i la LHON estaven associades a haplogrups del mtDNA diferents (Hofmann 1997b). L'anàlisi de la regió 4p en una família japonesa confirmà el lligament del gen responsable de la malaltia i revelà que l'haplotip patogènic incrementa el risc de diabetis i de sordesa en els portadors (Ohata 1998). A la vegada, Swift *et al.* estimaren que els heterozigots tenen una probabilitat de ser hospitalitzats per problemes psiquiàtrics 26 vegades superior a la dels no portadors (Swift 1998).

És a finals de l'any 1998 que dos grups pràcticament a l'hora localitzen mitjançant clonatge posicional un gen a 4p16 amb mutacions als individus amb la síndrome (Inoue 1998; Strom 1998). El gen —*WFS1*— està compost per vuit

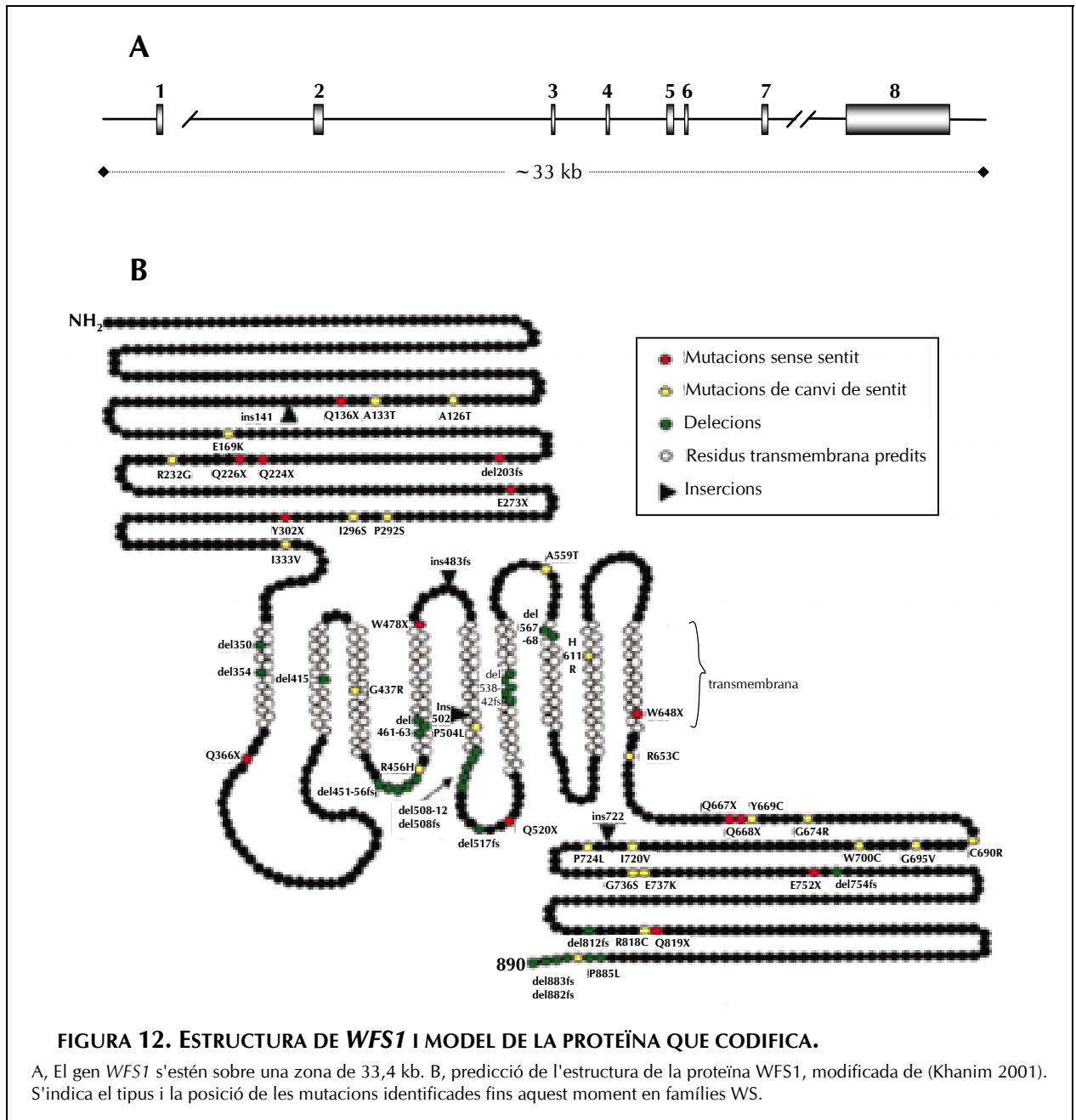
exons (FIGURA 12). Els set primers són petits, mentre que l'exó 8 supera les 2,5 kb. La seqüència de cDNA prediu una proteïna de 890 aminoàcids, amb una massa molecular de 100 kDa. Mitjançant programes de predicció d'estructura de proteïnes s'espera que la proteïna *WFS1* tindrà tres dominis estructurals: un hidrofílic N-terminal extracitoplàsmic, un hidrofílic C-terminal intracitoplàsmic, i un domini central hidrofòbic amb 9–10 segments transmembrana (FIGURA 12). *Northern blots* mostren que el gen s'expressa fortament a cor, mitjanament a placenta, pàncrees (preferentment als illots), pulmó, i cervell, i feblement a ronyó, múscul i fetge. La proteïna *WFS1* no sembla presentar homologia amb altres seqüències publicades de DNA o proteïna.

El-Shanti *et al.* han aportat proves sobre l'heterogeneïtat clínica i genètica de la WS en identificar un segon locus per a la síndrome (*WFS2*) a la regió 4q22–24 en famílies WS que no pateixen diabetis insípida (El-Shanti 2000). Onze dels 16 pacients en aquest treball presentaven una nova manifestació clínica en malalts amb la síndrome de Wolfram: hemorràgies al tracte gastrointestinal (al-Sheyyab 2001).

El fet que en els més recents treballs amb pacients WS no s'hagin detectat mutacions ni grans reordenaments al mtDNA ha qüestionat la implicació del mitocondri en aquesta síndrome (Hofmann 1997a; Strom 1998; Hardy 1999), però altres veus recorden que són molt escassos els treballs que estudien un teixit de pacients WS diferent al sanguini (Gerbitz 1999). En aquests casos gairebé sempre s'han detectat alteracions mitocondrials histològiques, bioquímiques o genètiques (Bundey 1992; Bundey 1993; Rotig 1993; Barrientos 1996b; Barrientos 1996c). Barrett *et al.* han estat dels últims investigadors a pronunciar-se sobre aquest tema i, per una banda, desmenteixen que la WS estigui associada a un haplotip del mtDNA³⁰; a més, insisteixen a descartar qualsevol intervenció del mitocondri en la patogènesi de la WS, malgrat només han examinat el mtDNA obtingut de sang (Barrett 2000). Són conscients d'aquest fet, però mantenen que els individus WS als quals s'ha detectat alteracions mitocondrials presenten fenotips atípics de la síndrome.

³⁰ En oposició a altres treballs a partir d'un nombre menor de pacients (per exemple (Hofmann 1997b)).





La localització exacta de la proteïna WFS1 i el coneixement de la seva funció o funcions ha de clarificar quin paper juga el mitocondri en aquesta síndrome i, el que és més important, pot ser de gran ajut per a preparar tractaments destinats a reduir els greus símptomes que pateixen els malalts WS, amb la finalitat que s'augmenti la seva qualitat i esperança de vida. També podria contribuir al diagnòstic prenatal de la malaltia.

Ja s'estan donant les primeres passes en la caracterització de la proteïna WFS1. Takeda *et al.* han preparat anticossos específics contra l'extrem C-terminal de la proteïna i mitjançant centrifuga-

ció diferencial han trobat que es localitza al reticle endoplasmàtic de fibroblasts primaris humans (Takeda 2001). També han estudiat la seva distribució regional i la del mRNA en talls de cervell de ratolí, determinant que hi ha una expressió neuronal selectiva tant del mRNA com de la proteïna. Aquest grup ha observat que no hi ha una correspondència total entre les regions més afectades en pacients Wolfram i les regions amb nivells elevats de proteïna en cervell de ratolí. Per a explicar aquesta discrepància proposen que a més de diferències entre les dues espècies, poden existir altres factors intrínsecs a les cèl·lules



afectades que desencadenin processos apoptòtics (Takeda 2001).

LIPODISTRÒFIA ASSOCIADA A TERÀPIA ANTIVÍRICA

La qualitat de vida dels pacients amb la SIDA ha experimentat una millora molt important gràcies a la utilització de teràpies amb molècules antivíriques. Actualment hi ha tres tipus d'antivírics emprats en els tractaments de les persones infectades amb el virus d'immunodeficiència humana (HIV): els inhibidors nucleòsids de la transcriptasa inversa (NRTI), els inhibidors no nucleòsids de la transcriptasa inversa (NNRTI), i els inhibidors de proteases (PI).

Tots els NRTI que s'utilitzen en l'actualitat són didesoxinucleòsids que es fosforilen intracel·lularment i són convertits a ddNTP. La incorporació d'un d'aquests ddNTP a la cadena de DNA provoca l'aturada en la síntesi ja que els manca el grup hidroxil en la posició 3' del sucre i aleshores no es pot formar l'enllaç fosfodièster amb el grup 5'-fosfat del següent nucleòtid. La transcriptasa inversa de l'HIV és inhibida per aquests ddNTP. Pel que fa als PI, aquestes drogues s'uneixen al centre actiu de la proteasa de l'HIV i la inhibeixen, amb el que s'impedeix el processament dels precursors de proteïnes estructurals i empaquetadores del RNA viral *gag* i *gag-pol*. Quant als NNRTI —les substàncies que s'han incorporat més recentment a la teràpia contra l'HIV—, impedeixen la funció de la transcriptasa inversa puix que s'uneixen al centre actiu de l'enzim i el bloquegen.

L'altra cara de la moneda és la quantitat d'efectes secundaris que comporten aquestes substàncies, alguns i algunes de les quals es recullen a la **TAULA 5**, modificada de (Brinkman 1998; Flexner 1998). L'aplicació dels PI i dels NNRTI és més recent que la dels NRTI, que van ser els primers fàrmacs usats per a combatre el virus de la SIDA, en concret la zidovudina o AZT. És per això que la informació disponible sobre els efectes secundaris d'aquests compostos es basa únicament en el tractament d'alguns milers de

pacients per cada droga. Alguns NRTI, al contrari, es venen administrant des de fa més de 10 anys i per tant la casuística és molt superior. Existeixen centenars d'articles que descriuen els efectes secundaris d'aquesta o aquella droga o combinació de drogues en múltiples grups de pacients HIV positius. Malgrat això, encara no es coneixen els mecanismes precisos d'interacció entre les molècules antivíriques i el metabolisme del pacient que expliquin l'afectació tan variada.

Des de fa aproximadament cinc anys els protocols terapèutics inclouen normalment dos NRTI i com a mínim un PI: és la **teràpia antivírica altament activa** o **HAART**. La teràpia exclusivament amb PI s'ha desaconsellat perquè la durada de la resposta antivírica és limitada (entre d'altres motius per l'aparició de virus resistents). En canvi, la combinació de PI amb NRTI o NNRTI és capaç

d'eliminar l'HIV durant llargs períodes de temps (Flexner 1998) i ha reduït la mortalitat i la morbositat del virus en una gran proporció de pacients. Malauradament, però, la HAART també està associada a una sèrie d'efectes secundaris entre els quals la **lipodistròfia (LD)** és un dels més freqüents i dels que més limita la teràpia antivírica de llarga durada (Martínez 2001).

Les definicions inicials de la **síndrome de LD associada a teràpia anti-HIV** parlaven de lipo-

atròfia perifèrica, acumulació de greix al tronc, dislipidèmia i resistència a insulina. Els primers treballs en què es descriuen casos LD-HIV daten del 1998 (Carr 1998a; Viraben 1998). Ambdós treballs implicaven als PI en la patogènesi de la LD, i es van proposar diverses hipòtesis per a explicar aquesta suposada relació (Carr 1998b; Martínez 1998; Milpied-Homsí 1999). En l'actualitat no està clar si els símptomes anteriors pertanyen a una o a dues síndromes, ni existeix una definició consensuada de la lipodistròfia associada a la teràpia antivírica. En aquest sentit, el *First International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV* celebrat a San Diego l'any 1999 tampoc va aconseguir elaborar un concepte gaire concret. Allà es va acordar que el diagnòstic de LD havia de ser

TAULA 5. SUBSTÀNCIES ANTIVÍRIQUES I EFECTES SECUNDARIS DESCRITS

Inhibidors de proteïnes

indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir

nàusees, vòmits, diarrea, fatiga, nefrolitiasi, hiperbilirrubinèmia, ↑ aminotransferases, hipertrigliceridèmia, hiperglicèmia, redistribució del greix corporal

Inhibidors nucleòsids de la transcriptasa inversa

zidovudina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, didanosina, abacavir

neuropatia, miopatia, cardiomiopatia, pancreatitis, esteatosi hepàtica, acidosi làctica, toxicitat nefrològica, hematològica i dermatològica



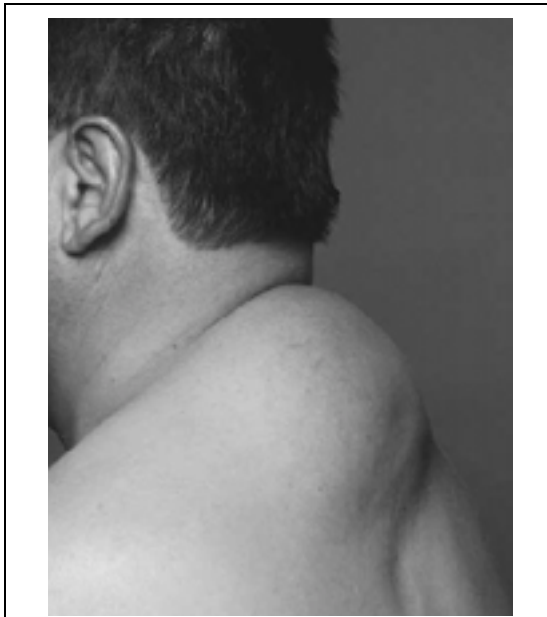


FIGURA 13. BUFFALO HUMP.

Fotografia extreta de (Aboulaflia 1998). Mostra un senyor de 52 anys infectat per l'HIV al que inicialment es va tractar amb dos NRTI. Després de 15 mesos la càrrega vírica tornà a augmentar i se li va aplicar una HAART que consistí en dos NRTI i un PI. Passat un any, el pacient va manifestar dificultats a l'hora de cordar-se la camisa. L'observació clínica va identificar una massa de greix de 16 cm per 14 cm, sense anomalies endocrines ni al metabolisme dels lípids.

confirmat pel metge³¹, i es va consensuar que la pèrdua de greix associada a LD s'observa sobretot a les galtes i els glutis, mentre que l'acumulació de greix ocorre al tronc, provocant un increment del perímetre abdominal. En alguns pacients també pot observar-se hipertròfia dels pits, una gepa a la part posterior del coll (o *buffalo hump*, vegeu la **FIGURA 13**), lipomes i un increment del greix de la cara. La formulació d'un concepte més definit de LD va ser posposada per a futures trobades.

Si bé al principi es va responsabilitzar als PI de la LD, posteriorment també es va descriure aquesta complicació en pacients en règims amb NRTI que mai no havien estat tractats amb PI (Lo 1998; Madge 1999; Saint-Marc 1999), per la qual cosa la mirada es va a dirigir cap els NRTI, sobretot considerant que la gran majoria de pacients tractats amb PI havien estat tractats en primer lloc amb NRTI en haver estat les primeres drogues disponibles. Carr *et al.* defensen que tant

³¹ El diagnòstic de lipodistròfia no podia basar-se només en la informació aportada pel pacient, malgrat en un estudi amb 158 persones HIV positives tractades o no amb PI va existir una concordança del 98% entre l'exploració física dels metges i els informes dels mateixos pacients (Carr 1999).

les teràpies amb NRTI com les teràpies amb PI poden causar la LD descrita en pacients HIV positius (Carr 2000).

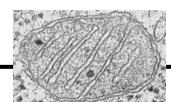
IMPLICACIÓ MITOCONDRIAL EN LA LD-HIV

Moltes drogues antivíriques alteren el funcionament dels mitocondris. Com ja s'ha vist, els NRTI actuen inhibint la transcriptasa inversa de l'HIV. També són capaces, però, d'inhibir les DNA polimerases humanes β i γ . La resta de DNA polimerases — α , δ i ϵ — no són afectades pels anàlegs de nucleòsids (Brinkman 1998). Mentre es desconeix l'efecte patogènic de la inhibició de la DNA polimerasa β (implicada en mecanismes de reparació del DNA), se sap que la inactivació de la polimerasa γ impedeix la replicació mitocondrial, ja que aquesta és l'única polimerasa que es troba dins d'aquests orgànuls (Lewis 1995).

L'efecte nociu dels antivírics sobre els mitocondris és llargament conegut. *In vitro* poden reduir la viabilitat cel·lular i el contingut de mtDNA, i alterar la morfologia mitocondrial (Medina 1994). El grau d'aquests canvis és directament proporcional a la concentració de droga emprada. Els efectes *in vivo*, com que bloquegen la replicació del mtDNA, són molt semblants als que s'observen en mitocondriopaties d'origen genètic: miopatia, neuropatia, acidosi làctica, cardiomiopatia, etc. (Brinkman 1998).

L'AZT ha provocat nombrosos casos de miopatia mitocondrial, i en alguns als que ha estat possible practicar una biòpsia muscular s'ha trobat depleció del mtDNA (Arnaudo 1991; Mhiri 1991; Casademont 1996). També és freqüent la presència de fibres vermelles desestructurades i d'inclusions paracristal·lines. Tant els símptomes clínics com les alteracions moleculars poden revertir si s'abandona el tractament amb AZT (Masanes 1998). García de la Asunción *et al.* han observat una producció de radicals lliures elevada en pacients tractats amb AZT; aquest grup proposa la següent hipòtesi: en no haver replicació del mtDNA no hi haurà generació de nous mitocondris, i restaran tan sols mitocondris vells que produeixen una major quantitat de peròxids. Proposen que l'estrès oxidatiu contribueix directament o indirectament a les anomalies provocades per l'AZT, ja que han observat que amb l'administració d'antioxidants (vitamines C i E) s'evita el dany mitocondrial (de la Asunción 1998).

D'altra banda, s'han descrit anomalies en la CRM atribuïdes a l'exposició perinatal de NRTI



(Blanche 1999), tot i que alguns investigadors qüestionen aspectes del treball (Morris 1999). Els NRTI poden causar complicacions molts greus, com és l'acidosi làctica i esteatosi³² al fetge, casos en els quals també s'han identificat deficiències en els complexos de la CRM (Brivet 2000; Carr 2001).

Brinkman *et al.* impliquen directament la toxicitat mitocondrial causada pels NRTI amb l'origen de la lipodistròfia en pacients HIV (Brinkman 1999). Kakuda *et al.* també ho fan, i proposen que l'afectació específica dels adipòcits pot ser deguda al funcionament particular d'aquestes cèl·lules en les diferents zones del cos humà i a una especificitat tissular dels NRTI (Kakuda 1999). Així, com que els adipòcits de regions centrals tenen una taxa de lipòlisi més elevada que els adipòcits perifèrics, i atès que aquesta via és dependent d'energia, els primers necessitarien un major nombre de mitocondris que els segons. Si manca l'energia suficient, els lípids s'acumularan en les zones centrals. La hiperlipidèmia i la resistència a insulina (que acompanyen freqüentment a la LD) poden ser conseqüència d'alteracions en la funció dels adipòcits, i la pèrdua de greix perifèric pot ser deguda a apoptosi als adipòcits més que no pas necrosi, ja que no hi ha inflamació ni dolor. A més, l'apoptosi dels adipòcits també podria explicar la hipertrigliceridèmia observada en molts pacients amb LD.

Altres investigadors aposten per un origen de la LD multifactorial, en el qual cal considerar les interaccions entre la pròpia infecció vírica i el balanç energètic o l'eliminació de triglicèrids, els efectes dels PI en l'adipogènesi, les interaccions amb la lipasa hepàtica, etc. D'altres, en canvi, es mostren escèptics amb el paper que pugui tenir la toxicitat mitocondrial (Moyle 2001).

Paral·lelament a les contradiccions quant a les causes que provoquen la síndrome de LD, també hi ha certes discrepàncies en els percentatges de pacients HIV afectats i entre estudis que intenten determinar els factors de risc d'aquesta complicació. Darrerament s'estan publicant resultats a partir de treballs sobre un gran nombre de pacients tractats amb PI, en ocasions prospectius. Els factors que poden predir la "intensitat" de la LD són la durada de la teràpia, les concentracions de triglicèrids en dejuni i pèptid C durant la teràpia (Carr 1999). Altres grups detecten un risc més elevat per a les dones,

tant heterossexuals com homosexuals, que augmenta amb l'edat i la durada del règim HAART (Martínez 2001). En canvi, no troben un risc superior associat a una exposició creixent a cap dels retrovírics individuals.

³² Adiposi, degeneració grassa.

