

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de FISIOLÓGIA ANIMAL



ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LAS ALTERACIONES
MITOCONDRIALES INDUCIDAS POR ZIDOVUDINA
(AZT) EN RATA

M^a TERESA CORCUERA PINDADO

Madrid, 1994

V^o B^o LOS DIRECTORES

ANTONIO LOPEZ BRAVO MONICA DE LA FUENTE

[Firma de Antonio Lopez Bravo] *[Firma de Monica de la Fuente]*

M^a TERESA CORCUERA

[Firma de M^a Teresa Corcuera]

Deseo expresar mi agradecimiento:

* *A los Directores de esta Tesis: Prof, Dr. Antonio López Bravo, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del C.I.C. de quién partió la idea y el apoyo incondicional, y a la Prof Dra. Mónica de la Fuente Catedrática del Dpto de Fisiología Animal (Facultad de C. Biológicas) que con su asesoramiento y supervisión ha contribuido en todo momento.*

* *A todos los compañeros del Servicio de Anatomía Patológica Drs: Ma José Alonso, Ana Picazo, Fernando Gómez, Manuel Roldán, Ma Luisa Nájera e Isabel Curiel quienes han participado activamente cada uno en las áreas de su conocimiento, así como su estímulo moral en todo momento. A las personas del laboratorio: Marina, Sole, Marisa, Angel, Gertrudis y Pedro y Carmen Hoyos.*

* *Al Prof Dr Ricardo Martínez-Rodríguez que desde el primer momento confió en que este tema llegaría a buen fin, poniendo en mí el conocimiento de técnicas histoenzimológicas tan utilizadas y conocidas por él. A su colaboradora Dra Ana Fernández que ha asistido voluntariamente en el proceso de perfusión y de técnicas histoquímicas.*

* *A la Dra. Ma José Pérez, por permitir que estuvieran los animales que componen este experimento en el CMVJS (Instituto Carlos III) y especialmente a Lucinio que se ha encargado de ellos diariamente.*

* *A la Dra. Ma luisa Carrillo farmaceutica del C.I.C por facilitarme el medicamento (AZI) necesario para este estudio.*

* *A la Dra Araceli Monzón del Servicio de urgencias del C.I.C. por permitir la utilización de los analizadores hematológicos y bioquímicos.*

* *A la Prof Dra E. Múñiz del Dpto de Biología Celular de la Facultad de C. Biológicas quién me ha orientado con las fotografías de microscopía electrónica desde un punto de vista morfológico con su inestimable asesoramiento y apoyo.*

* *Por último y muy especialmente a mi familia y amigos que han llevado la parte más ingrata y sin quienes no habría sido posible la realización y finalización de este trabajo.*

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| ADE..... | Relación de plaquetas/tamaño de hematies. |
| ADN..... | Acido desoxiribonucléico. |
| ADNmit..... | ADN mitocondrial. |
| ARN..... | Acido ribonucleico. |
| ARNm..... | ARN mensajero. |
| ARNmit..... | ARN mitocondrial. |
| AMT..... | 3' deoxitimidina. |
| AZT o ZDV..... | Azidotimidina o zidovudina. |
| CDC..... | Center Diseases Control. |
| CHCM..... | Concentración de hemoglobina corpuscular media. |
| CK..... | Creatinacinas. |
| CN..... | Cianuro potásico. |
| CRS..... | Complejo Relacionado con SIDA. |
| ddI..... | Didesoxinosina. |
| ddC..... | Didesoxicitidina. |
| D.O..... | Densidad óptica. |
| dTTP..... | 2' 3'-dideoxitimidina-5'-trifosfato. |
| EF..... | Enzimas dependientes de flavina. |
| EIA..... | Anemia infecciosa equina. |
| FN..... | Fibras nerviosas. |
| GAMT..... | 3' amino 3 deoxitimidina glucurónico. |
| GAZT...3'-azido-3' deoxy-5'-BD- | glucopiranosil timidina. |
| GPT..... | Glutámico-pirúvico transaminasa. |
| GOT..... | Glutamato-oxalácetico. |
| HB..... | Hemoglobina. |
| HCM..... | Hemoglobina corpuscular media. |
| HE..... | Hematoxilina eosina. |
| HTLV..... | Virus de la Leucemia Humana de células T. |
| IFN..... | Interferón. |
| IL..... | Interleuquina. |
| IN..... | Integrasa. |
| KD..... | Kilo Daltons. |
| LAV..... | Virus asociado a linfadenopatía. |
| LCR..... | Líquido cefalorraquídeo. |
| LDH..... | Lactato deshidrogenasa. |
| Leuc..... | Leucocitos. |
| M..... | Mitocondrias. |
| MB..... | Meldola Blue. |
| MLV..... | Virus de la Leucemia del ratón. |
| mM..... | Milimolar. |
| MHz..... | Megahertzios. |
| mio..... | Miocitos. |
| NAD..... | Nicotinamida adenina dinucleótido. |

NADP..... Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NK..... Células asesinas naturales o "Natural Killer".
pmol..... Picomoles.
PR..... Proteasa.
REL..... Retículo endoplásmico liso.
RER..... Retículo endoplásmico rugoso.
RL.....Radicales libres.
RN.....Ribonucleasa.
RNasa H.....Ribonucleasa H.
RSV..... Virus de Sarcoma de Rous.
RTL..... Repeticiones terminales Largas del genoma del VIH.
RT o TR o TI..... Transcriptasa inversa.
SIDA..... Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
SOD.....Superóxido dismutasa.
UI..... Unidades Internacionales.
USP.DI.....United States Pharmacopeial Convention.
.....Dispensation Information.
VIH..... Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
VIS..... Virus de la Inmunodeficiencia de los simios.

RELACION DE CUADROS, TABLAS, GRAFICOS Y FIGURAS**CUADROS**

| | |
|---|---|
| 1.1. Distribucción de los retrovirus conocidos..... | 4 |
| 1.2. Cronología fundamental en el conocimiento de retrovirus..... | 5 |
| 1.3. Géneros de la familia Retroviridae..... | 6 |
| 1.4. Subgéneros y especies de Lentivirus..... | 7 |

TABLAS (Tab)

| | |
|--|-----|
| 3.1. N° de animales por grupos y tiempo de sacrificio del Grupo A..... | 63 |
| 3.2. N° de animales por grupos y tiempos. Grupo B..... | 63 |
| 4.1. Peso de los animales en gr. Grupo 1. Grupo A. Lotes I a V..... | 116 |
| 4.2. Peso de los animales. Grupo 1. Grupo B. Lotes VI y VII..... | 116 |
| 4.3. Peso de los animales. Grupo 2. Grupo A. Lotes I a V..... | 117 |
| 4.4. Peso de los animales. Grupo 2. grupo B. Lotes VI y VII..... | 117 |
| 4.5. Peso de los animales. Grupo 3. Grupo A. Lotes I a V..... | 118 |
| 4.6. Peso de los animales. Grupo 3. Grupo B. Lotes VI y VII..... | 118 |
| 4.7. Consumo de bebida Grupos 1,2,3. Grupo A. Lotes I a V..... | 121 |
| 4.8. Consumo de bebida. Grupos 1,2,3. Grupo B. Lotes VI y VII..... | 121 |
| 4.9. Consumo en ml/Kg/día. Grupos1, 2, 3. Grupo A. Lotes I a V..... | 123 |
| 4.10. Consumo en ml/Kg/día. Grupos1, 2, 3. Grupo B. Lotes VI y VII..... | 123 |
| 4.11. Consumo medio de dosis de AZT. Grupos 1 y 2. Grupo A..... | 124 |
| 4.12. Estudio estadístico NADPH-DH en cerebelo con análisis de imagen..... | 159 |
| 4.13. Estudio estadístico de NADH-DH en cerebelo con análisis de imagen..... | 160 |
| 4.14. Estudio estadístico de málico-DH en cerebelo con análisis de imagen..... | 161 |
| 4.15. Estudio estadístico de Succinato-DH en cerebelo con análisis de imagen..... | 161 |
| 4.16. Estudio estadístico de isocitrato-DH en cerebelo con análisis de imagen..... | 161 |
| 4.17. Medias y desviaciones estandar de la media de las densidades ópticas de hígado con actividad málico DH..... | 162 |
| 4.18. T- student y valor de p de la media de las densidades ópticas de la actividad málico DH en hígado (AZT 30, 120 días y control)..... | 163 |
| 4.19. Hematología de los animales..... | 165 |
| 4.20. Bioquímica de los animales..... | 166 |

GRAFICAS (Graf)

| | |
|---|-----|
| 4.1. Incremento de peso Grupos 1,2 y 3. Grupo A. Lotes I a V..... | 119 |
| 4.2. Incremento de peso. Grupos 1, 2 y 3. Grupo B..... | 119 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Consumo de bebida. Grupos 1, 2, 3. Grupo A. Lotes I a V..... | 122 |
| 4.4. Consumo de bebida. Grupos 1, 2, 3. Grupo B. Lotes VI y VII..... | 122 |
| 4.5. D.O. de actividades histoenzimáticas de musculo cardiaco de animales tratados con AZT 30 días y control..... | 140 |
| 4.6. D.O. de activiadaes histoenzimáticas de animales con AZT 60 días y control..... | 140 |
| 4.7. D.O. actividades histoenzimáticas de animalñes que han ingerido 120 días AZT y control..... | 141 |
| 4.5a. Pérfil densitométrico de musculo cardiaco, con análisis de imagen en animales del grupo control..... | 158 |
| 4.6a. Pérfil densitométrico, mediante análisis de imagen de músculo cardiaco de animales tratados con AZT..... | 158 |

FIGURAS

| | | |
|-------|---|-----|
| 1.1. | Estructura del virión..... | 8 |
| 1.2. | Esquema del ciclo infectivo del VIH..... | 12 |
| 1.3. | Estructura química de la zidovudina (AZT) y timidina | 18 |
| 1.4. | Mecanismo de acción del AZT..... | 20 |
| 1.5. | Biotransformación de AZT a GAZT..... | 24 |
| 1.6. | Niveles de actuación de antirretrovirales en el ciclo replicativo del VIH..... | 38 |
| 3.1. | Estructura química de la sal de tatrazolio..... | 69 |
| 3.2. | Equipo de análisis de imagen..... | 83 |
| 4.1. | Corte semifino, músculo cardíaco, animales grupo control (azul de toluidina)..... | 167 |
| 4.2. | HE músculo cardíaco, animales 30 días con AZT..... | 167 |
| 4.3. | HE músculo cardíaco, animales con AZT 60 días..... | 168 |
| 4.4. | Tricrómico de Masson, animales 60 días con AZT..... | 168 |
| 4.5. | Sección de hígado, grupo control..... | 169 |
| 4.6. | Sudán III + hematoxilina, grupo control..... | 169 |
| 4.7. | Detalle de Sudán III + hematoxilina, grupo control.. | 169 |
| 4.8. | Sección hepática animales con AZT 15 días..... | 170 |
| 4.9. | Tinción para hierro animales con AZT 15 días..... | 170 |
| 4.10. | Hepatocitos vacuolizados, HE (AZT 30 días)..... | 170 |
| 4.11. | Tricrómico en hígado (AZT 30 días)..... | 170 |
| 4.12. | HE en hígado, AZT 90 días..... | 171 |
| 4.13. | PAS en hígado, AZT 90 días..... | 171 |
| 4.14. | Tricrómico en hígado, AZT 90 días..... | 171 |
| 4.15. | Reticulina de Wilder en hígado, AZT 90 días..... | 171 |
| 4.16. | Tinción para hierro (T. Perl's), AZT 90 días..... | 172 |
| 4.17. | Detalle de hepatocito positivo a grasa con Sudán III, AZT 90 días..... | 172 |
| 4.18. | Panorámica hígado con Sudán III + hematoxilina, AZT 90 días..... | 172 |
| 4.19. | Azul de toluidina en corte semifino hepático, AZT 90 días..... | 172 |
| 4.20. | Sección de cerebro con HE..... | 173 |
| 4.21. | Sección de cerebelo con HE..... | 173 |
| 4.22. | Médula renal con HE, grupo control..... | 173 |
| 4.23. | Zona cortical renal, HE, grupo control..... | 174 |
| 4.24. | Reticulina de Wilder en riñón del grupo control..... | 174 |
| 4.25. | Tricrómico en riñón del grupo control..... | 174 |
| 4.26. | Actividad málico DH (M-DH) en cerebelo, grupo con AZT | 175 |
| 4.27. | Actividad M-DH en hígado, grupo AZT..... | 175 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.28. | Actividad M-DH en riñón, grupo AZT..... | 175 |
| 4.29. | Actividad M-DH en cerebro (cortex somatosensorial), grupo AZT..... | 176 |
| 4.30. | Actividad M-dH en caudado putamen, animales con AZT. | 176 |
| 4.31. | Actividad isoctrato DH (I-DH) en cerebro, animales con AZT..... | 177 |
| 4.32. | Detalle de actividad I-DH en cerebro, animales con AZT..... | 177 |
| 4.33. | Actividad I-DH en caudado putamen, animales con AZT. | 178 |
| 4.34. | Actividad I-DH en cerebelo, animales con AZT..... | 178 |
| 4.35. | Actividad succinato DH (S-DH) en cerebro (cortex somatosensorial), animales con AZT..... | 179 |
| 4.36. | Neuronas con actividad S-DH en caudado putamen, animales con AZT..... | 179 |
| 4.37. | Actividad S-DH en cerebelo, animales con AZT..... | 179 |
| 4.38. | Actividad NADH DH en corteza cerebral, animales con AZT..... | 180 |
| 4.39. | Actividad NADH DH en caudado putamen, animales con AZT..... | 180 |
| 4.40. | NADH DH en cerebelo, animales con AZT..... | 180 |
| 4.41. | NADH DH en corteza somatosensorial..... | 181 |
| 4.42. | NADH DH en cerebelo, animales con AZT..... | 181 |
| 4.43. | NADH DH en hígado, animales con AZT..... | 181 |
| 4.44. | NADH DH en riñón de animales con AZT..... | 182 |
| 4.45. | NADH DH en músculo cardiaco, animales con AZT..... | 182 |
| 4.46. | Detalle de neurona NADPH DH positiva..... | 182 |
| 4.47. | NADPH DH en caudado putamen, animales con AZT..... | 183 |
| 4.48. | Detalle neuronas NADPH DH, animales con AZT..... | 183 |
| 4.49. | ADPH DH en cerebelo, animales con AZT..... | 183 |
| 4.50. | Esquema fibra cardiaca (Tomado de Carrascal)..... | 184 |
| 4.51. | Microfotografía músculo cardiaco, animales grupo control..... | 184 |
| 4.52. | Microfotografía de músculo cardiaco, grupo control.. | 184 |
| 4.53. | Detalle de bandas, líneas y mitocondrias cardiacas, grupo control..... | 184 |
| 4.54. | Panorámica de fibras musculares, grupo control..... | 184 |
| 4.55. | Mitocondrias de músculo cardiaco con crestas retraidas..... | 185 |
| 4.56. | Desorganización de crestas en músculo cardiaco, AZT 30 días..... | 185 |
| 4.57. | Detalle mitocondrial en músculo cardiaco, AZT 30 días | 185 |
| 4.58. | Panorámica de músculo cardiaco con mitocondrias con edema y tumefacción, 30 días con AZT..... | 185 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.59. | Fibras cardiacas, animales con AZT 30 días, con alteraciones mitocondriales..... | 185 |
| 4.60. | Fibras musculares cardiacas con mitocondrias desestructuradas y pérdida de desmosomas, AZT 30 días | 186 |
| 4.61. | Mitocondrias con aspecto normal junto a otras con alteraciones, AZT 30 días..... | 186 |
| 4.62. | Fibras cardiacas parcialmente desestructuradas y mitocondrias con alteraciones, 30 días con AZT..... | 186 |
| 4.63. | Sección transversal de músculo cardiaco, con mitocondrias desestructuradas y otras de aspecto como las control..... | 186 |
| 4.64. | Edema intracelular e intramitocondrial en músculo cardiaco, AZT 30 días..... | 186 |
| 4.65. | Microfotografía captada con analizador de imagenes con mitocondrias de músculo cardiaco, AZT 30 días... | 187 |
| 4.66. | Negativo microfotografía capatado con análisis de imagen, de músculo cardiaco..... | 187 |
| 4.67. | Contorno de mitocondria, mediante análisis de imagen, en músculo cardiaco..... | 187 |
| 4.68. | Identificación de mitocondrias de músculo cardiaco con análisis de imagen..... | 187 |
| 4.69. | Diferenciación de mitocondrias con alteraciones respecto a las que se asemejan a los controles, con análisis de imagen..... | 187 |
| 4.70. | Sección transversal muscular con mitocondrias en división (AZT 30 días + 15 días de agua)..... | 187 |
| 4.71. | Detalle de diferentes disposiciones de crestas mitocondriales, animales lote VI..... | 188 |
| 4.72. | Sección transversal de músculo cardiaco con mitocondrias que prsentan diferente disposición de crestas, lote VI..... | 188 |
| 4.73. | Crestas mitocondriales con diversos aspectos, músculo cardiaco, animasles del lote VI..... | 188 |
| 4.74. | Conjunto de mitocondrias con alteraciones y diferentes aspectos de sus crestas, lote VI..... | 188 |
| 4.75. | Signos de tumefacción y vacuolización en mitocondrias de fibras cardiacas, lote VI..... | 189 |
| 4.76. | Panorámica de fibra muscular con mitocondrias, célula endotelial y podocito, AZT 60 días (Lote III)..... | 189 |
| 4.77. | Vacuolización intramitocondrial lote III, en fibra cardiaca..... | 189 |
| 4.78. | Representación del diámetro mitocondrial mediante análisis de imagen..... | 189 |
| 4.79. | Microfotografía panorámica, animales con AZT 90 días, aspecto similar al control..... | 190 |
| 4.80. | Sección longitudinal cardiaca, AZT 90 días. vacuolizaciones ocasionales..... | 190 |
| 4.81. | Detalle banda escaleriforme en fibra muscular, similar al control, animales AZT 120 días..... | 190 |
| 4.82. | Músculo cardiaco, animal con AZT 120 días..... | 190 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.83. | Dibujo-esquema de sección hepática (tomado de Carrascal)..... | 191 |
| 4.84. | Microfotografía panorámica hígado de rata, grupo control..... | 191 |
| 4.85. | Sección hepática de animal control..... | 191 |
| 4.86. | Hepatocito de animal que ha ingerido AZT 15 días, con vacuolas que engloban material. Mitochondrias con aspecto como en el control..... | 192 |
| 4.87. | Panorámica hepática con célula endotelial y hepatocito, 15 días con AZT..... | 192 |
| 4.88. | Sección hepática de animales que han ingerido AZT 15 días. Aparecen vacuolas autofágicas..... | 192 |
| 4.89. | Mitochondrias hepáticas con matriz de baja densidad electrónica y crestas alteradas (AZT 15 días)..... | 192 |
| 4.90. | Hepatocito con mitochondrias que presentan retracción de crestas (AZT 30 días)..... | 193 |
| 4.91. | Hepatocito con dilatación de RER y mitochondrias con alteraciones, AZT 30 días..... | 193 |
| 4.92. | Microfotografía con RER dilatado y mitochondrias con diferentes alteraciones, AZT 30 días..... | 193 |
| 4.93. | Detalle de mitochondrias alteradas y vacuolas autofágicas que engloban restos mitocondriales, AZT 30 días..... | 193 |
| 4.94. | Dilatación de REL de un hepatocito y vacuola autofágica, AZT 30 días..... | 193 |
| 4.95. | Núcleo de hepatocito rodeado de RER dilatado, AZT 30 días..... | 194 |
| 4.96. | Desestructuración de crestas mitocondriales de hepatocito, AZT 30 días..... | 194 |
| 4.97. | Hepatocito que presenta mitochondrias con matriz de baja densidad electrónica, AZT 30 días..... | 194 |
| 4.98. | Dilatación de REL de hepatocito de animal que ha ingerido AZT 30 días..... | 194 |
| 4.99. | Microfotografía hepática de animal que ha ingerido AZT 60 días..... | 195 |
| 4.100. | Hepatocito que contiene en su citoplasma mitochondrias alteradas junto a otras normales..... | 195 |
| 4.101. | Necrosis biliar en hepatocito de animal que ha ingerido 60 días AZT..... | 195 |
| 4.102. | Hepatocito que contiene mitochondrias desestructuradas junto a otras semejantes a las controles..... | 195 |
| 4.103. | Hepatocitos con vacuolas que vierten su contenido al exterior, AZT 90 días..... | 196 |
| 4.104. | Detalle de vacuolas en hepatocitos, AZT 90 días..... | 196 |
| 4.105. | Núcleo hepático rodeado de vacuolas, AZT 90 días... | 196 |
| 4.106. | Vacuolas citoplásmicas en hepatocitos, AZT 90 días.. | 196 |
| 4.107. | Vacuolas y gotas lipídicas en hepatocitos..... | 196 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.108. | Hepatocito que contiene figura de aspecto mielínico en el citoplasma..... | 197 |
| 4.109. | Hepatocito binucleado en vacuola..... | 197 |
| 4.110. | Detalle de mitocondrias de un hepatocito de rata, AZT 120 días..... | 197 |
| 4.111. | Detalle de mitocondrias de un hepatocito de rata que ha ingerido AZT 120 días..... | 197 |
| 4.112. | Mitocondrias con inclusiones y otras con aspecto similar a las control..... | 197 |
| 4.113. | Panorámica de sección hepática 120 días con AZT en la que aparecen gotas lipídicas..... | 197 |
| 4.114. | Sinapsis de fibra musgosa, en cerebelo del grupo control..... | 198 |
| 4.115. | Citoplasma de célula de Purkinje y zonas sinápticas, en cerebelo del grupo control..... | 198 |
| 4.116. | Conjunto de células grano, en cerebelo de grupo control..... | 198 |
| 4.117. | Microfotografía de cerebelo con mitocondrias estructuradas, grupo control..... | 198 |
| 4.118. | Células grano y de Purkinje con mitocondrias desestructuradas, AZT 30 días..... | 199 |
| 4.119. | Célula grano con mitocondrias alteradas, AZT 30 días | 199 |
| 4.120. | Célula grano con edema intracitoplásmico y alteraciones mitocondriales..... | 199 |
| 4.121. | Fibras mielínicas con mitocondrias con escasas crestas..... | 199 |
| 4.122. | Células grano y de Purkinje de aspecto similar al control..... | 199 |
| 4.123. | Microfotografía de sección de cerebro, grupo control | 200 |
| 4.124. | Sección cerebral de animal que ha ingerido AZT 30 días..... | 200 |
| 4.125. | Mitocondrias alteradas con distintos aspectos, cerebro animal con AZT 60 días..... | 200 |
| 4.126. | Detalle de fibra mielínica de cerebro de animal con AZT 60 días, aspecto similar al control..... | 200 |
| 4.127. | Célula grano con alteraciones mitocondriales..... | 201 |
| 4.128. | Mitocondrias alteradas en cerebro de animal que ha ingerido AZT..... | 201 |
| 4.129. | Fibras nerviosas mielínicas que contienen mitocondrias alteradas y otras semejantes al control | 201 |
| 4.130. | Sección cerebral que contiene mitocondrias con alteraciones..... | 201 |
| 4.131. | Mitocondrias con alteraciones en cerebro de animales grupo AZT..... | 202 |
| 4.132. | Sección cerebral que contiene mitocondrias alteradas | 202 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.133. | Panorámica de cerebro con neuronas de la capa VI y prolongaciones neuronales con presencia de edema y mitocondrias alteradas..... | 202 |
| 4.134. | Fibras nerviosas mielínicas con aspecto similar al control, animales con AZT 90 días..... | 202 |
| 4.135. | Fibras mielínicas y mitocondrias cerebrales de animales con AZT 120 días..... | 202 |
| 4.136. | Esquema del túbulo contorneado proximal renal. (Tomado de Carrascal)..... | 203 |
| 4.137. | Esquema de túbulo contorneado distal renal. (Tomado de Carrascal)..... | 203 |
| 4.138. | Microfotografía de riñón de grupo control..... | 203 |
| 4.139. | Panorámica de células de túbulo contorneado de riñón de animal del grupo control..... | 203 |
| 4.140. | Células epiteliales de túbulo de riñón, 15 días con AZT..... | 204 |
| 4.141. | Detalle de mitocondrias desestructuradas, AZT 15 días | 204 |
| 4.142. | Mitocondrias con alteraciones en crestas y matrices, riñón de animal con AZT 15 días..... | 204 |
| 4.143. | Sección de riñón con desflecamiento de a membrana basal. Mitocondrias con aspecto com control | 204 |
| 4.144. | Células epiteliales del túbulo contorneado próximal de riñón. Mitocondrias con diferentes aspectos..... | 205 |
| 4.145. | Detalle de mitocondrias alteradas y edema intracitoplásmico de célula renal..... | 205 |
| 4.146. | Células de riñón con mitocondrias alteradas, AZT 30 días..... | 205 |
| 4.147. | Mitocondrias con matriz de baja densidad electrónica en el túbulo conorneado próximal, lote VI..... | 205 |
| 4.148. | Panorámica de riñón con zonas que poseen mitocondrias alteradas y otras normales..... | 206 |
| 4.149. | Células renales con diferentes aspectos mitocondriales..... | 206 |
| 4.150. | Mitocondrias bastoniformes con matriz de baja densidad electrónica..... | 206 |
| 4.151. | Túbulo contorneado renal con mitocondrias desestructuradas..... | 206 |
| 4.152. | Grupo de mitocondrias de riñón con crestas alteradas | 206 |
| 4.153. | Glomérulo renal con hipertrofia y multilobulación nuclear..... | 207 |
| 4.154. | Pedículos y membrana basal de riñón, AZT 60 días.... | 207 |
| 4.155. | Sección renal, AZT 90 días, con aspecto como grupo control..... | 207 |
| 4.156. | Células renales carentes de alteraciones, AZT 120 días..... | 207 |
| 4.157. | Sección cerebelosa con actividad enzimática málico-DH | 208 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.158. | Captación con análisis de imagen en fibras nerviosas de cerebelo con actividad málico DH..... | 208 |
| 4.159. | Segmentación blanco/negro de la imagen anterior, con análisis de imagen..... | 208 |
| 4.160. | Actividad málico DH en hígado de rata, AZT 30 días.. | 209 |
| 4.161. | Captación con análisis de imagen (con filtro) con actividad málico DH de la sección anterior..... | 209 |
| 4.162. | Imagen blanco/negro con análisis de imagen de la sección anterior..... | 209 |
| 4.163. | Segmentación interactiva con análisis de imagen de la porción hepática antes descrita..... | 209 |

El **AZT o zidovudina** es el primer fármaco recomendado internacionalmente, para la terapia frente al VIH. Hasta el momento ha sido demostrado que posee mayor eficacia con respecto a toda la gama de antirretrovirales ensayados en estos últimos años. El comienzo de su uso fue en 1986 y en la actualidad, a pesar de las controversias acerca de su eficacia y toxicidad, sigue siendo el aconsejado como primer tratamiento frente al VIH.

El AZT actúa a nivel de la transcriptasa inversa compitiendo con el trifosfato de timidina natural de las células e inhibiendo la replicación del virus.

En 1987 se describen los primeros casos de toxicidad en pacientes humanos VIH+ tratados con este medicamento, la cual consiste en alteraciones en la médula osea, polimiositis y mitocondriopatías. En 1991 aparecen los primeros trabajos que describen toxicidad en animales de experimentación.

En base a lo indicado, nos planteamos estudiar en un modelo experimental en ratas a las que se administró AZT en agua de bebida *ad libitum* (2 mg AZT/ml, 1 mg AZT/ml, 0 mg AZT/ml como control) para evaluar las posibles alteraciones tanto morfológicas (microscopía óptica y electrónica) como funcionales (con técnicas histoenzimáticas) en distintos órganos: corazón, hígado, sistema nervioso central (cerebro y cerebelo) y riñón. Se hicieron lotes de animales que se estudiaron a distintos tiempos de tratamiento: 15, 30, 60, 90 y 120 días. Para analizar la posible reversibilidad de las lesiones tras la supresión del AZT, se utilizaron animales que tras un periodo de tratamiento se mantuvieron un tiempo sin el medicamento (30 días con AZT + 15 días de agua y 60 días AZT + 15 de agua). Además, se planteó

un estudio colateral con otros animales (grupo de 2mg AZT/ml y control) para un análisis hematológico y bioquímico.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron un total de 74 animales. Se recogieron datos sobre la observación del estado general de los animales, su peso inicial y final, así como del consumo de agua diaria. Tras el periodo correspondiente en cada caso, se sacrificaron los animales procediendo a la realización de diferentes técnicas:

- * Microscopía óptica: con diferentes tinciones convencionales.

- * Microscopía electrónica de transmisión con la inclusión y procesamiento de los tejidos de cada una de las muestras.

- * Reacciones histoenzimáticas con secciones en congelación de los tejidos, para determinación de málico DH, succinato DH, isocitrato DH, NADH DH y NADPH DH.

- * Técnicas de análisis de imagen, aplicadas en músculo cardiaco, fibras nerviosas en cerebelo e hígado todas ellas con reacciones histoenzimáticas.

Todas estas pruebas se valoraron en la medida de lo posible con test estadísticos.

Los resultados de estos experimentos demuestran una clara asociación entre el AZT y las alteraciones mitocondriales, sea cual sea su localización, no observándose diferencias con las dosis utilizadas. Para que se produzcan estas lesiones se requiere un tiempo mínimo y una dosis acumulativa. La mayor intensidad de las alteraciones se observan tras 30 y 60 días de ingesta del fármaco

y disminuyen con el tiempo, sugiriendo la actuación de mecanismos compensatorios y/o adaptativos que hacen que se neutralicen estas alteraciones.

Tras la supresión del AZT las lesiones disminuyen, lo que demuestra que a las concentraciones utilizadas las alteraciones no son irreversibles.

INDICE

1. INTRODUCCION..... 1

1.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

 1.1.1. Historia..... 2

 1.1.2. Taxonomía de retrovirus..... 6

 1.1.3. Estructura del VIH..... 7

 1.1.4. Organización genómica del VIH..... 9

 1.1.5. Ciclo viral..... 11

 1.1.6. Patogenia..... 16

1.2. ZIDOVUDINA (AZT)

 1.2.1. Características..... 18

 1.2.2. Farmacología.

 1.2.2A. Mecanismo de acción..... 19

 1.2.2B. Farmacocinética y farmacodinamia..... 21

 Absorción y concentraciones plasmáticas..... 21

 Distribución..... 23

 Metabolismo y excrección..... 24

 Farmacocinética en niños..... 25

 1.2.3. Terapia con AZT..... 26

 1.2.4. Toxicidad del AZT..... 30

 1.2.4A. In vivo

 En el hombre..... 32

 En animales..... 35

 1.2.4B. In vitro..... 37

1.3. OTRAS TERAPIAS ANTIRRETROVIRICAS FRENTE AL VIH..... 37

1.4. PATOLOGIA MITOCONDRIAL..... 44

2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS..... 55

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Material

 3.1.1. Material biológico: Animales de experimentación. 58

 3.1.2. Material químico:

 3.1.2A. Zidovudina..... 58

 3.1.2B. Reactivos y preparación de medios..... 59

| | |
|---|----|
| 3.2. Métodos | |
| 3.2.1. Diseño experimental..... | 59 |
| * Animales..... | 59 |
| * Dosis de AZT..... | 64 |
| 3.2.2. Técnica de extracción de órganos..... | 65 |
| 3.2.2A. Anestesia..... | 65 |
| 3.2.2B. Perfusión y fijación..... | 65 |
| 3.2.3. Estudio macroscópico e histológico..... | 66 |
| 3.2.4. Reacciones histoenzimáticas..... | 67 |
| A. Fundamento..... | 67 |
| B. Metodología..... | 72 |
| 3.2.5. Microscopía electrónica..... | 74 |
| 3.2.6. Estudio analítico de sangre..... | 77 |
| 6.A. Análisis hematológico..... | 77 |
| 6.B. Análisis bioquímico..... | 78 |
| 3.2.7. Histofotometría..... | 81 |
| 3.2.8. Análisis de imagen..... | 83 |
| 3.2.8A. Perfil densitométrico en músculo cardíaco... | 84 |
| 3.2.8B. Estudio de área ocupada por fibras nerviosas en el cerebelo con reacciones histeenzimáticas | 85 |
| 3.2.8C. Estudio densitométrico en hígado marcado histoenzimáticamente..... | 87 |
| 3.2.9. Métodos estadísticos..... | 89 |
| 3.2.9A. Caracteres muestrales..... | 89 |
| 3.2.9B. Análisis estadístico de los datos..... | 89 |
| 3.2.10. Apéndice de material y preparación de reactivos | 91 |
| 3.2.10A. Equipo instrumental..... | 91 |
| 3.2.10B. Productos químicos..... | 93 |
| 3.2.10C. Preparación y composición de productos..... | 95 |

4. RESULTADOS

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 4.1. Animales de experimentación..... | 114 |
| 4.1.1. Observación directa..... | 114 |
| 4.1.2. Peso..... | 114 |
| 4.1.3. Consumo de bebida..... | 120 |
| 4.1.4. Dosis de AZT..... | 124 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. Estudio anatomopatológico..... | 125 |
| 4.2.1. Macroscópico..... | 125 |
| 4.2.2. Microscópico..... | 125 |
| 4.2.2A. Músculo cardíaco..... | 125 |
| 4.2.2B. Hígado..... | 127 |
| 4.2.2C. Sistema Nervioso Central..... | 129 |
| 4.2.2D. Riñón..... | 129 |
| 4.3. Estudio histoenzimológico..... | 129 |
| 4.3.1. Grupo animales tratados con AZT..... | 129 |
| 4.3.1A. Mállico-DH..... | 130 |
| 4.3.1B. Isocitrato-DH..... | 132 |
| 4.3.1C. Succinato-DH..... | 134 |
| 4.3.1D. NADH-DH..... | 137 |
| 4.3.1E. NADPH-DH..... | 137 |
| 4.4. Estudio fotométrico..... | 138 |
| 4.5. Microscopía electrónica..... | 142 |
| 4.5.1. Músculo cardíaco..... | 142 |
| 4.5.2. Hígado..... | 146 |
| 4.5.3. Sistema Nervioso Central..... | 150 |
| 4.5.4 . Riñón..... | 124 |
| 4.6. Análisis de imagen aplicado en secciones con reacciones histoenzimológicas..... | 157 |
| 4.6.1. Perfiles densitométricos del músculo cardíaco..... | 157 |
| 4.6.2. Estudio del área ocupada por fibras nerviosas en secciones cerebelosas..... | 158 |
| 4.6.3. Estudio densitométrico en secciones de hígado..... | 162 |
| 4.7. Estudio analítico de sangre..... | 163 |
| 4.8. Iconografía..... | 167 |
| | |
| 5. DISCUSION..... | 210 |
| | |
| 6. CONCLUSIONES..... | 243 |
| | |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 245 |

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La **Zidovudina** o AZT fue sintetizada en 1964 por Hortwitz como agente antineoplásico. Posteriormente en 1974 Ostertag y col probaron su actividad antiviral. En 1981 se describe el SIDA y en 1982 el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Desde ese momento se ensayan diferentes agentes terapéuticos para combatir la infección producida por este virus. En 1985 Mitsuya y col, experimentan por primera vez con AZT, en 1986 comienzan los primeros estudios clínicos en pacientes VIH+ con buenos resultados y un esperanzador futuro. Son innumerables los estudios que se han realizado con este fármaco por dos motivos: por ser el primer antirretroviral que resultó con cierta eficacia en el tratamiento de personas infectadas por el VIH, y por otro lado por ser aún en la actualidad, a pesar de las recientes controversias, el tratamiento recomendado internacionalmente tras conocerse la existencia de una primoinfección por este virus. Tan solo cuando aparece una intolerancia se administra otro fármaco.

Con el fin de poder entender mejor el significado de este agente terapéutico y su importancia en el tratamiento de la infección por el VIH incluiremos, a continuación, una breve revisión sobre los caracteres más sobresalientes de los retrovirus y del VIH en particular. Posteriormente, nos centraremos en el análisis de las características de la zidovudina, tanto a nivel farmacológico, como del tratamiento con este medicamento y su toxicidad. Revisaremos también pero de forma resumida el resto de antirretrovirales utilizados frente al VIH. Por último dedicaremos un apartado de esta introducción a la mitocondria, focalizandolo en los aspectos funcionales y patológicos relacionados con el tema objeto de la presente memoria.

1.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV).

1.1.1. HISTORIA:

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), pertenece al grupo de los retrovirus. Su nombre deriva de latín *retro* que significa al revés, por su propiedad de poseer una enzima, la transcriptasa inversa, capaz de copiar su ARN a ADN. Antes de 1970 Temin ya emitió la hipótesis de que los virus ARN tumorales se replicaban a través de un provirus ADN intermediario. El descubrimiento de la transcriptasa inversa por Temin y Mizutani (1970) e independientemente por Baltimore (1970), cambió el dogma central de la biología.

El fenómeno de la transcripción inversa está presente en diferentes grupos de virus, así como en elementos genéticos móviles como los retrotransposones (levaduras, insectos y plantas), siendo filogenéticamente anterior a la separación de organismos procariontes y eucariontes (Najera, 1992).

En 1988, Dahlberg hace una clasificación de retrovirus por especies animales hospedadores, la cual ligeramente modificada, se muestra en el cuadro 1.1.

En 1980, Poiesz y col. aislaron el primer retrovirus humano en la leucemia de célula T de adulto (denominado HTLV-I). En 1983, Barré-Sinoussi y col, del grupo de Montagnier, aislaron el virus asociado a la linfadenopatía (LAV). Gallo y col, en 1983 describen un retrovirus y en 1984 Popovic y col, del grupo de Gallo, el virus humano linfotrópico III (HTLV-III), conocidos ambos como Virus de la

Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En 1986, Clavel y col aislaron el VIH-II. En ese año se reunió el Comité Internacional de nomenclatura de Virus y adoptó el nombre genérico de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), conociéndose actualmente el VIH-1 y el VIH-2. En el cuadro 1.2 se recoge la cronología fundamental en el conocimiento de los retrovirus.

Aunque se comienza a conocer la enfermedad en la década de los ochenta, estudios retrospectivos (en serotecas) han permitido detectar un suero positivo que data de 1959 y que es de procedencia africana (Karpas, 1990).

Cuadro 1.1. Distribución de los retrovirus conocidos.

| ESPECIE HUESPED | | CLASIFICACION DEL VIRUS AISLADO | | | | |
|------------------|----------------|---------------------------------|------------|-----------|---|---|
| Clase taxonómica | Nombre común | Spumavirus | Lentivirus | Oncovirus | | |
| | | | | B | C | D |
| | Levadura | | | | + | |
| CESTODOS | Tenia | | | | + | |
| INSECTOS | Mosca de fruta | | | | + | |
| OSTEICTIOS | Lucio | | | | + | |
| REPTILES | Serpientes | | | | | + |
| AVES | Pollo | | | | + | |
| | Faisán | | | | + | |
| | Pavo | | | | + | |
| | Pato | | | | + | |
| MAMIFEROS | Marsupiales | | | | + | |
| | Roedores | | | | | |
| | - Ratón | | | + | + | + |
| | - Rata | | | | + | |
| | - Hamster | | | | + | |
| | - Cobayo | | | + | + | |
| | - Aguti | | | | + | |
| | Lagomorfos | | | | | |
| | - Conejo | | | | + | |
| | Carnivoros | | | | | |
| | - Gato | + | | + | + | |
| | - Visón | | | | + | |
| | Artiodactilos | | | | | |
| | - Ciervo | | | | + | |
| | - Vaca | + | | + | + | |
| | - Cerdo | | | | + | |
| | - Cabra | | | + | | |
| | - Oveja | | | + | | + |
| Perisodactilos | | | | | | |
| - Caballo | | | + | | | |
| Primates | | | | | | |
| - Prosimios | + | | | | + | |
| - Monos | + | | + | + | + | |
| - Humanos | + | | + | + | | |

Cuadro 1.2. Cronología fundamental en el conocimiento de los retrovirus.

* Las siglas corresponden a la denominación inglesa.

| FECHA Y AUTOR | ENFERMEDAD | RETROVIRUS |
|------------------------|--------------------------------|--|
| 1904 Valle y Carre | Anemia infecciosa equina | EIA (anemia infecciosa equina) |
| 1908 Ellermann y Bang | Leucemia de pollo | ALV (Virus de la Leucemia Aviar) |
| 1911 P. Rous | Sarcoma de pollos | RSV (Virus del Sarcoma de Rous) |
| 1936 J. Bittner | Cáncer de mama murino | MMTV (Virus del Tumor Mamario del Ratón) |
| 1951 L. Gross | Leucemia del ratón | MLV (Virus de Leucemia de Ratón) |
| 1964 B. Jarret | Leucemia del gato | FeLV (Virus de la leucemia felino) |
| 1970 H. Temin | | RT (tanscriptasa inversa) |
| 1970 D. Baltimore | | RT |
| 1977 K. Takatsuzi | Leucemia T endémica del adulto | ATLL (Virus de Leucemia y Linfoma de células T de adulto) |
| 1980 B.J. Poisez | Leucemia T adulto | HTLV-I (Virus I de la Leucemia Humana de células T) |
| 1981 M.S. Gottlieb | Descripción clínica del SIDA | |
| 1982 V. Kalayanaraman | Leucemia de células peludas. | HTLV-II (Virus II de la Leucemia Humana de células T) |
| 1983 F. Barré-Sinoussi | Linfoadenopatía | LAV (Virus asociado a linfoadenopatía) |
| 1984 R. Gallo | SIDA | HTLV-III (Virus III Linfotrópico Humano T) |
| 1985 D. Daniel | SIDA de los simios | SIV _{MAC} (Virus de la Inmunodeficiencia de los simios) |
| 1986 F. Clavel | SIDA, VIH negativo | VIH-2 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo II) |
| 1990 M Lemaitre | SIDA | Interacción de micoplasmas con VIH |

1.1.2. TAXONOMIA DE LOS RETROVIRUS:

Los retrovirus han sido clasificados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus en la familia *Retroviridae* (Coffin, 1991 y 1993). Esta familia contiene siete géneros (Cuadro 1.3). El VIH pertenece al género *Lentivirus*, el cual ha sido recientemente clasificado en cinco subgéneros y especies (Coffin 1993). Cuadro 1.4.

Cuadro 1.3. Géneros de la familia *Retroviridae*.

| GENERO | NOMBRE INTERNACIONAL | ESPECIE TIPO |
|--|-----------------------------|---|
| <i>Grupo de oncovirus tipo B de mamíferos</i> | ----- | <i>Virus del tumor mamario del ratón</i> |
| <i>Grupo de retrovirus tipo C de mamíferos</i> | ----- | <i>Virus de la leucemia murina</i> |
| <i>Grupo de retrovirus tipo D</i> | ----- | <i>Virus de mono "Mason Pfizer"</i> |
| <i>Grupo de retrovirus tipo C aviales</i> | ----- | <i>Virus de la leucosis aviar</i> |
| <i>Grupo de virus espumoso</i> | <i>Spumavirus</i> | <i>Virus espumosos humanos</i> |
| <i>Grupo HTLV-BLV</i> | ----- | <i>Virus tipo 1 de células linfotrópicas humanas tipo T</i> |
| <i>Grupo de lentivirus</i> | <i>Lentivirus</i> | <i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana</i> |

Cuadro 1.4. Subgéneros y especies de *Lentivirus*.

| SUBGENEROS | ESPECIES |
|--|---|
| <i>Virus de la Inmunodeficiencia de primates</i> | - <i>Virus de la inmunodeficiencia Humana tipo 1</i> - <i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2.</i> - <i>Virus de la Inmunodeficiencia de los simios</i> |
| <i>Lentivirus Ovino/caprino</i> | - <i>Virus "Maedmi"/ Visna</i> - <i>Virus de la encefalitis/artritis caprina</i> |
| <i>Lentivirus equinos</i> | - <i>Virus de la anemia infecciosa equina</i> |
| <i>Lentivirus felinos</i> | - <i>Virus de la inmunodeficiencia felina</i> |
| <i>Lentivirus bovinos</i> | - <i>Virus de la inmunodeficiencia bovina</i> |

1.1.3. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA

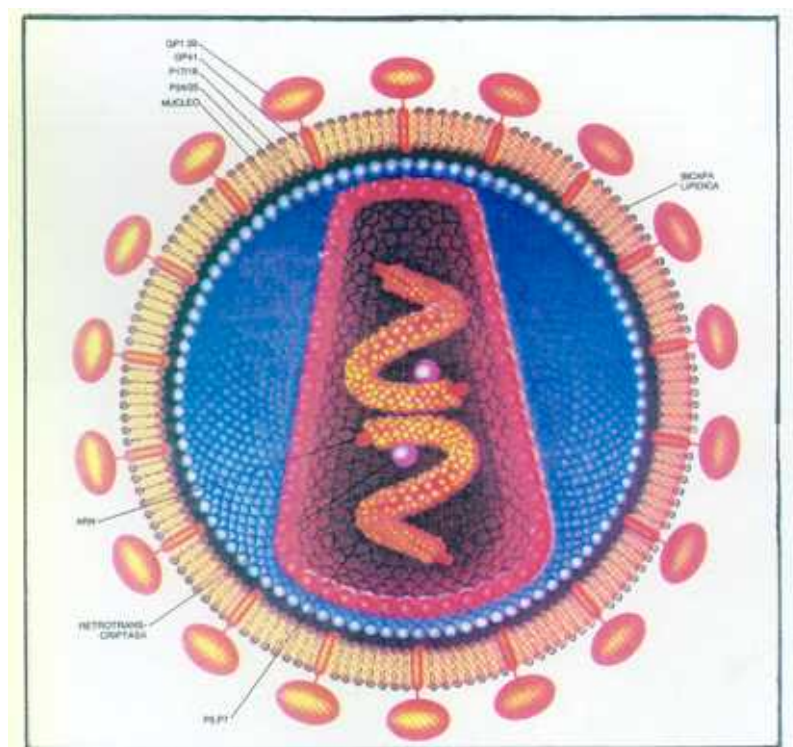
HUMANA:

La partícula o virión tiene una forma esférica de 80 a 130 nm de diámetro. Consta, en la parte central, de un *nucleoide* con forma de cono truncado (formado por la proteína p24 o p25) en cuyo interior está contenido el genoma de ARN, la ribonucleasa, integrasa, proteasa y las proteínas p6 y p7 así como la transcriptasa inversa (es una ADN polimerasa ARN dependiente, que posee dos subunidades p51 y p66, cuya cinética y estructura está descrita en su totalidad) (Anderson y col, 1991; Kohlstaedt y col, 1992). El ARN es de una cadena con dos copias idénticas y con polaridad positiva. El nucleoide está rodeado de una cápside icosaédrica formada por las proteínas p17 y p18.

La envoltura del virión posee una bicapa lipídica, donde se insertan las glicoproteínas virales (de 10 nm de longitud), en un total de 72, que contienen la gp120 (que consta de cuatro moléculas) anclada en la gp41 (inmersa en la membrana) y antígenos de histocompatibilidad de clase I y II derivados de la célula huésped (Fig 1.1).

El 60 % del virus está formado por proteínas. El 35 % son lípidos derivados de la membrana plasmática de la célula a la que infecta. El 3,5 % son carbohidratos (están presentes en la membrana) y el 1% es ARN (Aguilar y Uriel, 1990).

Figura 1.1. Estructura del virión.



1.1.4. ORGANIZACION GENOMICA DEL VIH.

El estudio de los mecanismos reguladores se ha realizado, parcialmente, observando el desarrollo de cepas del VIH en las que por mutación se había inactivado algún elemento regulador. Se conoce la función desempeñada por los distintos elementos reguladores, los cuales han sido analizados aisladamente: transfiriéndolos por separado del VIH al material genético de diversas líneas celulares obtenidas en los laboratorios. Cada gen regulador determina una proteína que interactúa específicamente con un elemento "receptor".

El genoma es un ARN de cadena única, constituido por dos hebras de polaridad positiva. Tiene una longitud de 10 Kb , comprende secuencias repetitivas a ambos extremos del genoma (repeticiones terminales largas, RTL) (Myers y col, 1989; Cohen y col, 1989).

El genoma está formado por tres genes básicos enzimáticos y estructurales: "gag", "pol" y "env" y otros genes reguladores.

- Genes básicos:

- **GAG** localizado en el extremo 5' del genoma y codifica para la proteína p55. Esta proteína miristilada se transforma dando lugar a la p41 y esta se procesa dando lugar: a la p17 y a la proteína p24 (de la cápside).

- **POL** que codifica para la transcriptasa inversa RT, con p66 y p55, p64 y p51, integrasa (IN) p34, y proteasa (PR) p10, y ribonucleasa (RN), p13.

- **ENV** situado en el extremo 3' del genoma codifica para la gp120, gp41, y gp125 (del VIH-1) y gp36 (del VIH-2).

El orden de estos genes es invariable 5' gag, pol, env 3'.

-Genes reguladores:

Algunos de los genes reguladores se solapan con genes básicos, utilizan la misma región del ADN, pero son leídos de forma distinta por la célula diana.

- **tat** codifica para la p14. Este gen tiene un papel central en la activación y ciclo viral del VIH (Kashanchi y col, 1994).

- **rev** codifica para la p19 actuando como regulador de la expresión de las proteínas virales.

- **nef** es un gen que codifica para la proteína p27. Actúa sobre las membranas de células neuronales (Werner y col, 1991).

- **vif** codifica para la proteína p23. Está asociada a la capacidad infecciosa del virión, promoviendo la misma en los virus libres.

- **rap o vpr** codifica para la proteína p15. Acelera el ciclo replicativo, aumentando la tasa de producción de proteínas.

- **vpt o ten** procede de fragmentos de tres genes diferentes. Codifica para la p17.

- **out o vpu** codifica para la proteína p16. Está presente en el VIH-1 y aumenta la liberación de viriones de la célula infectada, reduciendo la acumulación de proteínas vírales.

- **vpx**, codifica para la p16 del VIH-2.

El ARN dentro de la célula se convierte en dos hebras de ADN vírico integradas en los cromosomas de la célula, esto constituye el "provirus". Los genes del provirus, para que sean eficaces, se copian a ARN por medio de una

transcripción directa y así son leídos por la célula que los ha integrado. Esta etapa es llevada a cabo por enzimas celulares como la ARN polimerasa II.

1.1.5. CICLO VIRAL:

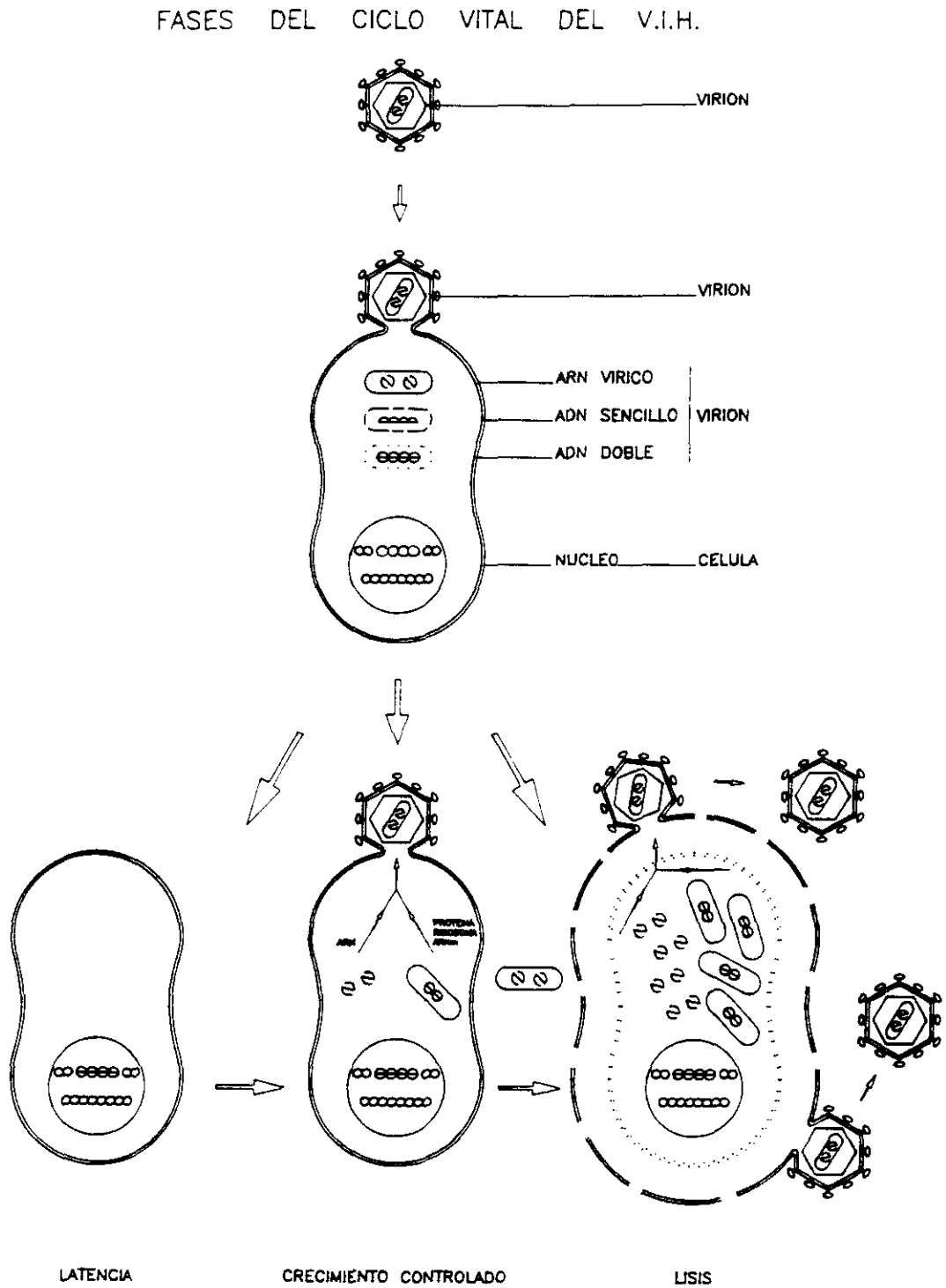
Se pueden distinguir varias etapas (Greene, 1991):

- 1) Adsorción, fusión e internalización del virus.
- 2) Transcripción inversa e integración.
- 3) Latencia.
- 4) Expresión temprana de genes reguladores y expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos.
- 5) Morfogénesis y salida del virión.

La secuencia evolutiva comienza con la penetración del virus VIH en la célula a través de los receptores CD4 y CD26 de los linfocitos T que presentan estos marcadores y que son en su mayoría, por la función que desempeñan, los T facilitadores; pero también en cualquier célula que exprese estos receptores. La penetración puede hacerse, además, por los receptores Fc de las inmunoglobulinas o a través de los receptores del complemento. Una vez producida la fusión del virus a la célula entra el ARN viral que se copia a ADN por la transcriptasa inversa, se circulariza en el citoplasma celular, pasa al núcleo y se integra de forma lineal en el ADN celular. En ese momento se denomina provirus y puede producir estado de latencia o de crecimiento. Este último puede ser lento y controlado o puede ser rápido, dando en este caso como resultado final la destrucción por lisis de la célula. Cuando hay un crecimiento rápido, con una gran producción de partículas víricas que se diseminan por el organismo, tiene lugar el desarrollo de la enfermedad por

la destrucción de gran cantidad de células.

Figura 1.2. Ciclo infectivo del VIH.



1) Fase de adsorción, fusión e internalización:

La Fase de interacción se lleva a cabo tras la unión del virión, a través de la gp120, con los receptores CD4 y CD26 de la célula diana (Mayer y col, 1991).

El CD4 es una glicoproteína de 59 kDa que está presente en la membrana de los linfocitos T pero también de monocitos, macrófagos de distintas localizaciones y células relacionadas como las de Langerhans y microglia, y en la de otras células estromáticas como las dendríticas y epiteliales, y en células del tejido conectivo como astrocitos y fibroblastos (Najera, 1990). Así como en células endoteliales (Cheng-Mayer y col, 1990). El CD26 es una glicoproteína de 120 kDa que está presente en células T y B, en macrófagos, en células de los canalículos biliares y en líneas celulares de sinusoides esplénicos (Proceedings of the four international workshop in human leucocyte, 1990).

El linfocito T CD4 se activa tras el reconocimiento del antígeno presentado por células presentadoras en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Como moléculas accesorias que ayudan en el reconocimiento están las CD2 y CD28 que contribuyen en la unión de las dos células, el linfocito CD4 y la célula presentadora, y en la amplificación y producción de la señal de activación linfoide (Najera, 1990).

La región responsable de la fusión se encuentra en la gp41, que interacciona con la zona de la membrana celular próxima al CD4 y al CD26. Después del contacto se produce la unión por yuxtaposición de las dos membranas debido a la gran afinidad que se establece entre ellas (Bolognesi y col, 1989). Tras el contacto se promueve un cambio conformacional, permitiendo al extremo hidrofóbico amino

terminal de la gp41 insertarse en la membrana celular, iniciando la fusión y promocionando la internalización del virión.

2) Transcripción inversa e integración:

Tras la entrada se inicia la replicación inversa mediada por la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT) contenida en el virión. Esta enzima cataliza el proceso por el que el ARN vírico pasa a provirus. Primero se forma un híbrido ARN-ADN por la actividad polimerasa de la transcriptasa inversa. Posteriormente, se elimina la hélice de ARN por la actividad ribonucleasa H (RNasa H), requiriéndose un tARN-Lys para la polimerización. La síntesis de la segunda cadena de ADN precisa también de la acción de la ribonucleasa H que degrada parcialmente el molde de ARN original. Así se genera el ADN de doble cadena que se integra en el ADN celular mediante la enzima integrasa viral. No obstante, gran cantidad de ADN viral sin integrar suele persistir en la célula.

La transcriptasa inversa es una enzima dimérica (Anderson y Coleman, 1992) que presenta actividad cuando está como heterodímero con una subunidad de 66 kDa (p66) y otra de 51 kDa (p51). La p66 posee actividad polimerasa (polimeriza la cadena de ADN a partir del ARN vírico) y ribonucleasa H (elimina la hebra de ARN híbrido que se forma), y la p51 tiene actividad ribonucleasa H (Jacob-Molina y Arnold, 1991; Stephen y col, 1992).

Robinson y Zinkus (1990) han descrito que la acumulación de ADN viral sin integrar en la célula sería el resultado de la penetración de múltiples viriones, distinguiéndose cuatro formas de ADN: un ADN de alto peso molecular integrado, un duplex lineal de 9,6 kb, un ADN circular covalentemente cerrado de 5 kb y una

serie de secuencias virales incompletas de distinto tamaño que pueden representar transcritos nacientes o productos de degradación de ADN.

En monocitos y macrófagos, en contraposición a lo que ocurre en linfocitos T, se produce montaje intracelular de viriones madurando en vacuolas citoplásmicas y de ahí que estas células tengan la potencialidad de retrotranscribir ARN de nueva síntesis (Fernández-Cruz, 1992).

El tipo de cepa infectante "alta-rápida" o "lenta-baja", no inductora de sincitios o inductora, que varía según el momento de la infección, va a condicionar el tiempo de instauración de la resistencia a la super infección y, derivado de ello, la cantidad y tipo de ADN que se va a apreciar en la célula infectada en distintos momentos (Goudsmit , 1991).

3) Latencia:

Se produce tras la infección e integración del provirus. Aproximadamente el 1% de los linfocitos CD4+ están infectados y un 0,1 % expresan ARN viral. La activación celular a partir del estímulo por antígenos, citoquinas o mitógenos estimula al provirus latente a través de la producción de factores de transcripción del huésped. La presencia del provirus o de formas incompletas de transcripción no producen enfermedad ni alteraciones patológicas. Por consiguiente, si se pudiera controlar su activación, se podría frenar el efecto patológico del virus (Najera, 1992).

4) Expresión génica temprana y tardía:

La expresión génica temprana implica a los genes reguladores "tat" y "vpr",

y la tardía a los genes estructurales y enzimáticos "gag", "pol" y "env", así como al gen regulador "rev" que actúa postranscripcionalmente facilitando el transporte de los ARNm al citoplasma (Greene, 1991).

5) Morfogénesis y salida del virión:

El montaje se realiza en varias fases, en primer lugar la ribonucleoproteína se agrega en el citoplasma formando el nucleoide con ARN y las proteínas de "gag" y "pol". Seguidamente, se desplazan a la membrana celular donde se recubren de la membrana lipídica y las glicoproteínas de superficie adheridas a la misma. En el momento de la salida se produce una miristilación de la proteína "p17". Para completar el ciclo, también requiere en esta fase final la célula diana ya que el proceso que se produce es una gemación, en la que se utilizan componentes celulares que formaran parte de la envuelta vírica (Gelderblom, 1991).

1.1.6. PATOGENIA:

En la patogenia influyen una serie de factores que se comentan a continuación brevemente:

1)- La variabilidad genética:

Es elevada, del orden de 10^{-3} a 10^{-4} cambios por sitio y año, siendo de esta forma 1000 veces mas rápida que en el caso de los genes celulares. La variabilidad se presenta a lo largo de todo el genoma, pero fundamentalmente en la porción del gen de la envoltura que codifica la glicoproteína de superficie gp120, y dentro de ella en las denominadas regiones hipervariables V1 a V5, las cuales están intercaladas entre cinco zonas constantes, C1 a C5. La variabilidad genética se

debe no solamente a mutaciones puntuales sino a inserciones, deleciones, duplicaciones, e incluso recombinaciones (Howell y col, 1991). Hoy se sabe que la transcriptasa inversa juega un papel fundamental en la variabilidad. La replicación de los retrovirus requiere de dos transferencias de cadena para sintetizar el provirus completo (Temin, 1993). En esto estriba la dificultad de obtener vacunas eficaces y tratamientos definitivos.

II)- El tropismo:

Esta característica, que permite clasificar las cepas de virus, reside en la capacidad de las mismas para infectar *in vitro* las células susceptibles. Esta propiedad muestra la variabilidad de estos virus, tanto por las características observadas *in vitro*, como por su capacidad *in vivo* para afectar a distintos tejidos. En la actualidad se han utilizado fetos de animales infectados con VIS (Virus de la inmunodeficiencia de los simios) para estudiar la inmunopatogénesis (Fazely, y col, 1993).

El tropismo viene determinado por la afección entre la célula hospedadora y el virus. En este tropismo interviene, por tanto, la capacidad de unión al receptor y la penetración del virus a la célula. Así, recientemente, se ha demostrado que el cambio de un único aminoácido en la molécula gp120 de la envoltura afecta a la capacidad de unión al receptor CD4, haciendo no infeccioso al virus (Cordonnier y col, 1989; Montagnier y col, 1992).

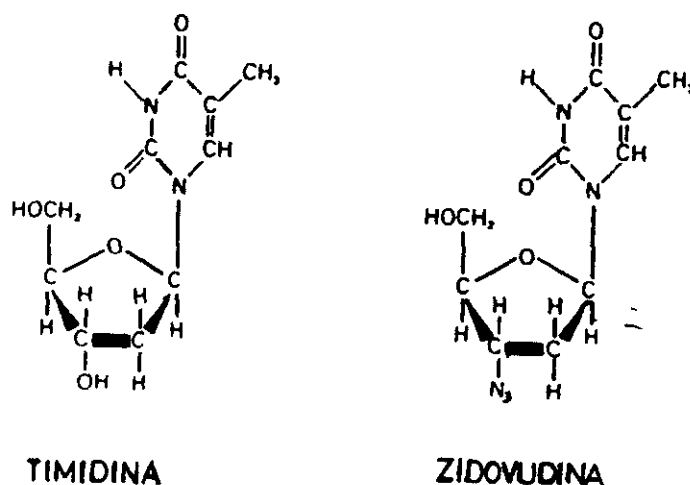
1.2. ZIDOVUDINA O AZT

1.2.1. CARACTERISTICAS DEL AZT.

Zidovudina nombre genérico internacional del AZT (3'-azido-3'-didesoxitimidina) es un antivirásico, estructuralmente análogo a la timidina celular, que bloquea la transcriptasa inversa del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), impidiendo la formación de ADN viral y por tanto la replicación del virus.

Su origen es sintético (Hortwitz y col, 1964) y su fórmula es análoga a la de la timidina (fig 1.3) en la que el grupo hidróxilo en posición 3' está sustituido por un grupo azido (-N₃). Su fórmula empírica es C₁₀H₁₃N₅O₄, con un peso molecular de 267,24.

Figura 1.3. Estructura química de la zidovudina (AZT) y timidina.



1.2.2. FARMACOLOGIA

1.2.2A. Mecanismo de acción:

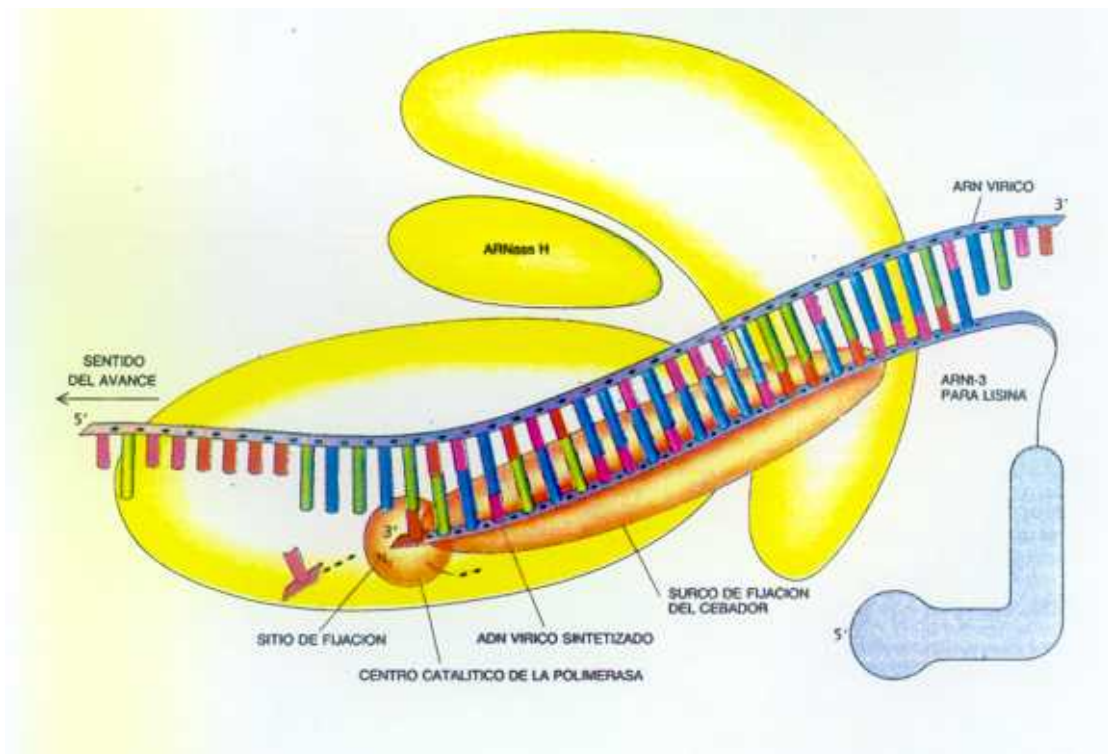
El mecanismo de acción del AZT consiste en interrumpir la síntesis del ADN viral, por sustitución del verdadero nucleótido (timidina), al incorporarse a la cadena de ADN del virus en crecimiento (Fig 1.4).

El AZT para ejercer esta acción antirretroviral necesita ser sucesivamente fosforilada en el citoplasma de la célula hasta convertirse en la forma activa de 2' 3' didesoxinucleósido 5' trifosfato. Así, tras la entrada en la célula incorpora un grupo fosfato en la posición 5' de la desoxiribosa, reacción catalizada por la timidina quinasa dando lugar al monofosfato de zidovudina. Este monofosfato se convierte seguidamente en difosfato por la timidilato quinasa y finalmente por acción de otras enzimas como la nucleósido difosfato quinasa se convierte en la forma trifosfato. El trifosfato de zidovudina compite, como substrato, con el nucleósido natural (timidina trifosfato) para incorporarse en las cadenas de ADN vírico que se están formando por acción de la transcriptasa inversa del retrovirus (ADN polimerasa dependiente de ARN). El trifosfato de zidovudina, una vez incorporado, interrumpe prematuramente el crecimiento de la cadena de ADN ya que el grupo 3' azido impide nuevas uniones fosfodiéster 5'-3'. La enzima no puede agregar el siguiente eslabón, porque el trifosfato de AZT carece del grupo hidroxilo (OH) que se necesita para forjar el enlace químico de la doble hélice de ADN, en consecuencia se detiene la síntesis del ADN vírico. La zidovudina además de provocar el final de la transcripción inversa, causa cambios en las cinéticas de la reacción de polimerización.

Otro mecanismo de acción de la zidovudina es la competencia de la misma con el sustrato natural de la retrotranscriptasa (RT) (dTTP).

Un tercer mecanismo, que se efectúa a muy alta concentración (5mM) de azidotimidilato, es la inhibición de la actividad ribonucleasa de la RT del VIH-1.

Figura 1.4. Mecanismo de acción del AZT.



El AZT activa también la síntesis de ADN celular aunque tiene unas cien veces menor afinidad por las polimerasas humanas que por la transcriptasa inversa del VIH, por lo que permite la inhibición selectiva de la replicación vírica sin bloquear la replicación celular. La acción del AZT se realiza principalmente en los linfocitos T y en mucho menos grado a nivel de los monocitos y macrófagos debido a los bajos niveles de timidina quinasa que tienen estas células (Broder y col, 1990).

1.2.2B. Farmacocinética y farmacodinamia:

La farmacocinética del AZT ha sido estudiada en pacientes infectados por el VIH, tanto niños como adultos, así como en modelos animales (Langtry y Campoli, 1989; López-Anaya, 1990a y 1990b).

Los estudios sobre la distribución de la zidovudina en el hombre son escasos. Podemos destacar el de Watts y col (1991) realizado en pacientes con disfunciones hepáticas y renales, mujeres gestantes o mujeres en periodo de lactancia. Los datos sobre el metabolismo y la eliminación de este compuesto también son incompletos. Seguidamente se indicaran aquellas que se conocen en el momento actual.

Absorción y concentraciones plasmáticas:

El medicamento tiene dos vías de administración una es la oral y otra la intravenosa.

A) Administración intravenosa.-

En estudios de pacientes con SIDA a los que administraron una dosis única de 2,5 mg/Kg a lo largo de una hora se comprobó que la concentración máxima plasmática era 4 a 6 pmol/L (Langtry y Campoli, 1989). Con la administración

secuencial intravenosa con dosis de 1, de 2,5 y de 5 mg/kg, a lo largo de una hora se producen concentraciones máximas plasmáticas de 1,5 a 2,5; de 4 a 6; y de 6 a 10 pmol/L respectivamente (Langtry y Campoli, 1989). Así, parece establecido que la concentración plasmática varía en proporción lineal con respecto a la dosis (Klecker y col, 1987).

B) Administración oral.-

Aproximadamente el 60% de las dosis de zidovudina es efectiva después de una administración oral, con una oscilación del 42 al 81% (Klecker y col, 1987; Gallicano y col, 1993).

La concentración máxima sérica se produce después de 0,5 a 1,5 horas con dosis de 2, de 5 y de 10 mg/kg (Surbone y col, 1988) produciéndose máximos plasmáticos de 1,5 a 2; de 4 a 6 y de 6 a 10 pmol/L respectivamente, en pacientes infectados con el VIH (Klecker y col, 1987). Con dosis por vía oral de 100, 200 y 250 mg se obtienen máximos de concentración plasmática de $1,27 \pm 0,67$, de $2,35 \pm 1,75$ y $3,44 \pm 1,80 \mu\text{mol/L}$ respectivamente, y concentraciones estables a las 4 horas después de la administración de $0,26 \pm 0,15$, de $0,60 \pm 0,34$ y de $1,00 \pm 0,90$ pmol/L respectivamente (Mc Closkey y col 1988). La variación en estos resultados puede ser debida bien a una falta de control en la dosis, a las diferencias individuales en el peso, o bien a la diferencias personales en la eliminación y absorción de la zidovudina (Unadkat y col, 1990).

Distribución:

Un estudio de la distribución de zidovudina en ratas, utilizando AZT marcado con tritio, mostró concentraciones del fármaco en más de 16 tejidos. En ellos aparecía en cantidades similares o más altas que en el plasma (Ahmed y col, 1991).

En ratones se detectó AZT en la placenta y en la leche materna (Sharpe y col, 1987), y en personas incluso en semen de pacientes infectados por VIH con una relación semen/suero de 1,3 a 20,4 tras la administración oral de 200 mg cada 4 horas (Henry y col, 1988).

El AZT se une aproximadamente en un 20% a proteínas plasmáticas en el macaco Rhesus (Collins y col, 1988), en el perro esta unión es del 15% (Krasny y Good, 1986). En el hombre la unión a proteínas varía aproximadamente de 34 a 38% en administración intravenosa.

La concentración en LCR, en relación con la vía de administración, y el tiempo transcurrido después de la administración varía en un rango del 50 al 60% de la concentración plasmática, cuatro horas después de administrar la dosis (Información de medicamentos, Ministerio de Sanidad, 1992). La vía oral y la intravenosa no difieren de forma notable en el trasvase de zidovudina a LCR (Langtry y Campoli, 1989).

La concentración máxima de AZT en LCR se obtiene a las dos horas aproximadamente después de la administración intravenosa durante una hora, y esta concentración es mucho más baja que la obtenida en el mismo tiempo, en plasma. Sin embargo, a pesar del alto grado de variabilidad dependiente de la dosis, el AZT puede adquirir concentraciones adecuadas en el cerebro para ser efectivo contra el VIH en el sistema nervioso central. Se han desarrollado diferentes sistemas para

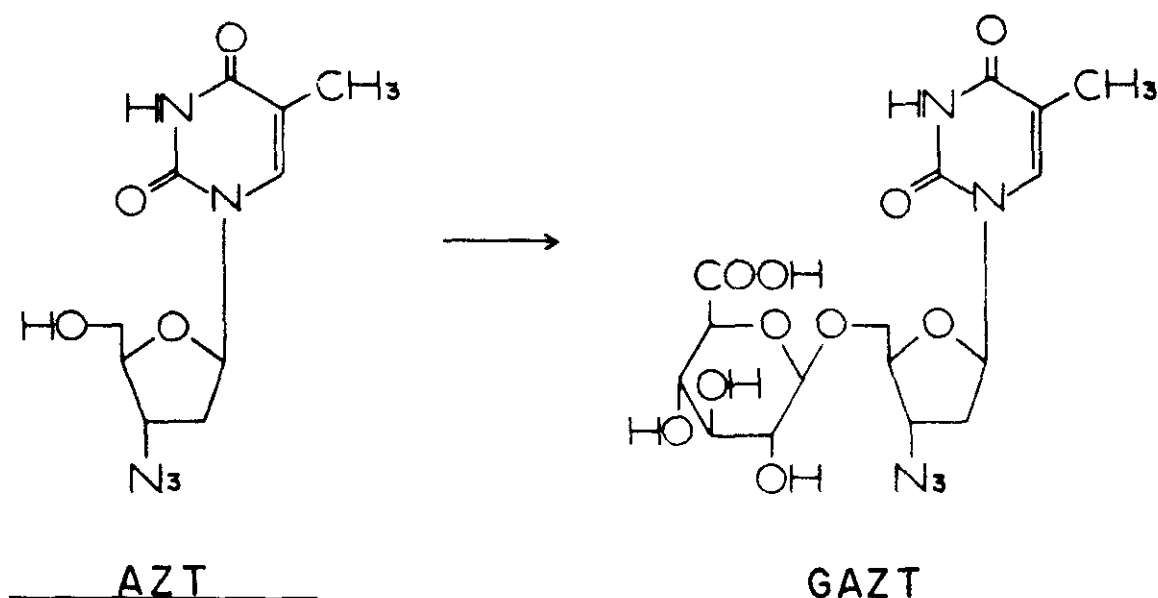
aumentar la concentración de AZT en cerebro, como es la incorporación a la molécula de zidovudina de un par redox dihidro-piridina-piridino (Little y col, 1987).

Metabolismo y excreción.-

El metabolismo de la zidovudina fué estudiado por primera vez en monos (Good y col, 1986) donde se producía como metabolito principal el 3-azido-3' deoxy-5'-BD-glucopiranosil timidina (GAZT) detectable en orina.

Estudios posteriores en el hombre han demostrado que el AZT, al igual que en monos, se metaboliza rápidamente mediante una glucorinación hepática, dando el principal metabolito inactivo que es el GAZT (Blum y col, 1988; Mayx y col, 1991).

Figura 1.5. Biotransformación de AZT a GAZT.



Good y col (1986) reprodujeron *in vitro* la incubación de zidovudina y ácido UDP glucurónico y microsomas hepáticos humanos deduciendo que la enzima catalizadora de la reacción es la UDP glucurónico transferasa.

Cretton y col (1991) han descubierto otros catabolitos de la zidovudina con un alto poder tóxico para las células de médula ósea. Estos catabolitos son el 3' deoxitimidina (AMT) y 3' amino 3 deoxitimidina glucurónico (GAMT). Posteriormente han sido estudiados también por Kawczynski y col (1993).

La vida media aproximada de la zidovudina por vía oral es de una hora, con un intervalo de 0,8 a 1,9 horas, mientras que por vía intravenosa el intervalo se extiende de 0,5 a 2,9 horas. La zidovudina se elimina, aproximadamente en un 14%, rápidamente en orina por filtración glomerular y secreción tubular activa. El 74% del metabolito principal (GAZT) se excreta por orina. El aclaramiento plasmático en pacientes con VIH es de 1,3 L/kg/hora con un aclaramiento renal medio de 0,23 L/kg/hora (Klecker y col, 1987).

Con respecto a la diálisis del AZT no se sabe si se elimina de la sangre por diálisis parenteral o hemodiálisis.

Farmacocinética en niños .-

Se han realizado pocos estudios farmacocinéticos de zidovudina en niños que han desarrollado SIDA. Pizzo y col (1988) administrando por vía intravenosa de forma continua una dosis de AZT (6 horas) a niños con una edad comprendida entre 14 meses a 12 años y basándose en la superficie corporal (80 mg/m^2), encontraron similitudes con la farmacocinética que este compuesto tenía en adultos. Tales

hechos fueron registrados en el informe del "Grupo de estudios pediátricos de Zidovudina" (1988). En este informe se señala que después de una dosis de 80 a 120 mg/m² de zidovudina durante una hora, vía intravenosa, en pacientes VIH de 5 meses a 3 años de edad con infección sintomática, el rango de vida media del AZT va desde 0,58 a 2,5 horas. Concluyen que en niños menores de 4 años se observa un incremento del aclaramiento de zidovudina (81% de la dosis del AZT se encontró en la orina, tanto como fármaco inalterado o como su metabolito). De forma similar se hicieron estudios en niños administrando AZT vía oral (dosis de 80 a 120 mg/m²) produciéndose concentraciones plasmáticas máximas de 2,96 y 4,43 pmol/L, respectivamente, aproximadamente media hora después de la administración (Balis y col, 1989).

1.2.3. TERAPEUTICA CON ZIDOVUDINA

En la actualidad, el AZT es un fármaco que ha demostrado ser efectivo sobre el VIH en la clínica humana (Gatell, 1994; Portegies, 1994). En 1986 se realizaron ensayos terapéuticos en fase I sobre 19 pacientes con SIDA a los que se le administró zidovudina a dosis que oscilaron de 3 a 30 mg/Kg /día por vía oral durante cuatro semanas. Se logró un incremento en los niveles de linfocitos T4 durante el tiempo que duró su administración, así como apareció una mejoría en las pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada y un aumento de peso de los pacientes (Yarchoan y col ,1986). Estos resultados preliminares dieron paso, en 1987, a los ensayos en fase II.

El primer estudio de terapia precoz con AZT comenzó en 1987, denominado "ACTG 019", con 3200 pacientes HIV+ asintomáticos asignados al azar para recibir unas dosis bajas de AZT (500 mg diarios), otras dosis altas (1500

mg por día) y otros placebo. Hoy todavía no ha finalizado el estudio pero hay resultados parciales que apuntan que la terapia con este fármaco es más beneficiosa si el valor de los CD4 esta entre 300 y 400 por mm^3 (valor normal es de aproximadamente 1.500 CD4 por mm^3).

En 1987 comenzó otro estudio con 5000 pacientes VIH+ que habían desarrollado SIDA y a las 44 semanas de tratamiento con AZT la supervivencia fué del 73% (Creagh-Kirk y col, 1988). En España comenzó también en 1987 un ensayo con zidovudina en enfermos con SIDA y CRS. La supervivencia al año de tratamiento fué del 83% en los 253 pacientes estudiados (González- Lahoz y col, 1988a y 1988b; González-Lahoz, 1991).

Como consecuencia de los resultados del ensayo en fase I, se inician los ensayos en la fase II, que se realizaron sobre un total de 282 pacientes, 160 con SIDA y 122 con CRS, a los que a la mitad aproximadamente se les administró 250 mg/cada 4 horas por via oral de zidovudina y a la otra mitad se le administró placebo (Fischl y col, 1987). Tras 24 semanas, en el grupo de zidovudina había fallecido un paciente y en el grupo del placebo 19. Además en el grupo de zidovudina fué menor el número de infecciones oportunistas, había un aumento significativo del peso corporal, una recuperación parcial del test de hipersensibilidad cutánea retardada y un incremento significativo del número de linfocitos T4. Estos resultados obligaron a suspender el ensayo y a recomendar la administración de AZT desde ese momento. A los doce meses la supervivencia era del 93% para los pacientes que inicialmente padecían CRS y del 79% para los diagnosticados de SIDA. A los 21 meses la supervivencia había descendido al 72% y al 47% para los pacientes con CRS y con SIDA, respectivamente. El aumento de mortalidad durante el segundo año de tratamiento no está bien justificado, y se postula que está en

relación con una pérdida progresiva de la actividad intrínseca del fármaco, o con la aparición de cepas del VIH resistentes al medicamento (Fischl y col, 1990a y 1990b). El estudio prosiguió varios años y se comprobó el efecto beneficioso del AZT en pacientes con cifras de CD4 por debajo de 500/ml. En otro ensayo clínico con pacientes asintomáticos que presentaban cifras de CD4 inferiores a 500/ml, se observó que dosis bajas de AZT, del orden 500 mg/día eran tan eficaces como otras más altas de 1500 mg /día (Volverding y col, 1990). Además desde 1992 se han realizado estudios para valorar la relación de eficacia y coste de los tratamientos (Langtry y col, 1993).

En 1991 se publica un estudio retrospectivo para determinar los efectos de la zidovudina y se utilizan como marcadores a los linfocitos CD4+, a las concentraciones de microglobulinas B2, a la neopterinina y al antígeno p24 del VIH (Jacobson y col, 1991). Los resultados son coincidentes con los encontrados por otros autores en el sentido de que el tratamiento proporciona mayor supervivencia cuanto más temprano se inicia la administración del AZT (Gray y col, 1991; Graham y col, 1993).

El segundo ensayo a gran escala de tratamiento precoz por VIH fue el estudio Concorde, que comenzó en 1988. Este estudio, que comprende a 1750 pacientes, concluye igual que el anterior en cuánto que debe comenzarse lo antes posible el tratamiento con el AZT (Cohen y col, 1993; Aboulker y Swart, 1993).

Además de estos estudios con participación de diferentes países se realizan otros con el fin de esclarecer nuevos aspectos sobre este compuesto. Uno de ellos es el que ha llevado a cabo Liebes y col. (1990) con el fin de estudiar la transferencia del AZT a través de placenta humana para evaluar la posible

acumulación placentaria y la acción antivírica. La conclusión de estas investigaciones fue descartar los efectos teratógenos de la zidovudina.

El tercer estudio a gran escala es el que se está llevando a cabo en el momento actual por dos grupos colaboradores de Europa y Australia. En este estudio, que comenzó en 1988 sobre 993 pacientes con CD4 superiores a 400 mm³, se analiza la terapia con AZT en pacientes asintomáticos infectados con VIH. Se trata de un ensayo a doble ciego, con controles que reciben placebo. Los resultados están demostrando la ventaja del tratamiento precoz y la tolerancia a la zidovudina a pesar de utilizarse dosis superiores a la media. En julio de 1993, Cooper y el Grupo Europeo y Australiano describen una buena tolerancia al fármaco después de tres años de tratamiento así como escasos efectos secundarios severos, tanto hematológicos como clínicos en general. Recomiendan que los pacientes HIV+ que reciban tratamiento solamente con zidovudina ingieran una dosis de AZT de 500 mg/día si el peso es inferior a 60 Kg, y de 750 mg/día si es superior a dicho peso (Cooper y col, 1993). Esta dosis ya había sido recomendada por Lange y col (1989) en un estudio realizado en pacientes HIV+ asintomáticos. Esto plantea un problema en pacientes que presenten alteraciones neurológicas, pues requieren dosis más altas de las recomendadas para alcanzar una concentración eficaz ya que el AZT atraviesa la barrera hematoencefálica en un 55% (Griffin, 1991).

Un problema que ha surgido recientemente es la aparición de mutantes víricas con resistencia *in vitro* al AZT. La existencia de este hecho fue comunicada por primera vez en 1989, en pacientes con SIDA que estaban sometidos a tratamiento durante más de seis meses (Larder y Kemp, 1989). La base molecular de la resistencia reside, al menos en parte, en una o más sustituciones de nucleótidos en el gen "pol" que codifica para la transcriptasa inversa (Larder, 1992).

La aparición de resistencia ha sido también comunicada recientemente en pacientes asintomáticos (estadios II/III de CDC) durante tratamientos prolongados con AZT (Rooke, 1989; Boucher y col en 1990, 1992; St Clair y col, 1993; Bartlett, 1993; Avramis y col, 1993).

Se ha comprobado también el hecho de que hay personas infectadas con VIH con mezcla de cepas de virus con diferente susceptibilidad al AZT (Mc Lean y col, 1991; Mc Lean y Nowack, 1992; Nielsen y col, 1992; Ortiz, 1994).

Con los conocimientos actuales se recomienda la monoterapia con AZT durante el primer año y medio tras el conocimiento de la infección VIH en pacientes poco evolucionados. Parece ser que en el futuro es probable de los pacientes con SIDA que ya hayan recibido monoterapia durante un tiempo, deban necesariamente ser tratados con una combinación de fármacos antiretrovíricos (González- LaHoz y Soriano, 1992; Bacchetti y col, 1992).

La tendencia actual es la administración de AZT en pacientes HIV siempre que exista tolerancia (Vella y col, 1994). En casos de intolerancia y procesos particulares se administra asociado con otros fármacos (Henderson y Gerberding, 1989; Jhonson y col, 1990 y 1991; Ruth y col, 1990; St Clair y col, 1991; Dornsife y col, 1991; Meng y col, 1992; Skowron y col, 1993; Graham y col, 1993; Abrams y col, 1994).

1.2.4. TOXICIDAD DEL AZT

La utilización de un nuevo fármaco requiere se hayan superado numerosas pruebas farmacológicas para asegurarse, dentro de lo posible, que esa sustancia

resulte inócua para el organismo o, por lo menos, que el riesgo que pueda generar su utilización se encuentre justificado ampliamente por los beneficiosos efectos que con el mismo se esperan conseguir.

Con el AZT han ocurrido una serie de hechos poco frecuentes, como el que fuese utilizado frente al VIH antes de tenerse un conocimiento amplio y en profundidad sobre alguna de sus características y efectos en el organismo. Esto se debió a la necesidad imperiosa de atajar la infección producida por los virus que nos ocupan, y por los resultados de un ensayo en primera fase que prometía buenos pronósticos.

El estudio de la toxicidad, en etapas experimentales, es un paso que requiere animales, aunque con restricciones lógicas, ya que todos los resultados no se pueden extrapolar al hombre por multitud de factores. Las toxicidades también son selectivas de especie, así un mismo fármaco no produce igual toxicidad en un cobayo, conejo, rata o primate. Además la propia idiosincrasia o constitución de cada individuo implican diferencias en los resultados que se puedan obtener (Perruca y Richens, 1980). Con cada fármaco es necesario realizar pruebas de toxicidad aguda del producto, con dosis elevadas y en animales de distintas especies, para así conocer la dosis máxima tolerable y obtener la dosis letal. También se requiere comprobar este hecho con distintas vías de administración. Pero en general, la toxicidad no suele dar resultados fijos y seguros. Como indicara Barnes en 1963 "la toxicidad no puede ser medida con precisión como si se tratase de la determinación de un punto de ebullición o de un peso molecular".

Sobre la toxicidad producida por AZT han aparecido en los cuatro últimos años algunos estudios, pero no todos unánimes ni concluyentes en sus resultados.

No obstante, ya existen efectos secundarios ampliamente contrastados tanto en el hombre como en animales de experimentación (Yarchoan y col, 1986; Richman y col, 1987b; Gill y col, 1987; Walker y col, 1988; Boyar y Beal, 1991; European-Australian Collaborative Group, 1992; Ferrazin y col, 1993).

1.2.4A. Toxicidad *in vivo*

* En el hombre: Los primeros datos de efectos secundarios se observaron en un estudio en Fase I (Yarchoan y col, 1986) en el que se describen anemia, leucopenia y neutropenia en un 50% de los enfermos tratados. Estos hechos han sido posteriormente confirmados por otros autores (Cowan y col, 1989; Conway y col, 1990).

Un efecto secundario, importante, se produce en la médula ósea, donde aparece una acentuada hipocelularidad, especialmente detectada a nivel de la línea granulocítica y eritropoyética. Parece comprobado que este hecho se encuentra relacionado de forma directa, con la cantidad de linfocitos CD4 y de granulocitos, así como con la concentración de hemoglobina que exista en el momento del tratamiento (Richman y col, 1987; Gill y col, 1987; Walker y col, 1988). La anemia suele comenzar a las 2-4 semanas tras iniciar el tratamiento mientras que la granulocitopenia ocurre entre la 6-8 semanas de la ingesta de AZT. También aparece una trombocitopenia ligada al medicamento que ha sido descrita por Boyar y Beal (1991). Sin embargo, hay estudios que detectan trombocitopenias en enfermos VIH+ que han desarrollado SIDA, y sin relación con el AZT (Bettaieb y col, 1989; Louagne y col, 1991; Ballem y col, 1992; Muñoz-Díaz y col, 1993; Rahim y col, 1993; Rachlis y Fanning, 1993). También se conoce que el AZT junto con otros antivirales produce un aumento de los efectos secundarios a nivel de médula ósea.

La macrocitosis aparece en un 75% de los pacientes que ingieren el AZT, y suele aparecer entre las 6-8 semanas de tratamiento siendo más evidente en 12-14 semanas (Gill y col, 1987; Richman y col, 1987b; Walker y col, 1988; Hewitt y col, 1993).

Gallicchio y Hughes (1993) han descrito que en tratamientos largos con AZT se producen disminuciones en los valores hematocritos a medida que aumenta la dosis de zidovudina, disminuyendo los leucocitos y plaquetas de la misma forma. Este autor propone que la utilización de IL-3 y eritropoyetina disminuyen la toxicidad del AZT (Gallicchio y col, 1993).

Se ha comprobado que la suspensión del tratamiento con AZT hace que aumentasen los niveles de hemoglobina, e incluso las alteraciones de la médula ósea (Walker y col, 1990).

La neutropenia es otro efecto secundario sobre todo cuando la dosis de AZT es de 100-1200 mg/ día. El 50% de los pacientes presentan neutropenias severas cuando se asocia el AZT con otras terapias como paracetamol. Parece ser, que la interacción de ese otro compuesto con el AZT aumenta el riesgo de neutropenia, pues ambos se metabolizan a través de la glucuronización hepática, y esto podría aumentar los niveles en plasma de AZT no metabolizada (Richman, 1987a; Shaunack y Bartlett, 1990). Hoy se sabe que dosis bajas de AZT (500mg/día) solamente dan un 1,8% de pacientes con neutropenia severa (Fischl y col, 1990; European- Australian Collaborative Group, 1992). Parece ser que niveles bajos de vitamina B₁₂ en suero predisponen a una mayor mielotoxicidad con el tratamiento (Richman y col, 1987b).

Diferentes autores han descrito la asociación del AZT con miopatías (Gerner y col, 1989; Gorard y col, 1988; Helbert y col, 1988; Panegyres y col, 1990; Mhiri y col, 1991; Pezeshkpour y col, 1991) en base a estudios morfológicos, inmunológicos y bioquímicos, concluyendo que aparecen disfunciones mitocondriales que se traducen en la alteración del ADN mitocondrial, de la creatina quinasa sérica así como cambios morfológicos ultraestructurales de las mitocondrias. Melamed y Raymond (1987) describen una posible asociación de AZT con hepatotoxicidad. Por su parte otros investigadores como Hagler y Frame (1987), Saracchini y col (1989), y Harrer y col (1990) han observado nefritis asociadas al AZT.

Otros efectos secundarios colaterales conocidos son: mialgias, náuseas, insomnio, cefaleas, exantemas (Richman y col, 1987b; Fisch y col, 1987; Fiala y col, 1988; Gill y col, 1991), y cambios de pigmentación en las uñas de manos y pies (Furth y Kazakis, 1987; Gonzalez -LaHoz y col, 1988a).

En niños la principal limitación de la terapia con AZT es la toxicidad hematológica, que se manifiesta, al igual que en adultos, como anemia y/o neutropenia. Estos efectos obligan a disminuir la dosis en, aproximadamente, un 30-40% de los niños, aunque no suele ser necesaria la retirada definitiva del compuesto (McKinney y col, 1991). Habitualmente la toxicidad hematológica se produce en las primeras semanas de tratamiento (Cilleruelo y col, 1991). Así, la anemia suele aparecer en las primeras 3-6 semanas de tratamiento y se controla suspendiendo temporalmente la medicación; a veces son necesarias las transfusiones. El porcentaje de aparición de anemia es de 30-40% (Griscelli, 1989), requiriendo transfusiones aproximadamente un 20% (Pediatric Zidovudine Study Group, 1988). La neutropenia se da entre un 25-50% en niños (Blanche y col, 1988) y aparece también en las primeras semanas de tratamiento. Se controla

disminuyendo la dosis y no suele ser necesario retirar el fármaco.

Se han realizado estudios en gestantes tratadas con zidovudina, observándose en los recién nacidos una toxicidad evidenciada por anemia y macrocitosis (Ferrazin y col, 1993).

Los pacientes con enfermedad clínica y/o analítica más severa tienen mayor posibilidad de manifestar efectos tóxicos, posiblemente por reducción de las reservas medulares (Griscelli, 1989).

* En animales: Un estudio en ratas y ratones (Thompson y col, 1991) describe como la administración de AZT y ddC (dideoxicitidina) provoca trastornos a nivel de médula ósea, los cuales desaparecen a los 30 días después de suspender el tratamiento con estos fármacos. Los animales ingieren el AZT 13 semanas consecutivas en concentraciones de 0, 125, 250, 500 y 1000 mg/kg y el estudio hematológico se efectúa a los 5, 23 y 94 días de ingesta para las diferentes concentraciones utilizadas. Se observan anemias, descenso de hematocrito, e incremento del volumen corpuscular medio. Zhang y col (1993) describen toxicidad en médula ósea en ratas "Sprague-dawley" a las que administran 750 mg AZT/ml, vía intraperitoneal a distintos tiempos.

Chow y col (1991) demuestran que el AZT administrado oralmente produce anemias a ratones infectados con el virus de la leucemia murina. Hecho también estudiado por Hamburger y col en 1993.

En 1992 Phillips y Tsoukas llevan a cabo un experimento en ratas y observa el efecto de la encapsulación liposomal del AZT y el efecto de la toxicidad

hematopoyética. Para ello administraron por vía intravenosa 4-10 mg AZT/kg peso, durante cinco días, y se observaron una disminución significativa en neutrófilos, monocitos y hematíes. La utilización del AZT liposomal, demostró ser menos citotóxica que el AZT sólo; por lo que sugieren sea una opción terapéutica.

Toltzis y col (1991), que realizaron un estudio de la toxicidad del AZT en ratonas gestantes, observan que los mismos tenían menor número de fetos. Estos autores, además, en cultivos celulares realizados con ovocitos fertilizados, a los que añadían concentraciones crecientes de AZT, observaron que el desarrollo no era normal. Toltzis y col (1993) proponen que la toxicidad, consistente en la disminución del número de fetos en ratonas gestantes, se contrarresta en parte si se administra conjuntamente con la zidovudina eritropoyetina, vitamina E o interleuquina-3.

Lambert y col (1991) describen cambios ultraestructurales en mitocondrias de músculo esquelético y cardíaco en modelos animales y en el hombre. Lewis y col (1991 y 1992) estudian músculo esquelético y cardíaco de ratas tratadas con AZT observando alteraciones a nivel ultraestructural y bioquímico de las mitocondrias. Estos cambios consisten, morfológicamente, en alteraciones de las crestas y vacuolización en la matriz mitocondrial, así como una mayor actividad de la creatina quinasa (CK) en relación directa con la dosis y el tiempo de tratamiento. Por su parte, el ADN mitocondrial disminuye con la ingesta del AZT. Reyes y col (1991) describen también miocondriopatías en cuádriceps de un grupo de hamsteres a los que administraron AZT.

1.2.4B. Toxicidad *in vitro*

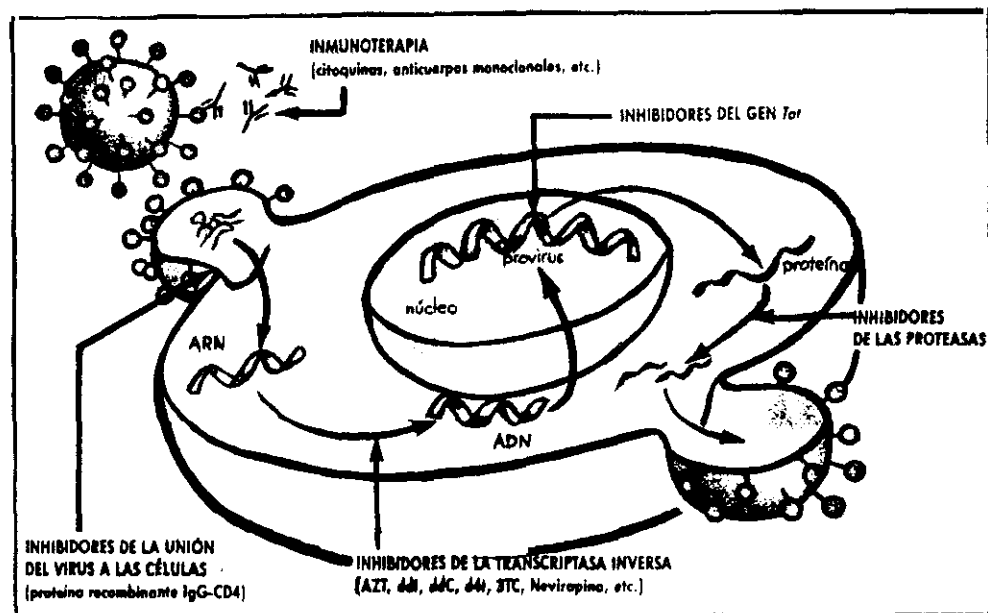
La toxicidad hematológica producida por AZT es menor en cultivos cuando se añade además del fármaco la interleuquina-3 (IL-3) (Gogu y col, 1993). Gallichio y Huges en 1992 observaron que la formación de colonias de células progenitoras aumenta cuando se asoció IL-3 en presencia de AZT, pero al no ser resultados definitivos se sugieren posteriores estudios. Chen y col (1991) han realizado un estudio en una línea celular linfoblastoide humana infectada con HIV, poniendo diferentes análogos de nucleósidos (AZT, ddc, ddl) y observaron que con el AZT disminuyen los niveles de ADN mitocondrial mientras que se mantienen unos valores normales de ADN nuclear; hecho que está en relación directa con la dosis administrada y con el tiempo.

1.3. OTRAS TERAPIAS ANTIRRETROVIRALES FRENTE AL VIH:

Los métodos terapéuticos frente al VIH se dirigen, en general, hacia la destrucción del virus o al menos a la paralización de alguna fase del proceso replicativo. Parece que en un futuro próximo se tenderá a potenciar el sistema inmunitario y a la vez atacar directamente al virus (Rowe y col, 1993). En el momento actual, existen múltiples agentes y sistemas terapéuticos que intentan obtener como resultado final un bloqueo en alguna de las etapas del ciclo vital del virus y por tanto impedir la presencia de nuevos virus (Kaplan y col, 1987; Hirsch y col, 1987; Sanström, 1989; Yarchoan y col, 1990; Donald, 1990; Buck y col, 1990;

Casoli y col, 1990; Balarini y col, 1991; Heagy y col 1991; Bartlett, 1992; Gulevich y col, 1993). En la figura 1.6 se representa el ciclo de replicación del virus y los niveles donde pueden actuar los distintos agentes antivirales.

Figura 1.6. Niveles donde actúan distintos agentes antivirales.



Atendiendo a las fases del ciclo de replicación podemos diferenciar una serie de grupos de estos antivirales que describiremos, brevemente, a continuación.

1) Fase de absorción y penetración: Existen una serie de compuestos que tratan de inhibir la entrada del virus en todas las células que presentan el receptor CD4, dado el papel de esta molécula en la fase de absorción y penetración del virus y ser esta etapa un eslabón decisivo en la vida del mismo. Entre los compuestos utilizados están:

- El CD4 y derivados (Byrn y col, 1990), como el CD4 soluble recombinante (CD4r) y el CD4- "exotoxina de pseudomonas" (Berger y col, 1989).

- Mezcla de fosfolípidos (AI-721).

- Polisacáridos sulfatados (Baba y col, 1990).

- Sulfato de dextrano.

* CD4r: La introducción en el organismo, de forma pasiva, de una cantidad suficiente de CD4r podría bloquear los receptores gp120 del VIH por lo que no se realizaría la unión a las células diana portadoras de los CD4. Este CD4r podría bloquear la entrada del virus tanto en linfocitos T, como en los monocitos y macrófagos. Su vida media en sangre es baja (45 minutos) (Schooley y col, 1990). Parece que *in vivo* la unión CD4r y VIH es mucho más débil que la descrita *in vitro* (Hoth y Myers, 1991).

* AI-727 (Activ-lipid - 721): Es una mezcla de tres fosfolípidos en proporción 7:2:1, que actúa extrayendo el colesterol de las membranas celulares, con lo cual altera la estructura del VIH y se dificulta la unión a los CD4.

* Polisacáridos sulfatados: Principalmente, el sulfato de dextrano que actúa sobre la unión gp120 al CD4 y en la formación de sincitios. Baba y col, refieren en 1990 la posibilidad del uso de varios fármacos y entre ellos estos compuestos.

2) Transcripción inversa:

La transcriptasa inversa es una enzima clave en la replicación del VIH.

En esta fase actúan:

- Análogos de los nucleósidos.

- * AZT, zidovudina.

- * ddl (2', 3'- didesoxinosina).

* ddc (2',3' didesoxicitidina).

* Didehidrodesoxitimidina, dT4 (2',3'- dideoxitimidina).

- Suramina.
- Tungstato de antimonio (HPA-23).
- Fosfonofarmato (foscarnet es el nombre genérico).
- Rifabutina (nombre genérico: Ansamicina).
- Tetrahidroimidazobenzodiazepintionas. Derivados TIBO (Pauwels y col, 1990).
- Ribozimas.

* ddl: Es un fármaco análogo de las purinas que penetra en la célula diana convirtiéndose en trifosfato de ddA (ddATP), el cual es el intermedio activo que actúa directamente sobre la transcriptasa inversa inhibiendo la replicación viral. Parece ser que tiene menos toxicidad hematológica que el AZT, pero se han observado efectos secundarios importantes como neuropatías periféricas que parece ser desaparecen varias semanas tras la suspensión del tratamiento (Lambert y col, 1990; Cooley y col, 1990). Butler y col (1991) comprobaron que dosis altas producían casos de pancreatitis.

* ddc (2',3'-didesocitidina): Alcanza su forma trifosfato activa inhibiendo la transcriptasa inversa, por medio de la enzima desoxicitidina-quinasa. La toxicidad hematológica es poco habitual con este fármaco. Puede producir neuropatías periféricas y algunos efectos secundarios dependiendo de la dosis y el tiempo de administración (Berger y col, 1993).

* dT4 (2',3'-didehidro, 2',3'-dideoxitimidina): Tiene una actividad *in vitro* similar a la zidovudina. En ensayos clínicos en fase I se ha demostrado un aumento

transitorio de células CD4 y una disminución de la antigenicidad de la p24. Su efecto tóxico más importante es la neuropatía periférica y los cuadros de hepatitis.

* Suramina: Después de los primeros ensayos se sabe que produce efectos secundarios importantes y no se demuestra ninguna eficacia frente al virus en estudios *in vivo*.

* Tungstato de antimonio (HPA-23): Es también un inhibidor de la transcriptasa inversa, pero se ha descartado su uso frente al VIH por producir efectos secundarios importantes (Vogt y Hirsch, 1986; Sandström y Kaplan, 1987).

* Foscarnet (PFA): Es un análogo del pirofosfato que inhibe la actividad de la transcriptasa inversa del VIH. Ha sido utilizado en otras infecciones víricas pero no es muy eficaz para el VIH aunque disminuye la antigenicidad de la p24. Se sabe por ensayos clínicos que no modifica los parámetros inmunológicos (Farthing y col, 1987; Ganb y col, 1987). También se ha utilizado en pacientes que han desarrollado SIDA y que padecen rinitis por citomegalovirus (Polis y col, 1993).

* Rifabutina (ansamicina): Inhibe igualmente la transcriptasa inversa. Los ensayos clínicos en fase I y II describen buena tolerancia pero no demuestran beneficio clínico.

* Compuestos TIBO: Han sido descritos por Pauwels y col (1990). Se han indicado una serie de productos nuevos dentro de este grupo como el tetrahidro- imidazo [(4,5,1- jk) (1,4) - benzodiazepin 2 (1H) - 1] y tio- derivados, con capacidad de inhibir específicamente la replicación del VIH-1 pero no del VIH-2 ni de ningún otro virus analizado. Sus características *in vitro*, tales como su capacidad

de inhibición del virus en concentraciones nanomolares.

* Ribozima: Durante la transcripción actuarían también las ribozimas mediante su actividad enzimática sobre los transcritos de ARN, reduciendo consecuentemente la producción de antígeno p24 y ADN provírico (Sarver y col, 1990).

3) La expresión génica :

Esta puede ser inhibida por un mutante del gen " ela " de adenovirus, denominada hf5, la cual suprime la expresión de las secuencias repetitivas largas del VIH-1, según han descrito Ventura y col en 1990.

4) Postranscripción y traducción:

En esta fase los fármacos existentes están, en el momento actual, en un estado precoz de investigación, y sólo en algunos de ellos existe experiencia clínica.

En este grupo se hallan:

- Ribavirina (Crumpaker y col, 1986; Hirsch y Kaplan, 1987; Lanskin y col, 1987; Spector y col, 1989).
- Castanospermina y su derivado "N- butil- desoxi-nojirimicina" (SC48334).
- GLQ 223 (Tricosantina).
- Inhibidores de proteasa.
- Interferones.

5) Precursos de la nucleocapside y las enzimas :

Actúan durante la maduración de la partícula vírica, para que no se complete el virus. Pero autores como Meek y col, 1990; McQuade y col, 1990 proponen que no aportan buenos resultados y tienen graves inconvenientes.

6) Interferones (IFN): actúan en los momentos finales de la replicación (Yamoto y col, 1986; Dolei y col, 1986). Inhiben la replicación intracelular de casi todos los virus conocidos, mostrando efectos no sólo antivirales sino también antiproliferativos e inmunomoduladores. Existen tres tipos (alfa, beta, gamma). La línea celular que da origen al α -IFN es el leucocito periférico. El β -IFN procede del fibroblasto y el γ -IFN del linfocito T. Algunos se obtienen a partir de células linfoblastoides humanas o por ingeniería genética mediante ADN recombinante.

En un estudio llevado a cabo con α -IFN en pacientes asintomáticos con cifras de CD4 superiores a $400/\text{mm}^3$, estos no desarrollaron SIDA. Sin embargo, hay que indicar que tanto el grupo placebo como el que ingería interferón tenían además otros tratamientos, y concretamente con AZT, por lo que no se concluye que la efectividad fuera debida al IFN (Lane y col, 1990). Parece que en un futuro está indicada la administración de IFN formando parte de combinaciones terapéuticas.

7) Los modificadores de la respuesta biológica:

- Interleuquina - 2 (IL-2) (Kaplan y col, 1987).
- Isoprinosina (Grieco y col, 1984).
- Ampligen (Carter y col, 1987).
- Imutiol.

- AS-101.

De todas las terapias antirretrovirales comentadas el AZT es el medicamento básico ya sea como fármaco único o en asociación con otros, hecho que acreditan numerosos investigadores (Dhiver y col, 1989; Fiddian and Collaborative European/Australian study group, 1989; Johnson y col, 1990; Yarchoan y col, 1991; Jacobson y col, 1991; Dornsife y col, 1991; Johnson y col, 1991; Meng y col, 1992; Skowrom y col, 1993; Mulder y col, 1994).

1.4. PATOLOGIA GENERAL DE LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos cuya fisiología y patología, está íntimamente ligada a la de la célula que pertenece y viceversa. Todo fenómeno que suponga un cambio celular como sucede en el envejecimiento, las respuestas compensadoras, las transformaciones neoplásicas o la acción de agentes o situaciones agresoras, afectan a la mitocondria. En muchas ocasiones es al contrario; son las diferentes situaciones las que en primer lugar actúan sobre la mitocondria y dado el importantísimo papel de este orgánulo en la fisiología celular, ésta acaba por ser afectada (Trump y col, 1978).

Las citopatías mitocondriales son un conjunto de enfermedades cuya característica común es la presencia de anomalías estructurales o funcionales a nivel de las mitocondrias y pueden afectar a un órgano o varios (Petty y col, 1986).

Cuando se lesiona una célula, ocurren cambios funcionales y estructurales que en caso de lesión grave o prolongada conducen a su muerte y desintegración.

En muchas circunstancias, las lesiones producidas son reversibles. En la mayoría de los casos los agentes agresores actúan disminuyendo o interrumpiendo una función metabólica esencial (como los mecanismos de oxidación o la síntesis de proteínas). En estas circunstancias, los cambios morfológicos reconocibles, puede retrasarse desde minutos a horas, si los consideramos a nivel ultraestructural, o desde horas a días si consideramos el nivel óptico, y en ambos casos se deben a los efectos secundarios a la lesión inicial (Ghadially, 1992). Un aspecto óptico normal no implica necesariamente normalidad celular. Los orgánulos, unidades estructurales y funcionales de las células, pueden estar muy seriamente afectados.

No tenemos ninguna duda, y la bibliografía comentada así lo demuestra, que en tratamientos con AZT se manifiestan lesiones que específicamente afectan a las mitocondrias (Lewis y col, 1991 y 1992; Reyes y col, 1991). Estos orgánulos salvo en circunstancias muy concretas (como megamitocondrias en la enfermedad alcohólica por ejemplo y otras) son imposibles de identificar con microscopía óptica. La mitocondria tiene una estructura muy compleja y su papel en el metabolismo es tan importante que no es extraño que, con extraordinaria frecuencia, presente una importante variedad de alteraciones morfológicas que son demostrables sólo con los estudios ultraestructurales e incluso a veces son necesarios análisis mucho más específicos.

Tampoco hay que olvidar que la mitocondria no es una estructura solitaria y ajena al resto de los componentes celulares. De la misma manera que existe una interrelación funcional la hay a nivel morfológico, y cuando estas funciones son agredidas o alteradas por agentes externos, se modifican las relaciones morfológicas. Así se dan cambios en complejos como los retículos endoplásmicos-mitocondrias, gotas lipídicas-mitocondrias, peroxisomas-mitocondrias, etc.

Por todo lo indicado y con el fin de facilitar, dentro de lo posible, un mejor entendimiento de nuestros resultados morfológicos a nivel de microscopía óptica convencional y microscopía electrónica de transmisión, incluimos en la presente memoria, una breve revisión de la patología mitocondrial basada en la bibliografía de: Díaz-Flores y col, 1979; López-Bravo, 1993.

Este orgánulo intracitoplasmático, delimitado por una doble membrana con plegamientos en la interna que relaciona dos cámaras ultraestructural y funcionalmente definidas, tiene múltiples propiedades y funciones biológicas (Hall y Palmer, 1969), destacando como las más importantes para su consideración patológica:

- 1.-Producción de energía necesaria para la actividad celular.
- 2.-Síntesis de proteínas estructurales y enzimáticas así como de metabolitos intermedios para su utilización por otras estructuras subcelulares.
- 3.-Intervención en múltiples ciclos metabólicos.
- 4.- Almacén para determinados iones (Ca^{++} , Mg^{++} , PO_4^- , Fe^{++} , etc).

La mitocondria posee una estructura que se altera con mucha facilidad y muy tempranamente, de tal manera que desde el mismo momento de la extracción del tejido, es decir de la solución de continuidad con el ambiente físico, los aportes nutricionales, respiratorios etc., aparecen importantes cambios morfológicos a nivel ultraestructural. Hay que tener en cuenta que estas alteraciones de las fases iniciales de la muerte, o de la hipoxia, son comunes a múltiples causas patológicas y por ello es necesario garantizar que la fijación, es decir la detención de los cambios secundarios a la obtención del material, se ha producido en las condiciones adecuadas. Al mismo tiempo, hay que considerar que la estructura bioquímica de

las membranas y demás componentes estructurales, pueden verse afectados por las manipulaciones y acción de los diferentes medios utilizados durante la preparación de las muestras. Los cambios en el pH, las deshidrataciones-hidrataciones sucesivas, los agentes aclarantes, los medios de inclusión, las centrifugaciones y sobre todo los cambios de temperatura de los distintos medios necesarios para el procesado de las piezas, pueden producir artefactos con manifestación morfológica idéntica a algunas de las lesiones inducidas por los distintos agentes lesivos.

Podemos considerar los siguientes grupos de alteraciones generales:

1.- Variaciones en la población:

1A - Del Número.

1B - De la distribución topográfica.

2.- Variaciones morfológicas:

- Tamaño.

- Forma.

3.- Alteraciones en la relación con otras estructuras subcelulares.

4.- Alteraciones estructurales.

1.- Variaciones de la población:

1A - Número: La cantidad de mitocondrias presentes en las células es muy variable, dependiendo de múltiples factores como:

* Especie animal.

* Tipo celular: según el grado de diferenciación y/o especialización.

* Momento funcional : Actividad- reposo.

* Estadío del ciclo vital.

Las alteraciones cuantitativas pueden clasificarse en dos grandes grupos: Por

exceso y por defecto.

Por exceso pueden observarse en procesos de infección vírica y con algunos fármacos, entre ellos la zidovudina. En este tipo de procesos se sugiere que el aumento es producido por una posible sobrecarga funcional mantenida, la cual conduce a una adaptación funcional. Otros casos de aumento se encuentran en algunas formas de envejecimiento y degeneración celular (Tomonage, 1977). No obstante, en el envejecimiento y degeneración de la célula, procesos en los que se presenta pérdida de material celular, aparece normalmente una disminución del número de mitocondrias (Tauchi y Sato, 1985). Lo que parece evidente es que alteraciones en el número, al igual que en otros aspectos mitocondriales, se asocian tanto a procesos fisiológicos como puede ser el envejecimiento, como a estados patológicos (Tomonage, 1977).

1B - Variaciones en la distribución topográfica:

Las mitocondrias suelen estar distribuidas de manera uniforme por el citoplasma, salvo en aquellos elementos que tienen una mayor demanda energética en un área celular determinada como ocurre, por ejemplo, en las células del tubo contorneado renal en donde se distribuyen entre los pliegues del polo basal.

De forma patológica podemos encontrarlas en vacuolas autofágicas y en lisosomas secundarios como resultado de fenómenos degenerativos. También en cuerpos apoptóticos fagocitados por células macrofágicas, o internalizadas en células epiteliales y tumorales. Fuera de la célula se pueden presentar incluidas en cuerpos apoptóticos libres. La apoptosis es un fenómeno fisiológico de muerte celular programada.

2.- Variaciones morfológicas:

Hay que considerar dos aspectos: Las que se refieren al tamaño y las de la

forma.

2A - Tamaño:

El tamaño de las mitocondrias es muy variable y depende de diversos factores biológicos como, tipo celular, órgano, especie, estado funcional, etc. Hay que considerar además otros factores como el efecto de las técnicas etc. También hay que tener en cuenta, que la observación habitual con microscopía óptica y electrónica de transmisión, la realizamos sobre un plano de corte. Salvo en las variaciones generalizadas por exceso, nos proporcionan una información incompleta no extrapolable tridimensionalmente. Para que este tipo de técnicas puedan ser consideradas como válidas, es imprescindible observar múltiples células del mismo tejido y en planos sucesivos. Los sistemas automatizados de análisis de imagen, las platinas que permiten incorporar un alto número de portaobjetos, junto a la monitorización de las mismas y los sistemas informáticos de proceso de datos, cada vez más habituales en los laboratorios morfológicos, permiten obtener informaciones fiables con técnicas de estudio en un solo plano.

Las alteraciones de tamaño pueden ser por exceso o por defecto, aunque pueden coincidir ambas variaciones en la misma célula. Esta situación patológica, también puede producirse como un artefacto debido a la fijación.

Las variaciones por defecto se producen en múltiples procesos degenerativos celulares pero son las alteraciones por exceso las que tienen un significado patológico mas importante y con mayor diversidad de causas; muchas de ellas abocan a un resultado final de pérdida de volumen e incluso de desaparición, a través de mecanismos como la contracción, fragmentación y condriolisis. En algunas circunstancias las variaciones de tamaño por exceso o defecto se deben a mecanismos mixtos como la contracción o hiperplasia asociadas a acúmulos de

substancias, dando lugar a la presencia de " cuerpos hialinos ". Un frecuente mecanismo de hipertrofia mitocondrial es el de fusión que se suele relacionar con situaciones de hiperactividad funcional y otras causas.

La tumefacción mitocondrial, supone un aumento de tamaño por incorporación de agua dando lugar a una pérdida real o relativa de la matriz y acabando por la transformación de todo el orgánulo en una vesícula microscópicamente vacía. Este paso de agua puede presentarse de dos formas. En la primera sería por penetración pasiva y por lo tanto en relación a la osmolaridad del micromedio ambiente, y la segunda por un proceso activo que ya fué descrito en 1953 y confirmado posteriormente por múltiples autores; este mecanismo está asociado y depende del proceso de respiración. Al mismo tiempo en ambos mecanismos pueden participar multiples agentes que favorecen o impiden el hinchamiento celular. Por lo tanto el paso de agua, como de muchas otras sustancias que penetran en el soma mitocondrial, está regulado por diferentes factores. Estas modificaciones han sido consideradas como el fenómeno inicial de la tumefacción turbia o vacuolar que se describe y observa con microscopía óptica y que se asocia además a cambios importantes a nivel de retículo endoplasmático.

Si la tumefacción se detiene por cese de la causa inductora, la mitocondria se regenera facilmente, es decir estas primeras fases de tumefacción suelen ser reversibles y compatibles con la función del orgánulo, salvo en casos de daño muy avanzado.

En las células sometidas a hipoxia, se observa una tumefacción vacuolar con fragmentación de crestas y absorción de agua, que en los primeros momentos es reversible. A los 25 minutos, las enzimas que están en la superficie de las crestas

aparecen en forma de grumos en el interior de las mismas. A los 35 minutos las lesiones son irreversibles.

El concepto clásico de tumefacción vacuolar, significa que en la célula aún hay energía. Cuando se alcanza el momento de pérdida total, que generalmente se asocia a fenómenos de contracción por salida de agua al resto del citoplasma que se ballooniza difusamente, se conceptúa como "degeneración hidrópica". Es esta pérdida de la capacidad energética y la reversibilidad de las funciones fisiológicas, las que marcan la diferencia entre ambos conceptos de tumefacción, reversible, y degeneración, irreversible.

En realidad es casi imposible con métodos morfológicos, establecer la frontera entre ambos conceptos así como la diferencia entre una respuesta dentro de la normalidad o patológica. En ciertas situaciones de alteración muy graves de las mitocondrias, podemos observar una función fisiopatológica muy bien conservada.

Las mitocondrias hinchadas y tumefactas, pueden ser capaces de contraerse en ciertas condiciones y expulsar el agua mediante un mecanismo activo. Esta contracción comprobada *in vitro* se realiza en presencia de ATP.

Parece ser que el volumen y configuración de las mitocondrias en las células intactas, son el resultado de un equilibrio dinámico entre fuerzas antagónicas: agentes que favorecen el hinchamiento y agentes que favorecen la retracción. Todos estos agentes están conectados de alguna manera con la función mitocondrial, al menos con los mecanismos de respiración y fosforilización oxidativa.

El número de procesos definidos que cursan con aumento del volumen de las mitocondrias es muy elevado. Un análisis de cada uno de ellos, supondría

apartarnos de la idea inicial de una revisión general de las alteraciones mitocondriales y por otro lado la relación con nuestros objetivos experimentales es escasa.

2B - Forma:

Son múltiples e inespecíficas, además en algunos casos interviene como determinante la fusión de varias mitocondrias.

3.- Alteraciones mitocondriales en relación con otras estructuras celulares:

Suelen tener una base funcional. Siguiendo en esquema de Díaz-Flores, 1979 las clasifica en:

a) Asociación con orgánulos:

- Membranosos: RER, peroxisomas, etc.
- No membranosos: centriolo, cilios, etc.

b) Asociación con componentes paraplásmicos (inmersos en el hialoplasma): gotas lipídicas, siderosomas, glucógeno etc.

c) Asociación con componentes del citoesqueleto: miofilamentos-miofibrillas, microfilamentos-microtúbulos, etc.

d) Asociación con la superficie celular.

4.- Alteraciones estructurales:

- A nivel de la membrana mitocondrial externa, son de carácter inespecífico.
- A nivel de la membrana interna, pueden ser con modificaciones en la conformación, condicionadas por cambios morfológicos, volumétricos y modificaciones en las crestas, que pueden variar en número, disposición, morfología y estructura. hay que tener en cuenta que el número de crestas y disposición varía con el órgano. Así en el músculo esquelético y corazón, las mitocondrias contienen en condiciones normales tres veces más crestas que las que presentan los

hepatocitos (Darnell-Lodish-Baltimore, 1988).

Las alteraciones en el tamaño de las crestas están en relación con las de su disposición, siendo múltiples y variadas y con relativa frecuencia coexisten varias de ellas en un misma mitocondria; así, se pueden observar mitocondrias con crestas longitudinales, que probablemente representan fenómenos de adaptación y/o cambios en la neoformación o en el recambio de citomembranas, y crestas con disposición anular o concéntrica observadas en múltiples circunstancias patológicas (miopatías diversas).

- A nivel de las cámaras interna y externa las alteraciones pueden ser volumétricas, de densidad y de composición.

Todas las alteraciones descritas son fundamentalmente morfológicas pero van acompañadas de cambios bioquímicos visualizables y medibles por distintos métodos.

las mitocondrias son un eslabón fundamental en el proceso de la fosforilación oxidativa y por tanto, de las reacciones redox. Dentro de la cadena respiratoria, el 95% del oxígeno molecular experimenta la reducción tetravalente a agua, y el 5% restante la univalente a superóxido, que rápidamente dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizado por la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD). En el miocardio el H_2O_2 se reduce a agua por la enzima glutatión peroxidasa. Si ocurre un proceso de isquemia que luego es seguido por la reperfusión se da un proceso de autooxidación que favorece la producción de radicales libres de oxígeno que lesionan la mitocondria, la célula y las células adyacentes (Ramón, 1993).

Es conocido que el estado metabólico general influye en la composición

mitocondrial, así un aumento de colesterol, como sucede en el envejecimiento de las membranas mitocondriales y que puede ser de hasta un 35 y 70% en el hígado y riñón, respectivamente (Grinna, 1977), puede alterar considerablemente las actividades enzimáticas asociadas a tales membranas (Kimelberg, 1974).

2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS:

El descubrimiento de la **Zidovudina o AZT** como primer fármaco para el tratamiento de la infección por VIH, significó un hito importante y una puerta abierta a la esperanza de estos enfermos.

En 1986 comienza la administración sistemática de zidovudina, sin haber completado el estudio farmacológico de esta molécula, ante la necesidad de intentar frenar la progresión de la infección por VIH. El primer estudio fue un ensayo clínico a doble ciego en pacientes VIH positivos a los que se les administró AZT y otro grupo de pacientes que ingirieron placebo (Richman, 1987), pero tuvo que paralizarse al comprobar a corto plazo la eficacia del medicamento, administrándose a todos los pacientes por motivos éticos.

Hechos posteriores han venido a poner en entredicho su efectividad (Cooper y col, 1993; Abrams y col, 1994), aunque en algunas situaciones específicas sigue siendo importante (Gatell, 1994; Vella y col, 1994). El uso continuado, durante muchos años, demostró la presencia de efectos yatrogénicos no deseables, entre los que destaca la afectación mitocondrial de las células del músculo estriado cardíaco (Dalakas y col, 1990).

Conocemos las alteraciones más importantes a nivel de microscopía electrónica en tejido muscular cardíaco humano y algunos autores han desarrollado un modelo experimental en ratas a las que administraban AZT en el agua de bebida (Lewis y col, 1991, 1992) comprobando en estos animales alteraciones mitocondriales a nivel morfológico y funcional. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento sobre los efectos que puede producir el AZT en el organismo son

escasos. No hay dudas en cuanto a que el AZT lesiona las mitocondrias del tejido muscular cardiaco, aunque no existen por el momento datos que hagan sospechar que la especificidad de la lesión está únicamente centrada en este tejido. Aún queda por conocer el grado de afectación, si existe, en diversos enzimas mitocondriales y otros muchos aspectos que nos permitan llegar a comprender la causa de las alteraciones observadas a nivel morfológico.

Con estas premisas nos planteamos las siguientes cuestiones:

Estudiar los efectos yatrogénicos de la zidovudina (AZT), a nivel mitocondrial preferentemente, partiendo de un modelo experimental en ratas y utilizando técnicas de microscopía óptica convencional, microscopía electrónica, técnicas histoenzimáticas y de análisis de imagen para intentar responder las siguientes cuestiones:

- a.- ¿ Se presentan o no las alteraciones ?.
- b.- ¿ En que tejidos ?.
- c.- ¿ Cuándo se presentan y cómo evolucionan cuantitativamente ?.
- d.- ¿ Afectan a la ultraestructura y /o al componente enzimático mitocondrial?
- e.- ¿ Es o no una alteración aguda, progresiva reversible o crónica ?.
- f.- ¿ La supresión del fármaco provoca reversibilidad o no y en cuánto tiempo?.

A partir de estas preguntas planteamos los siguientes objetivos:

1.- Diseño y validación de un modelo experimental para el estudio de efectos yatrogénicos inducidos por la zidovudina (AZT).

2.- Estudio microscópico convencional de los distintos órganos: corazón, hígado, riñón y sistema nervioso central (a nivel de cerebro y cerebelo).

3.- Estudio ultraestructural de los mismos órganos indicados en el objetivo anterior, con especial atención en las mitocondrias, para detectar posibles alteraciones en las mismas.

4.- Estudios, con métodos histoenzimáticos en los tejidos antes descritos, de las enzimas mitocondriales implicadas en el ciclo de Krebs y enzimas diaforasas que revelan actividad óxido-reductora ligadas en último termino a la cadena respiratoria.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material biológico: Animales de experimentación.

Se han utilizado ratas adultas hembras " Sprague-dawley " de 250-290 g obtenidas comercialmente (Charles River España) con un peso inicial que varió en un rango de 250- 290 gr. La alimentación fue de tipo estandar (Interfauna) y suministrada *ab libitum*. El agua de bebida se suministró también *ab libitum*.

Todos los animales se estabularon en jaulas individuales con una temperatura ambiental de $20 \pm 5^{\circ}$ C, con ciclo natural de luz/oscuridad. El periodo de aclimatación fue al menos de cinco días.

3.1.2. MATERIAL QUIMICO:

3.1.2.A. ZIDOVUDINA (AZT).

Retrovir (Wellcome), suministrado para uso terapéutico humano en cápsulas de 250 mg del principio activo. Todo el fármaco utilizado correspondía al mismo lote (Nº 988279).

Las cápsulas se disolvieron en agua corriente a las concentraciones adecuadas para cada experimento y se suministró en el agua de bebida *ad libitum*. Cada día se anotó el consumo procediéndose a la renovación completa cada dos días.

3.1.2B. REACTIVOS Y PREPARACION DE MEDIOS.

La preparación y composición de cada uno de los medios se relaciona en el apéndice al final del presente capítulo. Reseñamos todos y cada uno de los métodos de preparación, salvo aquellos que son de uso común.

3.2. METODOS

3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se procesan un total de 74 animales divididos aleatoriamente siguiendo las indicaciones establecidas para este tipo de estudios, la elección del número de animales por lote y grupo viene determinado por la obtención de una eficiencia máxima en el estudio. Así, por un lado y de forma primordial está la comprobación de la concordancia de los resultados obtenidos en diferentes animales y por otro la limitación económica que supondría el incrementar innecesariamente el tamaño de la muestra (Carrasco, 1989).

Animales.-

El total de animales (74) se dividió en tres grandes grupos:

* **GRUPO A:** formado por un total de 45 animales. Con este grupo se llevó a cabo el estudio evolutivo de las posibles lesiones inducidas por distintas concentraciones de AZT a lo largo de diferentes tiempos de ingesta del fármaco. Los análisis se efectuaron a dos niveles: uno morfológico (con microscopía óptica y electrónica) y otro funcional (reacciones histoenzimáticas).

* **GRUPO B:** consta de 18 animales para analizar una posible reversibilidad de las lesiones producidas por diversos tratamientos con AZT tras la supresión de la ingesta del fármaco. En este grupo se llevó a cabo la misma metodología que el grupo anterior.

* **GRUPO C:** consta de 11 animales destinados a un estudio complementario y colateral en los que se realiza una analítica sanguínea con parámetros hematológicos (fórmula sanguínea, recuento, hemoglobina, volumen corpuscular medio y valor hematocrito entre otros) y bioquímicos. Estos últimos incluyen la determinación de transaminasas, creatina quinasa, glucosa y lactato deshidrogenasa.

Estos grandes grupos se subdividieron a su vez en tres grupos denominados: grupos 1, 2 y 3, en los que los animales recibieron distintas concentraciones de AZT en el agua de bebida que fue proporcionada *ad libitum*, como ya se indicó previamente.

* **Grupo 1:** 2mg AZT/ml de agua de bebida.

* **Grupo 2:** 1mg AZT/ml de agua de bebida.

* **Grupo 3:** 0 mg AZT/ml de agua de bebida. Este grupo es el control y fue mantenido en las mismas condiciones que las otras pero sin recibir el fármaco.

* **GRUPO A:**

El grupo A formado a su vez por los grupos 1, 2 y 3 en relación a la dosis de AZT ingerida, como se acaba de indicar, se subdividió a su vez en cinco lotes, cada uno de los cuales corresponde al tiempo de ingestión del medicamento. Para cada lote y grupo la distribución de los 45 animales del grupo A se muestra en la

tabla 3.1. que se comentará con más detalle seguidamente. El experimento se realizó por triplicado para cada lote y grupo.

* Lote I: consta de 9 animales, que ingirieron AZT durante 15 días. Este lote está constituido por tres grupos de tres animales cada uno, los cuales recibieron 2, 1 ó 0 mg AZT/ml de agua de bebida.

* Lote II: con 9 animales que fueron tratados un total de 30 días.

* Lote III: 9 animales tratados durante 60 días.

* Lote IV: 9 animales tratados durante 90 días.

* Lote V: 9 animales tratados durante 120 días.

En todos los lotes la distribución de los animales fue semejante a la indicada para el lote I.

* GRUPO B:

Está constituido al igual que el grupo A, por los grupos 1, 2 y 3 y los lotes VI y VII. La distribución de los 18 animales de este grupo B se indica en la tabla 3.2. Al igual que en el grupo A cada experimento realizó por triplicado.

* Lote VI: consta de 9 animales que recibieron el tratamiento con AZT 30 días, transcurridos los cuales se suspendió el mismo, permaneciendo posteriormente 15 días con agua sin medicamento. El tiempo total de la experimentación fue, por tanto, de 45 días.

* Lote VII: con 9 animales que recibieron el tratamiento de AZT durante 60 días permanecieron sin el mismo los siguientes 15 días. El tiempo total es de 75 días en este lote (grupos 1, 2 y 3).

- Tanto con el grupo A como con el B se plantó conocer la dosis ingerida para

lo cual se anotó el consumo diario de bebida (ml) con relación al peso (g) del animal a lo largo del tiempo de duración de cada experimento.

* GRUPO C:

Consta de 11 animales divididos en dos grupos :

* C1: consta de 5 animales que han ingerido 2mg AZT/ml en agua de bebida *ad libitum*, y que fueron sacrificados tras 15, 30, 60, 90 o 120 días, un animal en cada uno de los tiempos indicados.

* C2: Grupo control que consta de 6 animales que no ingirieron medicamento en ningún momento, sacrificados en distintos tiempos a lo largo de la experimentación llevada a cabo con el grupo C1.

Tabla 3.1. Número de animales por grupos y tiempo de sacrificio del Grupo A.

| LOTES/TIEMPO | GRUPO 1 (2mg AZT/ml agua) | GRUPO 2 (1mg AZT/ml agua) | GRUPO 3 (Sin AZT) |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Lote I (15 DIAS) | 3 | 3 | 3 |
| Lote II (30 DIAS) | 3 | 3 | 3 |
| Lote III (60 DIAS) | 3 | 3 | 3 |
| Lote IV (90 DIAS) | 3 | 3 | 3 |
| Lote V (120 DIAS) | 3 | 3 | 3 |
| TOTAL | 15 | 15 | 15 |

Tabla 3.2. Número de animales por grupos y tiempo. Grupo B.

| LOTES/TIEMPO | GRUPO 1 (2mg AZT/ml agua) | GRUPO 2 (1mg AZT/ml agua) | GRUPO 3 (Sin AZT) |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Lote VI (30 DIAS AZT+ 15 DIAS AGUA) | 3 | 3 | 3 |
| Lote VII (60 DIAS AZT + 15 DIAS AGUA) | 3 | 3 | 3 |
| TOTAL | 6 | 6 | 6 |

- En el protocolo de trabajo incluimos:
 - La observación diaria de los animales.
 - El volumen en ml de consumo de bebida de cada animal (están individualizados por jaula).
 - El peso de cada animal, al inicio y final de cada experimento.
 - El tiempo transcurrido en obtener las las muestras para su estudio evolutivo de las posibles lesiones morfológicas y/o funcionales, que constituye los lotes descritos.
 - El estudio de los animales del grupo control (grupo 3) que se mantienen y manipulan de forma semejante a los de los otros grupos y se sacrifican en los mismos tiempos que los grupos que ingieren AZT para validar así los resultados obtenidos.

Dosis de AZT.-

La dosis de 1 mg AZT/ml fue utilizada por Lewis y col. (1991 y 1992) en un modelo experimental en ratas a las que administraron el medicamento en el agua de bebida (un máximo de 35 días), por ser una dosis similar a la que recibían en esos momentos pacientes humanos infectados con VIH. Nosotros diseñamos un modelo utilizando además de esa dosis (1mg AZT/ml) otra con doble cantidad de fármaco (2mg AZT/ml), para comprobar, de esta forma, la posible existencia de diferencias en relación a la concentración utilizada. Además nuestro modelo ha considerado diferentes tiempos de tratamiento y pautas de recuperación, como ya ha sido indicado con respecto al tiempo de ingesta (diferentes lotes descritos).

El número total de animales utilizados fué:

A.- Estudio morfológico e histoenzimático....63

B.- Estudio hematológico y bioquímico.....11

TOTAL.74

3.2.2. TECNICA DE EXTRACCION DE ORGANOS.-

Para la realización de los estudios morfológicos e histoenzimáticos, se procede a la extracción de los órganos objeto de estudio: corazón, hígado, riñón y sistema nervioso central (cerebro y cerebelo), tras anestésiar al animal y proceder a su perfusión y fijación.

3.2.2A. ANESTESIA.

Los animales se anestésiaron mediante inyección intraperitoneal con equitesín (6ml equitesín/Kg peso de rata).

3.2.2B. PERFUSION Y FIJACION.

1º Una vez anestésiado el animal se le practicó una toracotomía interna.

2º Se inyectó, con aguja de insulina 0,1 ml de heparina, por el ventrículo izquierdo.

3º Se introdujo una cánula (Venflón 2, 18G/ de 1,2 mm de diametro y 45 mm de longitud) unida a un sistema de goteo se introdujo por el ventrículo izquierdo

hasta la embocadura de la arteria aorta (perfusión arteria ascendente).

4° Se pasó por el sistema de goteo (instalado a una altura de 1 metro) la primera solución lavadora (100 ml de solución salina al 0,8 %), durante unos minutos, a fin de efectuar un lavado del sistema cardiovascular para eliminar elementos sanguíneos.

5° Posteriormente se pasó por el sistema de goteo la solución fijadora, (paraformaldehído al 4% con glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.1 M) sin interrumpir el flujo de perfusión. Los animales se perfundieron con 400 ml de esta solución a temperatura ambiente (Glauert, 1987).

6° Finalmente se disecaron y extrajeron cuidadosamente los siguientes órganos: corazón, cerebro, cerebelo, hígado, y riñón.

7° Se tallan los órganos y se seleccionan para:

- Microscopía óptica.
- Estudio histoenzimático.
- Microscopía electrónica.

3.2.3. ESTUDIO MACROSCOPICO E HISTOPATOLOGICO:

Se observan todos los órganos en cuanto a aspecto, consistencia y peso. Los fragmentos tallados se procesan mediante técnicas de rutina para microscopía óptica, para lo cual, se incluyeron en parafina tras fijación en formol tamponado al 10%.

Para el proceso de inclusión en parafina se utilizó un sistema automático con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166MP, Fisher).

Mediante un microtomo de rotación (Microm) se obtuvieron cortes de 5 a 7 micras.

Se realizan las técnicas histológicas e histoquímicas siguientes:

- Hematoxilina - eosina (HE).

- PAS (Periodic Acid Schiff).

- PAS Alcán.

- Tricómico de Masson.

- Perl's para hierro.

- Reticulina de Wilder para fibras de reticulina.

- Con cortes histológicos obtenidos por congelación se realizan técnicas de Sudán III para determinación de grasa en hígado. Por tratarse de técnicas de rutina, ampliamente contrastadas, no las describiremos con detalle.

3.2.4. REACCIONES HISTOENZIMOLOGICAS.-

A. Fundamento:

Varias clases de enzimas del grupo de las deshidrogenasas anaerobias se pueden investigar con métodos histoenzimológicos (Pearse, 1972; Mollering 1974; Garbach y col, 1978). Algunas de ellas realizan su actividad en presencia de coenzimas NAD^+ (nicotinamida-adenina dinucleotido) o NADP^+ (nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato), mientras que otras lo hacen con la intervención de cofactores del tipo de flavinas o de ácido lipoico.

Un grupo de estas enzimas puede revelar la actividad del Ciclo de Krebs, estando incluidas ahí la málico deshidrogenasa (NAD^- dependiente), la isocitrato deshidrogenasa (NAD^+ - y NADP^+ -dependiente) y la succinato deshidrogenasa (Flavin dependiente).

Otro grupo de enzimas puede ser investigado para revelar la actividad óxido-reductasa ligada a la cadena respiratoria, estando incluidas en este grupo las NADH y NADPH deshidrogenasas. La investigación de ambos grupos de enzimas mediante métodos histoenzimológicos puede ser utilizada para valorar la función mitocondrial.

En el sistema histoquímico el aceptor final o reactivo de captura de H^+ y electrones debe ser una sustancia que al ser reducida se transforme en un producto fácilmente visible con el microscopio. Este reactivo de captura debe cumplir los requisitos siguientes:

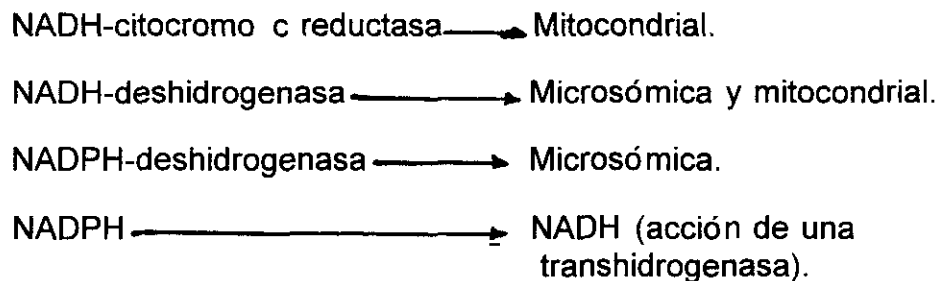
1) Poseer un valor de potencial redox apropiado para que pueda realizarse una captura fácil y rápida de los iones H^+ y electrones.

2) Ser invisible en estado oxidado y visible en estado reducido.

3) Ser muy difusible cuando esté en forma oxidada pero que precipite *in situ* al ser reducido.

Por la acción de las deshidrogenasas anaerobias, los iones H^+ y electrones procedentes del substrato son captados en primer término por la coenzima o cofactor, de tal modo que esta es reducida sin que tal reducción sea por lo general visible con el microscopio. En el medio histoquímico estos iones H^+ y electrones de la coenzima reducida son captados por un aceptor artificial (no naturales biológicamente) que al ser reducido se vuelve insoluble y precipita en forma pulverulenta coloreada y por tanto visible. También es necesario impedir que los aceptores naturales de la cadena respiratoria capten esos iones y electrones y los transporten hacia el oxígeno.

Diversas investigaciones han demostrado que las vías que intervienen en la oxidación fisiológica del NADH y del NADPH son las siguientes:

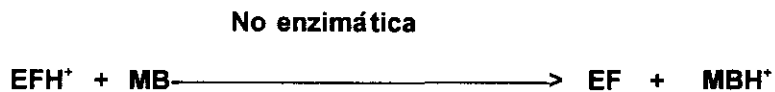
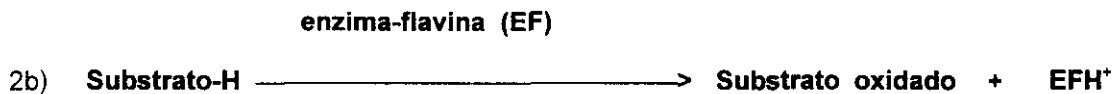
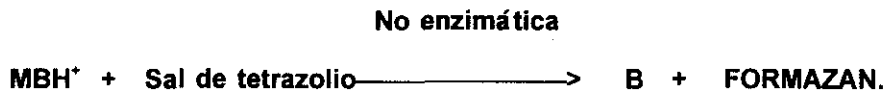
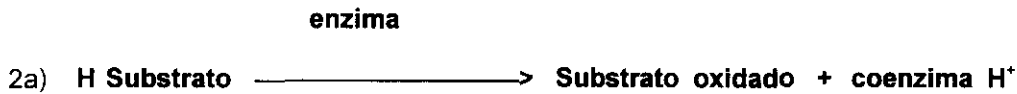
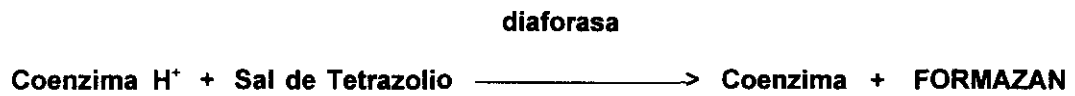
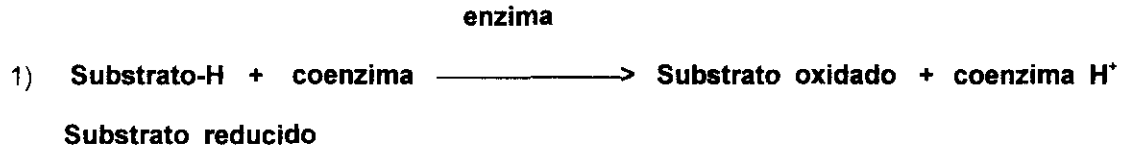


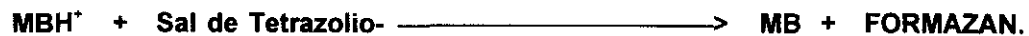
En investigaciones histoquímicas sobre mamíferos se observó la existencia de actividad NADH-tetrazolio reductasa (NADH- diaforasa) tanto en la fracción mitocondrial como en la microsómica, evidenciando que el p-cloro-mercuri-benzoato (PCMB) en concentración 2×10^{-5} M disuelto en NaOH inhibía la actividad de la enzima situada en la fracción microsómica pero no en la mitocondrial. Por otra parte, también se demostró que el cianuro potásico (KCN), en concentración 1×10^{-3} M en el medio de incubación histoquímico, inhibía la actividad de la citocromo c -óxido reductasa pero no la diaforasa, impidiendo de ese modo que en el medio histoquímico el oxígeno compita con las sales de tetrazolio para los H^+ y electrones de la coenzima reducida.

Las coenzimas NADH y NADPH pueden transferir sus iones H^+ y electrones a la sal de tetrazolio en el método histoquímico mediante alguno de los dos mecanismos siguientes.

- 1) Por acción de las diaforasas.
- 2) Por la intervención de un transportador intermediario de iones H^+ y

electrones, como "Phenazine metholsulfate", "Menadiona" y/o "Meldola Blue" (MB) (Kugler y Wrobel, 1978).



No enzimática

Enzimas flavónicas como la succinato deshidrogenasa se pueden investigar histoquímicamente utilizando aceptores intermediarios artificiales de electrones e iones H^+ , como el Meldola Blue, capaces de captar dichos electrones e iones H^+ desde la flavina reducida y transferirlos a la sal de tetrazolio en virtud de un escalonamiento de los valores de sus potenciales de óxido-reducción.

B. Metodología:

Los órganos de todos los animales: corazón, cerebro, cerebelo, riñon e hígado, se trocearon y lavaron con una solución del 30% de sacarosa en tampon fosfato 0.1M toda la noche en nevera a 4 °C. Posteriormente se obtuvieron secciones de 10 μm con un microtomo de congelación (Leitz).

Se han localizado las siguientes enzimas:

- Enzimas implicadas en procesos de oxidación del ciclo de Krebs: isocitrato, succinato y málico deshidrogenasas.

- Enzimas diaforasas que revelan actividad óxido-reductasa ligada en último término a la cadena respiratoria: NADH deshidrogenasa y NADPH deshidrogenasa.

Las secciones se incubaron con los medios histoquímicos siguientes :

A) Medios histoquímicos estandar para succinato, isocitrato y málico deshidrogenasas, que contenia 0,001 mM de Meldola blue (MB) (Pearse, 1972).

B) Medios histoquímicos estandar para determinar isocitrato y málico deshidrogenasas (Pearse, 1972) carentes de MB.

C) Medios histoquímicos estandar para determinar NADH- DH y NADPH-DH (Pearse, 1972).

D) Medios histoquímicos control estandar carentes de sustrato.

La metodología histoenzimológica presenta unas pautas comunes para todas las enzimas estudiadas. La única variación es la composición del medio de incubación en relación con la enzima a investigar.

En todos los casos las secciones histológicas fueron primero lavadas (3 veces 10 minutos) con tampón fosfato 0.1M pH 7.4, y luego incubadas, con agitación, en el medio apropiado de 15 a 30 minutos a 30 °C. Después de la incubación los cortes histológicos fueron nuevamente lavados con tampón fosfato 0.1M, pH 7.4, a 4°C, y luego con agua destilada a la misma temperatura. A continuación las secciones se montaron en porta-objetos impregnados en gelatina-cromoalumbre y se montaron en glicerina-gelatina.

Las secciones control fueron incubadas en los medios carentes de sustrato.

3.2.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los órganos estudiados por esta técnica fueron: corazón, cerebro, cerebelo, riñón, e hígado.

El procesamiento de las muestras siguió las siguientes fases:

I - FIJACION 1ª : por perfusión de los órganos con paraformaldehído al 8% y glutaraldehído al 25% en tampón fosfato 0,2M.

II - TROCEADO: de los órganos en forma cúbica realizando bloques de tejido de 1mm de lado.

III - FIJACION 2ª : los bloques obtenidos se mantienen en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1M pH 7.2 y a 4°C durante 1 hora.

Se realizan dos lavados de 30 minutos en nevera a 4°, con una solución de tampón cacodilato de sodio con sacarosa.

IV - POSTFIJACION:

1.- Solución de tetróxido de osmio en tampón acetato de veronal (solución Zetterquist) 0,2M y pH:7,4.

2.- Lavados: Se hacen dos lavados consecutivos de 15 minutos cada uno en nevera de 4 °C, con solución de Ringer.

V - DESHIDRATACION.-

Para la deshidratación de los bloques de tejido utilizamos concentraciones crecientes de alcoholes:

- 1.- Alcohol de 50°, 15 minutos en nevera.
- 2.- Alcohol de 70 ° con acetato de uranilo al 1%, una hora a 4 °C.
- 3.- Alcohol de 70 °, 15 minutos en nevera.
- 4.- Alcohol de 90 °, 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Alcohol de 100 °, dos pases de 15 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Oxido de propileno, dos pases de 20 minutos a temperatura ambiente.

VI - INCLUSION.-

Se utilizó una mezcla de resinas epoxi (araldita-epón), siguiendo las siguientes etapas:

1.- Mezcla de resinas con óxido de propileno al 50% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se procuró mantener herméticos los viales para evitar la evaporación.

2.- Se eliminó la mezcla anterior y se añadió una mezcla con la proporción final de dos partes de epón y una parte de óxido de propileno. La muestras se mantuvieron en esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3.- Tras retirar la mezcla anterior, se añadió epón puro donde se mantuvieron las muestras durante 5 horas o toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad.

VII - POLIMERIZACION:

Se preparó un soporte de gelatina y se depositó en el mismo la muestra, con ayuda de un pincel. Se cubrió con la mezcla de resina epoxi, se la identificó con un número de referencia y se polimerizó en estufa (56 ° C) durante tres días.

VIII - PREPARACION DE LOS CORTES:

1.- Se tallaron los bloques que soportan la muestra polimerizada realizando una pirámide truncada, obteniéndose una serie de cortes de control, con un ultramicrotomo (Ultracut, Reichert-Jung), de un grosor de 0,5 micras, que fueron contrastados con azul de toluidina y visualizados con un microscopio óptico para seleccionar la zona del tejido (Lewis, 1988).

2.- Se realizaron cortes ultrafinos de 50 nanómetros (nm) de las zonas seleccionadas (Reid, 1986), se recogieron en rejillas de cobre (G200) y se contrastaron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) para su observación con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000.

3.- Las preparaciones se contrastaron con una gota de citrato de plomo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron dos veces con agua destilada.

3.2.6. ESTUDIO ANALITICO DE SANGRE

6.A. ANALISIS HEMATOLOGICO:

Se han utilizado los once animales que componen el Grupo C para efectuar una analítica hematológica.

Todos los animales del grupo C.1 se anestesiaron con equitesin y se tomó sangre arterial de la aorta. Del grupo C.2 dos animales se anestesiaron con equitesín y se extrajo sangre por aorta, mientras que uno se anestesió con eter, extrayendose su sangre de la vena yugular, con fin de observar si los resultados variaban con la anestesia y via de extracción.

Para la realización de las técnicas se ha utilizado un contador hematológico automático Coulter JS. Se requiere al menos 0,1 ml de sangre total heparinizada para efectuar toda la analítica. Los resultados vienen expresados en concentraciones por mm^3 .

Los parametros estudiados han sido:

Leucocitos ($\times 10^3$).

Glóbulos rojos ($\times 10^6$).

Hemoglobina (g/dl).

Hematocrito (%).

Volumen corpuscular medio (VCM, fl= fenolitros).

Hemoglobina corpuscular media (HCM, pg= picogramos).

Plaquetas (10^3).

Volumen plaquetario medio (VPM, fl).

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

Fórmula y recuento leucocitario.

6.B. ANALISIS BIOQUIMICO:

La determinación de LDH, glucosa, GOT, GPT y CK se ha efectuado con un autoanalizador automático de bioquímica (C P A), requiriéndose suero sin diluir para llevarlas a cabo.

Lactato deshidrogenasa (LDH).-

La determinación cuantitativa *in vitro* de la actividad en suero de lactato deshidrogenasa se utilizó reactivo de Coulter LD (LDH-L). La reacción que cataliza esta enzima es:



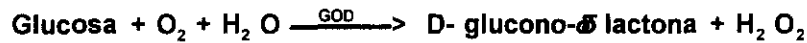
Glucosa.-

Se parte de 10 μl de suero y utiliza glucosa oxidasa de Coulter.

La reacción está basada en que la glucosa, en presencia de glucosa-oxidasa y oxígeno, se oxida a D- glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido con la peroxidasa se asocia a moléculas de 4- amino antipirina y fenol dando lugar a "quinoneimina dye" que presenta una absorbancia a 500 nm. La intensidad de color producido es directamente proporcional al contenido de

glucosa en la muestra.

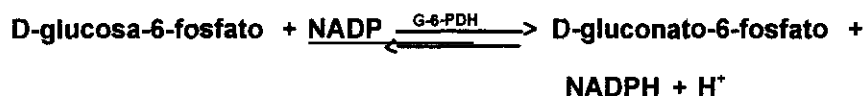
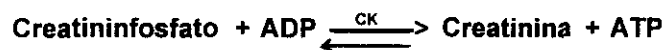
La reacción que tiene lugar es:



Creatina quinasa (CK).-

I) Con reactivo de Coulter , utilizando 40 ul de suero y un fotómetro a 340 nm.

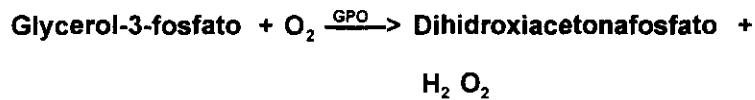
La reacción que tiene lugar es:



La velocidad de aumento del NADPH se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de CK.

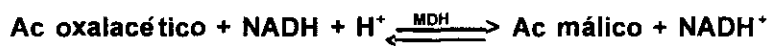
II) Con reactivo Reflotrón de Boehringer cuyo soporte son tiras de plástico a las que se añade el suero problema. El procesador da el resultado automáticamente en Unidades Internacionales (U.I).

El fundamento de la reacción es:



Glutamato- oxalacético transaminasa (GOT).-

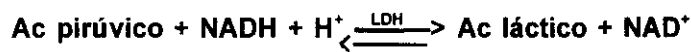
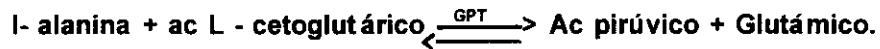
La determinación de GOT se efectua con reactivo de Coulter y requiere 0,2 ml de suero. esta actividad enzimática se mide según la siguiente reacción:



La desaparición de NADH en función del tiempo da lugar a la disminución de absorbancia que es proporcional a la actividad GOT de la muestra.

Glutamico- pirúvico transaminasa (GPT).-

La determinación de la actividad GPT se efectúa con reactivo de Coulter, utilizando 0,2 ml de suero y se basa en la siguiente reacción:



La desaparición de NADH en función del tiempo, da lugar a una disminución de absorbancia que es proporcional a la GPT de la muestra.

3.2.7. HISTOFOTOMETRIA:

El análisis cuantitativo de la absorción luminosa puede realizarse mediante equipos específicos. Con esta técnica, introducida por Caspersson en 1936, se puede determinar la intensidad de la coloración de las diversas estructuras que integran una sección histológica, sean ellas coloreadas de forma natural coloreadas o como consecuencia de una reacción histoquímica. Actualmente, los sistemas modernos permiten efectuar medidas que llegan prácticamente hasta el límite de la visibilidad, pudiendo operar sobre volúmenes de sustancia del orden de los 10^{-10} mm³ y permitiendo detectar cantidades del orden de 10^{-7} µg.

Las medidas de la absorción de la luz pueden efectuarse en el espectro

visible, en el ultravioleta o en el infrarrojo.

Para hallar el valor de la transmisión de la luz a través de una estructura histológica será necesario efectuar dos medidas del valor de la intensidad de la luz, una antes y otra después que ella ha atravesado la estructura histológica.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

I_0 = Valor de la intensidad de la luz sobre un blanco (sección histológica no coloreada).

I = Valor de la intensidad de la luz después que ella ha atravesado la estructura histológica.

T = valor de la transmisión de la luz o transmitancia.

$$d = -\log_{10} T$$

Los histofotómetros actuales transforman los valores de la transmitancia en valores de EXTINCIÓN (densidad óptica) ($D O$), que es el logaritmo decimal negativo de la transmitancia. De este modo, los errores de medida se hacen menores ya que el valor de la densidad óptica es una función exponencial inversa de la transmitancia.

El principio de todos los equipos de histofotometría consiste en hacer llegar a una célula fotoeléctrica la imagen de un pequeño campo microscópico. Un fotomultiplicador de electrones origina una corriente de algunos micro amperes que

es valorada mediante un dispositivo electrónico apropiado.

Para evitar que las medidas histofotométricas presenten "errores distribucionales", los histofotómetros realizan medidas integradoras de rastreo, utilizando siempre una luz incidente que sea la más absorbida por las moléculas que se pretendan determinar. El nitro azul de tetrazolio absorbe a una longitud de onda de 730 nm (Lippold,1982).

3.2.8. ANALISIS DE IMAGEN:

Las técnicas de análisis de imagen cada día más utilizadas en histopatología requieren un sistema apropiado de "software" y un equipo con periféricos adecuados (Kirkpatrick y Marshall, 1993) (Figura 3.2).

Figura 3.2. Equipo de análisis de imagen.



El análisis de imagen se realizó con un analizador con un procesador INTEL 80386, de 32 bit a 20 MHz, configurado sobre un "Hardware" IMCO 10 de KONTRON BILDANALYSE y el programa MIP de Microm España como "software".

Las imágenes fueron captadas con una cámara Hitachi color Kp-C503 acoplada a un microscopio Nikon y visualizadas con un objetivo adecuado para cada estudio.

El primer paso y común en el procesamiento de las muestras fue la traducción de la imagen analógica a imagen digital. Esto consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de 512 X 512 puntos o elementos denominados "pixel" (picture element), donde cada uno tiene un valor proporcional a su nivel de gris (los valores están comprendidos entre 0 y 255) cuando se transforma la imagen con color real a blanco y negro (Carbajo y col, 1990; Weels y col, 1992a y 1992b).

3.2.8A. Estudio de perfil densitométrico en el músculo cardiaco:

Se parte de los cortes histológicos de músculo cardiaco, con las reacciones histoenzimáticas, procedentes de las ratas tratadas con zidovudina y las de los controles (grupos 1, 2 y 3).

Se captó la imagen real con microscopio y objetivo 20X, transformándose a blanco y negro. La imagen se puede considerar como un objeto plano cuya intensidad puede variar de un punto a otro. Si se trata de una imagen transformada a blanco/negro se puede representar como una función continua $f(x,y)$, donde (x,y) son las coordenadas y el valor de "f" es proporcional a la intensidad luminosa (nivel

de gris) en ese punto. Todas las muestras se procesaron con el mismo contraste y luminosidad a fin de evitar errores acumulativos.

Se procedió a realizar un perfil densitométrico de las distintas muestras. El trazo se realizó de forma interactiva tomando los cortes de la misma zona y sentido. De los puntos que forman ese vector trazado resulta una gráfica que representa cada nivel de gris para cada punto.

3.2.8B. Estudio del área ocupada por las fibras nerviosas en el cerebelo con reacciones histoenzimáticas.

Al igual que en el apartado anterior se utilizaron cortes histológicos de cerebelo, con las reacciones histoenzimáticas. El procesamiento realizado consta de las siguientes etapas:

1.- Captación de la imagen:

Con una cámara Hitachi acoplada a un microscopio óptico Nikon y con objetivo 20X en color real. De forma aleatoria se comienza por captar la zona del tercio inferior de la capa molecular de los cerebelos de ratas tratadas con AZT y grupos control que contienen la reacción histoquímica.

2.- Transformación de la imagen en blanco y negro. Esta función de forma automática transforma el color real en blanco y negro (diferenciando 256 niveles de gris comprendidos entre el cero que es el negro absoluto y el blanco absoluto 255).

3.- Filtro de paso bajo:

Aplicado para desdibujar la imagen difuminando y corrigiendo errores de iluminación, reduciendo el "background". Aplica directamente una matriz de elevado rango.

4.- Resta:

Función para la substración de dos imagenes punto a punto con control de resultados, quitando a la imagen real captada la imagen resultante de aplicar el filtro de paso bajo.

5.- Realce de contornos:

Es un filtro para realzar los contornos o transiciones entre las diversas fases (niveles de gris) de las estructuras. El resultado que se obtiene es un reenfoque de la imagen, quedando la estructura mejor delimitada.

6.- Segmentación en blanco y negro:

Consiste en el fraccionamiento de la imagen seleccionando las partes que se desean cuantificar y que en este caso fueron las fibras nerviosas que contenían estas zonas.

La primera segmentación se realizó interactivamente para determinar los umbrales en las que se podían captar nitidamente todas las fibras nerviosas, y las sucesivas se efectuaron de forma automática con los valores previamente

determinados.

7.- Criba:

Esta función implica un operador morfológico para el reconocimiento rápido de estructuras en función de sus dimensiones superficiales, por lo que de forma interactiva la primera vez y de forma automática las posteriores se eliminan artefactos de la preparación, que de no ser eliminados contarían como fibras sin serlo.

8.- Medida del área:

Esta función de forma automática expresa en "pixels" el área ocupada por las fibras nerviosas respecto del área total de cada campo. Se realiza este proceso con 30 campos diferentes elegidos de forma aleatoria.

9.- Creación de un fichero con los resultados obtenidos del área ocupada por las fibras para los distintos grupos y las diferentes enzimas.

3.2.8C. Estudio densitométrico en hígado marcado histoenzimáticamente.

Se ha procedido a la realización de un "macro" con las funciones específicas para determinar la media de la densidad óptica integrada de los hepatocitos marcados con reacciones histoenzimáticas. El precesamiento realizado ha sido:

1. Tras unos pasos de enfoque, filtros, fijación de condensador y ajuste de cámara de forma interactiva, se procede a captar la imagen con una cámara color

instalada en un microscopio y con objetivo 100X (aceite de inversión).

2. Transformación de la imagen real a blanco y negro.

3. Filtro mediano con tamaño y rango probado previamente y de forma invariable para todo el proceso. Este filtro, con el que se eliminan artefactos, actúa alrededor de un punto central con matriz predefinida. La imagen se compacta pero sin desdibujarse.

4. Segmentación en blanco y negro en la que de forma interactiva se separan objetos de su entorno a partir de la selección de dos umbrales o niveles de gris (límites superior e inferior), en este caso concreto logramos dejar los citoplasmas de los hepatocitos eliminando los núcleos y espacios interportales. Así, obtendremos al final la densidad óptica que contienen los citoplasmas celulares).

5. Inversión. Se utiliza para invertir la imagen tomando como punto de inversión el centro del espectro digital (nivel 128).

6. Medida de densidad (para lo que previamente hemos utilizado un parametro de densidad). Esta función supone tomar de referencia la imagen real. La densidad óptica se mide en función de la cantidad de luz que atraviesa una muestra y viene determinada por los valores de gris que posee esa imagen. Es una variable logarítmica.

7. Fichero con el nombre de cada muestra (contiene los datos de todas las determinaciones). Los resultados se expresan en densidad óptica media, es decir, en valores numéricos que al realizarlos en un número suficiente de campos se tratan

estadísticamente para comprobar posibles diferencias significativas entre los distintos lotes de animales.

3.2.9. METODOS ESTADISTICOS.-

3.2.8A. CARACTERES MUESTRALES.

Los resultados obtenidos con el total de los 74 animales, distribuidos en diferentes grupos y lotes, fueron analizados estadísticamente mediante medidas de centralización (1) y de dispersión (2,3,4):

- (1) - Media aritmética de cada grupo de datos.
- (2) - Varianza muestral.
- (3) - Desviación típica de cada muestra.
- (4) - Error típico o estandar de la media.

3.2.9B. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.

A. Test t de Student.

Compara los resultados obtenidos entre cada dos grupos o lotes. Se ha seleccionado como mínimo un nivel de significación con un 95% de confianza en los resultados que corresponde a un valor de $p < 0,05$.

Para ello utilizamos el programa EPISTAT, al que se accede creando un fichero de datos para cada grupo y lote.

B. Comparación de medias

Utilizada para comprobar la existencia de significación estadística. Parte del cálculo de la media y desviación estandar de cada grupo o lote, para el parametro que vayamos a valorar (ejemplo el incremento de peso) . Tomando como umbral un riesgo del 5% (95% de seguridad) y suponiendo que la distribución se ajusta a la ley normal (Schwartz, 1988).

C. Análisis de la varianza.

Para estudiar la posible interacción de la concentración de AZT con relación al tiempo de ingesta del fármaco en los grupos 1 y 2 así como la relación con respecto al grupo control (grupo 3) en distintos tiempos y lotes.

Se realizó un análisis de la varianza de dos vias (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1981) para comprobar la posible existencia de asociación relacionando más de un grupo o lote de forma simultanea. Se seleccionó el nivel de confianza del 95%, lo que corresponde a un valor de $p < 0,05$.

3.2.10. APENDICE DE MATERIAL Y METODOS

3.2.10A. EQUIPO INSTRUMENTAL.

Anestesia, perfusión y fijación

Gotero con cánula (Venfón 2, 18G/ diametro 1,2mm de Viggo-Spectramed).

Agujas de diferentes tamaños y calibres.

Instrumental quirúrgico:

- Pinzas de disección de Adson con y sin dientes.
- Tijeras de disección Wescott curvas y romas, rectas y puntiagudas.
- Bisturi metálico.

Microscopía óptica:

- Procesador de tejidos. Histomatic 166MP, FISHER.
- Sistema de consolas, para preparación de bloques de parafina en cassettes TISSUE- TEK II.
- Microtomo, MICROM HEIDELBERG.
- Equipo de tinción automática mod. DRS- 60, SAKURA.
- Microscopio óptico AFX- DX, NIKON.
- Balanza de precisión, SARTORIUS- WERKE GMBH.

Reacciones histoenzimáticas:

- Microtomo de congelación , LEIZT.
- Agitador, HEIDOPH.
- pH/mV-metro, CRISON micro pH 2001.
- Baño María, SELECTA.
- Agitador, Rotabit P, SELECTA.

Microscopía electrónica:

- Cortacuchillas para microscopía electrónica Knite Marker III, LKB 2178.
- Ultramicrotomo, Ultracut E, RECHERT- JUNG.
- Microscopio electrónico de transmisión HITACHI 7000.

Hematología:

- Centrifuga, H- 900, KOKUSAN.
- Contador hematológico Coulter JS.
- Autoanalizador automático de bioquímica CPA.

Analizador de imagen:

Hardware, con unidad IMCO 10 de KONTRON BILDANALYSE.

Software, MICROM IP (MIP) de MICROM ESPAÑA.

Entrada para cámara TV estandar Multiespectral RGB con Monitor de 14",
IDEX LI yama.

TV cámara para captación de imágenes , IDEK Liyama.
Teclado tipo AT.
Impresora HEWLETT PACARRD.
Video impresora, MITSUBISHI color video copy processor.
Video printer, POLAROID.
Microscopio, NIKON.
Cámara Hitachi KP- C503, para color real.
Cámara HITACHI KP-140, para blanco y negro.

3.2.10B. PRODUCTOS QUIMICOS.

- Acetato de sodio (Merck).
- Acetato de uaranilo (Merck).
- Acido acético (Merck).
- Acido clohídrico (Merck).
- Acido fosfomolibdico (Merck).
- Acido málico (Sigma).
- Acido peryódico (Merck).
- Acido succínico (Merck).
- Acido isocítrico (Sigma).
- Alcohol (Panreac).
- Amoniaco (Merck).
- Araldita 502 (Serva).
- Azul de toluidina (Merck).
- Barbita! sódico (Merck).
- Bisulfito sódico (Merck).

- Cianuro potásico (CNK)
- Citrato de sodio (Merck).
- Cloruro cálcico (Merck).
- Cloruro sódico (Merck).
- Cloruro potásico (Merck).
- DBP (Serva).
- DDSA (Serva).
- DMP 30 (Serva).
- EPON 812 (Serva).
- Fosfato disódico (Merck).
- Fosfato monosódico (Merck).
- Formol (Merck).
- Fuchina ácida (Merck).
- Gelatina (Tipo A, porcina) (Sigma).
- Glicerina (Merck).
- Glutaraldehido (Fluka).
- Heparina (Rovi).
- Hidrato de cloral (Sigma).
- Hematoxilina (Merck).
- Hidróxido potásico (Merck).
- Hidróxido sódico (Merck).
- Leucofucsina (Merck).
- Meldola blue (Sigma).
- NAD (B- NAD sodium salt) (Sigma).
- NADH (Sigma).
- NADPD (Sigma).
- NADH-DH (Sigma).

- NADPH-DH (Sigma).
- NBT (Nitro blue tetrazolium) (Sigma).
- Nitrato de plata (Merck).
- Nitrato de plomo (Merck).
- Orange G (Merck).
- Osmio (SPI- CHEM, ANAME).
- Oxido de propileno (TAB).
- Parafina (Merck).
- Paraformaldehido (Panreac).
- p-cloro-mercury-benzoato (Sigma).
- Pentobarbital (Sigma).
- Plata amoniacal (Merck).
- Propilenglicol (Merck).
- Sacarosa (Merck).
- Sulfato de magnesio (Merck).
- Tiosulfato sódico (Merck).
- Tricrómico (Merck).
- Xilol (Merck).
- Yodato potásico (Merck).
- Zidovudina (Wellcome).

3.2.10C. PREPARACION Y COMPOSICION DE LOS PRODUCTOS

Dieta de mantenimiento de los animales:

Dieta de mantenimiento estándar, suministrada por Interfauna que contiene:

Carbohidratos..... 58,7%

| | |
|----------------------------|------|
| Celulosa..... | 4,3% |
| Proteínas..... | 17% |
| Grasa..... | 35% |
| Vitaminas y minerales..... | 5% |
| Agua..... | 12% |

ANESTESIA

Equitesín:

- a) Hidrato de cloral: 4,25 gr en 42,8 ml de propilenglicol.
- b) Pentobarbital: 0,977 gr en 11,5 ml de alcohol de 90°.
- c) Sulfato de magnesio: 2,126 gr en 25 ml de agua destilada.

Mezclar a + b + c y añadir agua destilada hasta 100 ml. Esta solución se puede mantener a temperatura ambiente, protegida de la luz, durante varios meses.

SOLUCION FIJADORA

Permite realizar técnicas de microscopía óptica, electrónica y reacciones histoenzimáticas.

Se realiza en cada sesión de trabajo.

- | | |
|--------------------------------|-------|
| a) Paraformaldehido al 8%..... | 100ml |
| b) Tampón fosfato 0,2M..... | 100ml |
| c) Glutaraldehido 25%..... | 4ml |

Preparación:

- a) 8 gr de paraformaldehido puro (Merck) se disuelven en 100 ml de agua destilada a 80 °C, agitando en caliente para su disolución. Enfriar a

temperatura ambiente y añadir unas gotas de NaOH 1N hasta que la solución quede transparente.

b) Tampón fosfato 0,2M, pH 7.4.:

1.- Solución de fosfato disódico ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2 \text{O}$) 0,2M. disolviendo 71,6 gr en un litro de agua destilada.

2.- Solución de fosfato monosódico ($\text{Na H}_2 \text{P O}_4 \cdot \text{H}_2 \text{O}$) 0,2M, disolviendo 27,6 gr en un litro de agua destilada.

Mezclar 8 volúmenes de solución 1 + 2 volúmenes de solución 2.

Solución lavadora

Solución salina al 0,8 %. Se prepara disolviendo 8 gr de Cl Na en un litro de agua destilada.

REACCIONES HISTOENZIMATICAS:

1.- Solución lavadora

Solución al 30% de sacarosa en tampón fosfato 0,1M.

2.- Medios de incubación:

a) Medio para Succinato- DH:

* Tampón fosfato 0,1 M; pH 7,4..... 10 ml

* Acido succínico (butanoedioic acid disodium salt, hexahydrate, de Sigma)..... 100 mg

* NBT (Nitro Blue Tetrazolium) (2,2'-di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'- [3,3'-dimetoxo -4,4'- diphenylene] -

| | |
|--|------------------------|
| ditetrazoliumchloride, de Sigma)..... | 4 mg |
| * Meldola blue (1mg/ml) (8-dimethylamino-2,3-benzophenoxazin, de Sigma)..... | 10 μ l |
| * Cianuro potásico (KCN)..... | 1 X 10 ⁻³ M |

Se incuba 30 minutos a 30° con agitación.

b) Medio para Isocitrato- DH:

| | |
|---|-------------------------|
| * Tampón fosfato 0,1M; pH 7,4..... | 10 ml |
| * Isocitrato- acido DL (Threo-D I -Isocitric acid, trisodium salt, de Sigma)..... | 100 mg |
| * NBT..... | 4 mg |
| * NADP..... | 12 gr |
| * Meldola blue..... | 1 μ l |
| * CNK..... | 1 X 10 ⁻³ M. |

Incubar 30 minutos a 30° con agitación.

c) Medio para Malico- DH:

| | |
|--|-------------------------|
| * Tampón fosfato 0,1M; pH 7,4..... | 10 ml |
| * Acido málico (L- Hydroxybutanedioic acid, disodium salt, de Sigma)..... | 100 mg |
| * NBT..... | 4 mg |
| * NAD (B-NAD sodium salt, de Sigma)..... | 12 mg |
| * Meldola blue (1mg / ml)..... | 5 μ l |
| * CNK..... | 1 X 10 ⁻³ M. |
| * p-cloro-mercury-benzoato..... | 2 X 10 ⁻⁵ M. |

Incubar 30 minutos a 30° con agitación.

d) Medio para NADH- DH:

| | |
|------------------------------------|----------------------|
| * Tampón fosfato 0,1M; pH 7,4..... | 10 ml |
| * NADH..... | 20 mg |
| * NBT..... | 4 mg |
| * CKN..... | 1×10^{-3} M |
| * p-cloro-mercury- benzoato..... | 2×10^{-5} M |

Incubar 15 minutos a 30° con agitación.

e) Medio para NADPH-DH:

| | |
|--|----------------------|
| * Tampón fosfato 0,1M; pH 7,4..... | 10 ml |
| * NADPH-DH (B-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form tetrazolium salt, de Sigma)..... | 12mg |
| * NBT..... | 40 mg |
| * KNC..... | 1×10^{-3} M |
| * p-cloro-mercury-benzoato..... | 2×10^{-5} M |

Incubar 15 minutos a 30° con agitación.

f) Reacción control:

| | |
|------------------------------------|-----------|
| * Tampón fosfato 0,1M; pH 7,4..... | 10 ml |
| * NAD..... | 20 mg |
| * NBT..... | 4 mg |
| * Meldola blue..... | 1 μ l |

Incubar 30 minutos a 30° con agitación.

3.- Medios de montaje

a) Glicerina- gelatina (soporte)

| | |
|----------------------------------|--------|
| Gelatina (tipo A, porcina) | 10 gr |
| Agua destilada..... | 60 ml |
| Glicerina (líquida)..... | 70 ml |
| Fenol..... | 250 mg |

Se disuelve la gelatina en el agua en un matraz cónico en un baño maría. Se añade la glicerina y el fenol y se mezcla bien. Filtrar.

b) Gelatina - cromoalumbre

| | |
|-----------------------|---------|
| Gelatina | 2,5 gr |
| Alumbre de cromo..... | 0,5 gr |
| Agua destilada..... | 500 ml. |

Se calienta 500 ml de agua destilada a 70- 80 °C, se añade la gelatina, moviendo con agitador. Posteriormente se añade el alumbre de cromo. Se disuelve. Se filtra y se utiliza a temperatura ambiente.

MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Solución lavadora:

Tampón cacodilato con sacarosa:

Tampón cacodilato de sodio :

A) Solución stock: cacodilato 0,1M.

| | |
|-----------------------------|---------|
| - Cacodilato de sodio | 10,7 gr |
| - Agua destilada..... | 500 ml |
| B) Cl H (0,1N): | |
| - Cl H..... | 8,06 ml |
| - Agua destilada..... | 99,2 ml |

Preparación:

Solución stock..... 500 ml

Solución B..... 41,5 ml

Se ajusta el PH a 7,2. esta solución se mantiene unos tres meses en nevera a 4°C. Para preparar el tampón cacodilato con sacarosa se añaden 4,5 gr de sacarosa a 100 ml del tampón.

Postfijación:**Glutaraldehido en tampón sacarosa**

Para preparar 100 ml de solución :

| | |
|-----------------------------------|-------|
| - Tampón cacodilato de sodio..... | 92 ml |
| - Glutaraldehido al 25%..... | 8 ml |

Tampón acetato de veronal 0.2M :

- Barbital sódico..... 2,94 gr

- Acetato de sodio hidratado..... 1,94 gr

Se vierte el barbital en una probeta de 100 ml, se añade agua hasta disolverlo.

Se añade el acetato sódico y agua destilada hasta 100 ml. El pH se ajusta a 7,4. Se puede guardar en nevera de 4° durante mas de un mes.

Acetato de uranilo en solución alcohólica:

1 gr de acetato de uranilo.

100 cc de alcohol de 70%.

Se disuelve y se guarda en nevera a 4°. No se debe utilizar si aparece precipitado.

Solución de osmio al 1%:

1.- 25 ml de solución de ácido ósmico al 2% en agua destilada.

2.- 10 ml tampón de acetato de veronal.

3.- 3,4 ml de solución Ringer (Zetterquist).

4.- 11 ml de H Cl 0,1N.

Se debe ajustar el pH final a 7,2 -7,4 y conservar en nevera de 4 °C.

Solución Ringer :

| | |
|-----------------------|---------|
| Cloruro cálcico..... | 0,18 gr |
| Cloruro potásico..... | 0,42 gr |
| Cloruro sódico..... | 8,04 gr |

Mezclar en 100 ml de agua destilada.

Resina araldita- epón:

1.- DDSA (endurecedor) 2-dodecenylsuccinic acid anhydride, de

Serva..... 13,8 ml

2.- EPON 812, de Serva..... 6,2 ml

3.- ARALDITA 502, de Serva..... 3,8 ml

Agitar la mezcla de los tres componentes hasta que quede transparente. Y añadir despues:

- 4.- DBP (aditivo) phthalic acid dibutyl ester, de Serva.... 0,75 ml
5.- DMP -30 (acelerador y catalizador) 2,4,6-tris (dimethylamino- methyl) phenol, de Serva..... 0,5 ml

Al añadir los últimos componentes la mezcla toma una coloración anaranjada.

Mezclar los cinco componentes durante una hora con agitador, permaneciendo en oscuridad.

Completar hasta 100 ml de agua destilada.

Citrato de plomo (Cossio):

La preparación de citrato de plomo se realizó:

- Nitrato de plomo..... 1,33 gr
- Citrato sódico 2 H₂ O..... 1,76 gr
- Agua destilada..... 30 ml

Se añadieron los tres componentes en un matraz aforado de 50 ml. Se agitó la mezcla vigorosamente. Se dejó reposar la suspensión 30 minutos, agitando varias veces en ese tiempo. añadiendo posteriormente 8 ml de Na OH 1N. Completando la solución hasta 50 ml con agua destilada. El pH final debe ser de 12. Antes de su utilización se debe filtrar.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION:

4.1.1. Observación directa de los animales:

Ningun animal presentó signos de enfermedad. El comportamiento fue similar en todos ellos y no falleció ninguno a lo largo del experimento.

4.1.2. Peso de los animales:

Los resultados correspondientes al peso de los animales, tanto al inicio como al final y el incremento respecto al tiempo, se muestra en las tablas 4 (4.1 a 4.6) y de forma gráfica en las figuras 4 (4.1 y 4.2).

Estas tablas presentan en común:

Tiempo 0 = Comienzo de ingesta del AZT.

Tiempo final = N° de días que ingieren el fármaco.

ΔP = Incremento de peso.

Los animales que han ingerido de forma continuada en el tiempo el AZT (GRUPO A) formado por los que tomaran dos concentraciones diferentes del fármaco (Grupo 1= 2 mg AZT/ml y Grupo 2= 1 mg AZT/ml) junto con el grupo control (Grupo 3) en los lotes I a V (15, 30, 60, 90 y 120 días de AZT, respectivamente) presentan un incremento en su peso que se recoge en las tablas

4.1, 4.3 y 4.5 y en la gráfica 4.1.

Como puede observarse, tras 15 días con AZT (lote I), el incremento de peso varía entre 16,3 en el grupo 1 (2 mg AZT/ml), 35,6 en el grupo 2 (1 mg AZT/ml) y 28,0 en el grupo 3 (control). Al aplicar las pruebas para determinar la significación estadística no se obtienen diferencias entre estos valores.

En el lote II (30 días) el incremento de peso de los animales que forman el grupo control aunque es menor que los de los grupos a los que se les administró AZT, pero no mostró diferencias estadísticamente significativas.

En el lote III (60 días) resulta similar el incremento de peso en los tres grupos.

El lote IV (90 días) muestra un incremento menor en el peso de los animales formado por el grupo 2 (1 mg AZT/ml) respecto a los grupos 1 (2 mg AZT/ml) y 3 (control), pero esa diferencia no tiene significación estadística.

Tras 120 días ingiriendo AZT (lote V) también aunque el incremento de peso es menor en los animales que formaron el grupo 2 en relación a los otros (grupos 1 y 3), no aparece significación estadística en esa diferencia.

Los animales que formaron el GRUPO B (45 y 75 días) que incluyen los grupos 1 (2 mg AZT/ml), 2 (1 mg AZT/ml) y 3 (control), en los tiempos señalados (lote VI= 30 días de AZT y los 15 días siguientes agua sin AZT y lote VII= 60 días con AZT y luego 15 de agua) presentan unos pesos que se reflejan en las tablas 4.2, 4.4 y 4.6 y en la gráfica 4.2. No aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y lotes.

Tabla 4.1: Peso de los animales (en gramos). Grupo 1 (2 mg AZT/ml agua). Grupo A. Lotes I a V (15, 30, 60, 90 y 120 días con AZT).

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|---------------------------|---|---------------------|------------------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 15 días AZT | 275.33 \pm 18.58 | 278.00 \pm 29.81 | 16.33 \pm 6.02 |
| 30 días AZT | 266.66 \pm 16.60 | 350.00 \pm 26.15 | 83.33 \pm 11.37 |
| 60 días AZT | 272.00 \pm 23.03 | 359.00 \pm 13.07 | 86.66 \pm 11.71 |
| 90 días AZT | 269.00 \pm 9.64 | 391.33 \pm 25.10 | 124.00 \pm 16.37 |
| 120 días AZT | 263.00 \pm 4.16 | 392.33 \pm 25.10 | 129.00 \pm 28.47 |

Tabla 4.2 : Peso de los animales (en gramos). Grupo 1 (2 mg AZT /ml agua). Grupo B. Lotes VI y VII (30días AZT + 15 agua y 60 AZT + 15 agua).

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|--------------------------------------|---|---------------------|------------------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 30 días AZT + 15 agua | 273.00 \pm 19.97 | 342.00 \pm 24.24 | 69.00 \pm 7.93 |
| 60 días AZT + 15 agua | 264.00 \pm 5.29 | 354.33 \pm 9.29 | 90.33 \pm 12.50 |

Tabla 4.3 : Peso de los animales. Grupo 2 (1 mg AZT / ml agua). Grupo A. Lotes I a V.

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 15 días AZT | 266.00 \pm 17.77 | 303.60 \pm 33.23 | 35.66 \pm 18.44 |
| 30 días AZT | 266.33 \pm 3.21 | 345.00 \pm 14.01 | 79.33 \pm 17.00 |
| 60 días AZT | 264.33 \pm 10.01 | 362.66 \pm 24.11 | 98.33 \pm 34.12 |
| 90 días AZT | 267.33 \pm 3.05 | 366.00 \pm 27.18 | 98.66 \pm 28.72 |
| 120 días AZT | 270.00 \pm 24.00 | 407.35 \pm 54.60 | 104.00 \pm 24.97 |

Tabla 4.4 : Peso de los animales. Grupo 2 (1 mg AZT/ml agua). Grupo B. Lotes VI y VII.

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 30 días AZT + 15 agua | 270.00 \pm 10.00 | 352.00 \pm 18.60 | 82.33 \pm 8.73 |
| 60 días AZT + 15 agua | 271.00 \pm 10.14 | 348.33 \pm 19.03 | 77.30 \pm 24.00 |

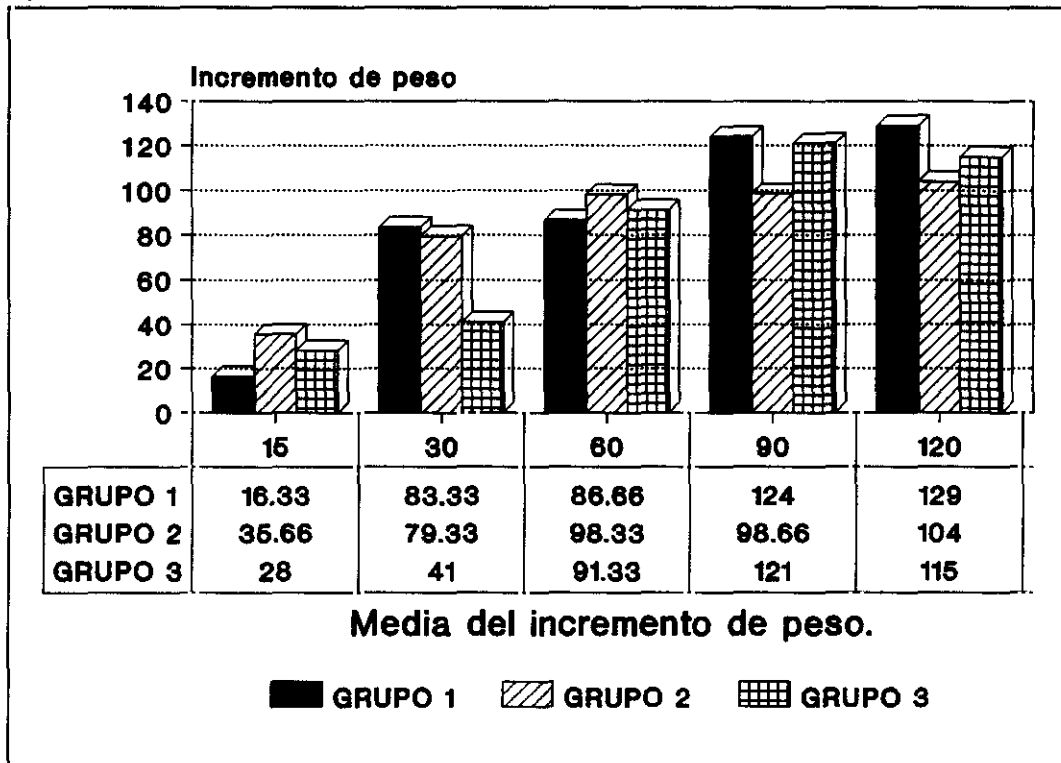
Tabla 4.5 : Peso de los animales. Grupo 3 (control, solo agua). Grupo A. Lotes I a V.

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 15 días | 272.00 \pm 7.21 | 300.66 \pm 29.77 | 28.00 \pm 5.03 |
| 30 días | 270.00 \pm 18.00 | 334.00 \pm 29.77 | 41.00 \pm 33.50 |
| 60 días | 270.00 \pm 10.00 | 361.33 \pm 3.51 | 91.33 \pm 11.93 |
| 90 días | 267.33 \pm 5.25 | 388.33 \pm 5.68 | 121.00 \pm 11.53 |
| 120 días | 266.66 \pm 11.93 | 379.33 \pm 1.15 | 115.00 \pm 16.09 |

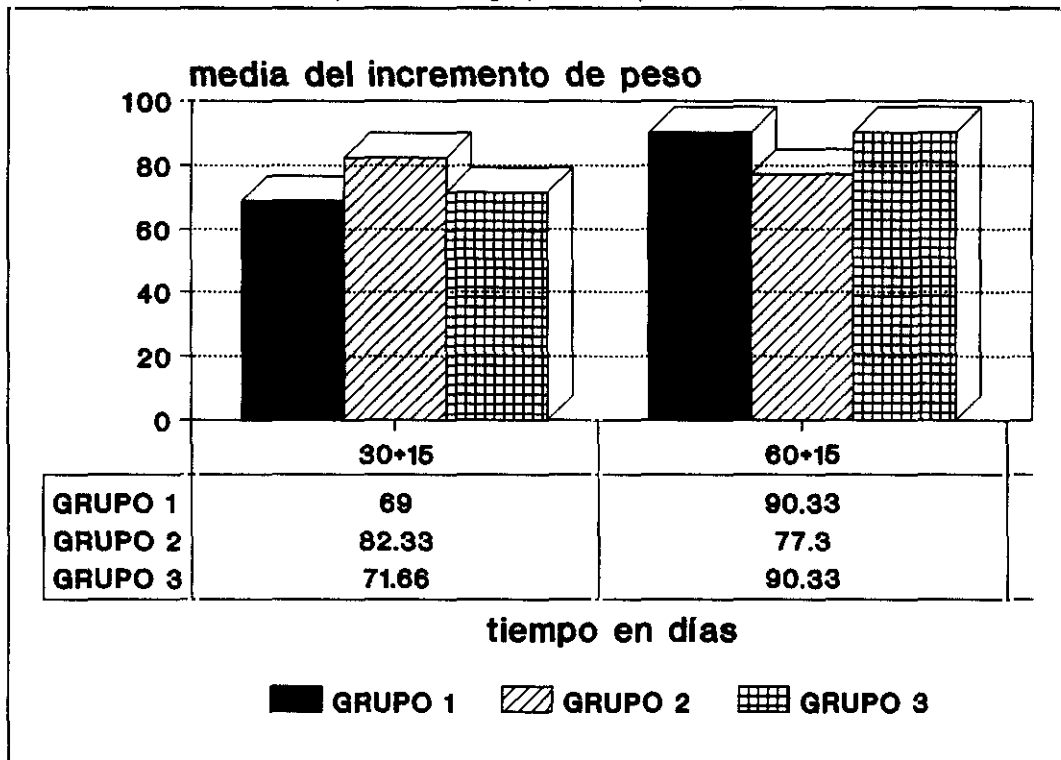
Tabla 4.6 : Peso de los animales. Grupo 3 (control, solo agua). Grupo B. Lotes VI y VII.

| TIEMPO EN DIAS | Media \pm Desviación estandar | | |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Tiempo 0 | Tiempo final | Δp |
| 45 días | 261.00 \pm 8.54 | 332.00 \pm 12.70 | 71.66 \pm 7.63 |
| 75 días | 262.33 \pm 6.80 | 352.66 \pm 13.57 | 90.33 \pm 10.55 |

Gráfica 4.1. Incremento de peso de los grupos 1 (2mg AZT/ml), grupo 2 (1mg AZT/ml), grupo 3 (control). Grupo A (15, 30, 60, 90 y 120 días).



Gráfica 4.2. Incremento de peso de los grupos 1, 2 y 3. Grupo B.



4.1.3. Consumo de bebida:

Las tablas 4.7 y 4.8 contienen los datos correspondientes a la media \pm desviación estandar del consumo de bebida (ml/día) en los grupos 1, 2 y 3 del grupo A y del B. Esto se ha representado gráficamente en las graf 4.3 y 4.4. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos y lotes.

El consumo de bebida con respecto al peso medio (ml/peso medio kg/día) se refleja en las tablas 4.9 y 4.10. respectivamente. No aparecen diferencias estadísticamente significativas, en ningun caso.

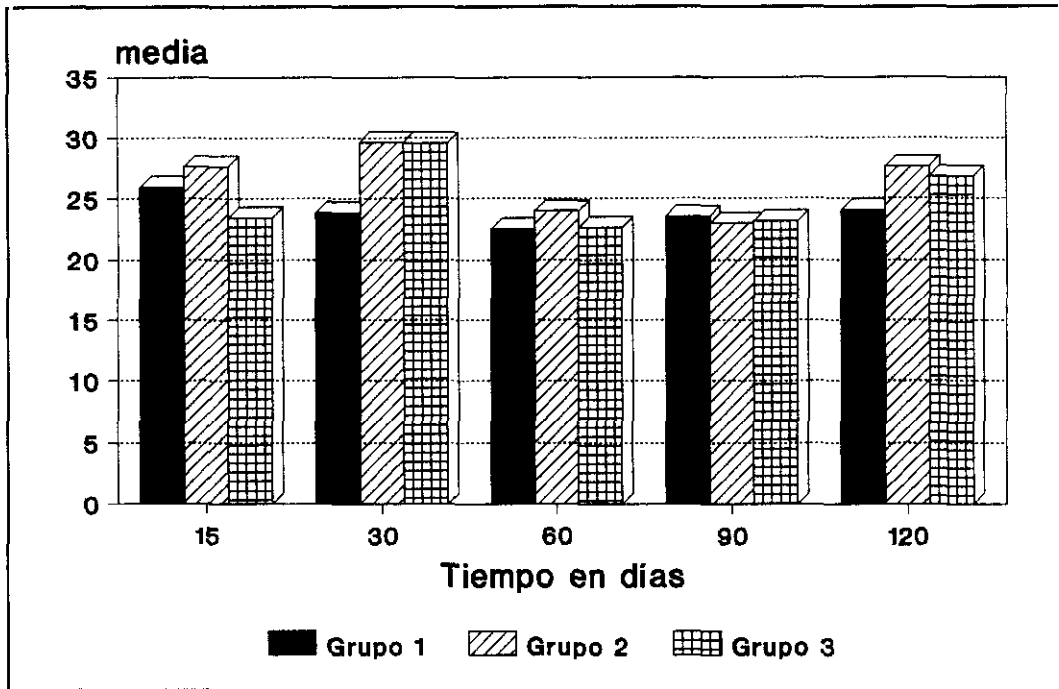
TABLA 4.7. Consumo de bebida *ad libitum* (ml/día). Grupos 1, 2 y 3. Grupo A. Lotes I a V (15, 30, 60, 90 y 120 días).

| Tiempo | GRUPO 1 (2mg AZT/ml agua) (Media + desviación estandar) | GRUPO 2 (1mg AZT/ml agua) (Media + desviación estandar) | GRUPO CONTROL (solo agua) (Media + desviación estandar) |
|-----------------|--|--|--|
| 15 días | 25.94 ± 7.89 | 27.61 ± 6.42 | 23.46 ± 1.67 |
| 30 días | 23.88 ± 8.46 | 29.61 ± 4.43 | 29.57 ± 3.57 |
| 60 días | 22.56 ± 5.37 | 24.00 ± 2.86 | 22.67 ± 1.20 |
| 90 días | 23.55 ± 1.58 | 22.99 ± 3.82 | 23.18 ± 3.51 |
| 120 días | 24.07 ± 1.68 | 27.61 ± 6.42 | 26.78 ± 2.45 |

TABLA 4.8. Consumo de bebida *ad libitum* (ml/día). Grupos 1, 2 y 3. Grupo B. Lotes VI y VII.

| Tiempo | GRUPO 1 (2mg AZT/ml agua) (Media + desviación estandar) | GRUPO 2 (1mg AZT/ml agua) (Media + desviación estandar) | GRUPO CONTROL (solo agua) (Media + desviación estandar) |
|------------------------------|--|--|--|
| 30 días + 15 días agua | 26.47 ± 3.56 | 23.60 ± 1.86 | 25.02 ± 2.76 |
| 60 días + 15 días agua | 21.88 ± 3.09 | 21.80 ± 4.46 | 20.13 ± 1.53 |

Gráfica 4.3. Consumo de bebida en ml/día. Grupos 1,2 y 3. Grupo A. Lotes I al V.



Gráfica 4.4. Consumo de bebida en ml/día. Grupos 1, 2 y 3. Grupo B. Lotes VI y VII.

* En el grupo control, los tiempos son de 45 y 75 días, ya que su bebida no contiene AZT.

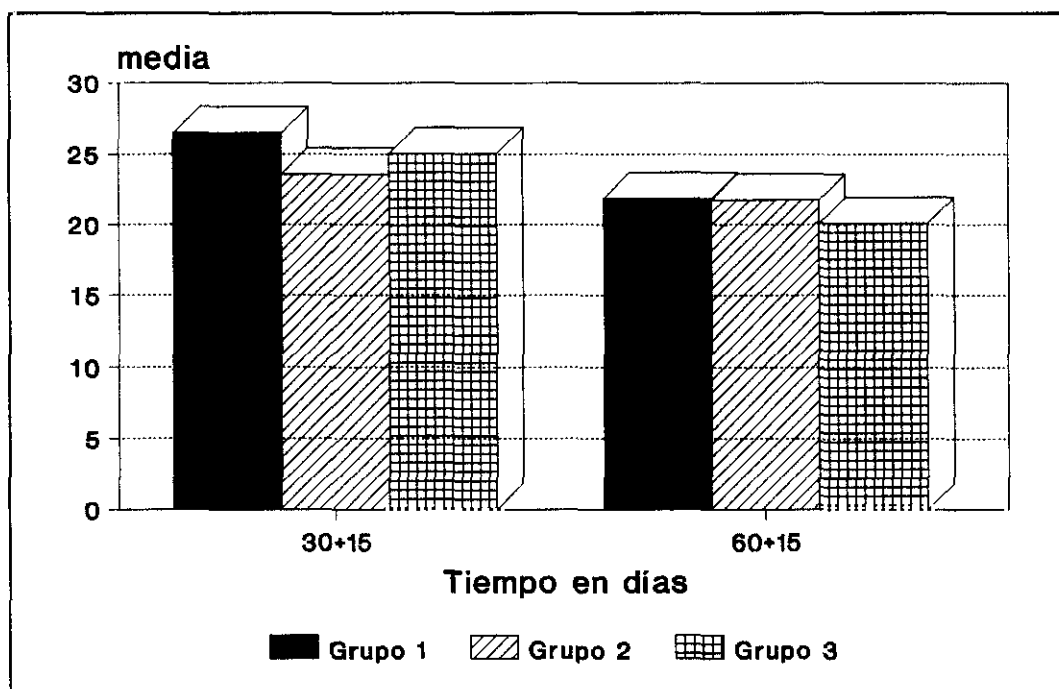


Tabla 4.9: Consumo en ml/Kg /día de los Grupos 1,2 y 3. Grupo A. Lotes I a V.

| TIEMPO | Media \pm Desviación estandar | | |
|---------------------|---|-------------------|-------------------|
| | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 |
| 15 días AZT | 68.06 \pm 13.56 | 77.86 \pm 14.05 | 75.62 \pm 15.63 |
| 30 días AZT | 73.32 \pm 14.07 | 91.64 \pm 13.79 | 91.15 \pm 14.95 |
| 60 días AZT | 70.61 \pm 26.24 | 74.35 \pm 9.37 | 71.59 \pm 4.38 |
| 90 días AZT | 77.70 \pm 10.24 | 73.15 \pm 14.91 | 75.94 \pm 11.47 |
| 120 días AZT | 78.90 \pm 8.16 | 83.90 \pm 17.61 | 86.44 \pm 7.47 |

Tabla 4.10. Consumo en ml/kg/día. Grupos 1, 2 y 3. Grupo B. Lotes VI y VII.

| TIEMPO | Media \pm Desviación estandar | | |
|-------------------------------------|---|-------------------|------------------|
| | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 |
| 15 días AZT + 15 de agua | 76.39 \pm 12.30 | 73.39 \pm 10.57 | 77.85 \pm 6.23 |
| 60 días AZT + 15 de agua | 67.70 \pm 8.65 | 67.47 \pm 10.27 | 61.79 \pm 5.30 |

4.1.4. Dosis de AZT expresada en mg AZT/Kg/día:

Calculada la dosis real de AZT que cada animal ingiere por día en relación a su peso medio y la ingestión de bebida, los datos obtenidos se recogen en la tabla 4.11 como media \pm desviación estandar de los tres animales que hay en cada lote y grupo.

Tabla 4.11: Consumo medio de la dosis de AZT, Grupos 1 y 2.
Grupo A. Calculado en mg AZT/Kg /día.

| TIEMPO | Media \pm Desviación estandar | |
|---------------------|---|-------------------|
| | GRUPO 1 | GRUPO 2 |
| 15 días AZT | 136.13 \pm 27.13 | 77.86 \pm 14.05 |
| 30 días AZT | 146.65 \pm 48.15 | 91.64 \pm 13.79 |
| 60 días AZT | 141.22 \pm 26.24 | 74.35 \pm 9.37 |
| 90 días AZT | 155.40 \pm 10.24 | 73.15 \pm 14.91 |
| 120 días AZT | 157.97 \pm 16.33 | 83.90 \pm 17.61 |

Si hacemos una comparación de los resultados obtenidos en el grupo 1 y 2 para los distintos tiempos de tratamiento se obtienen diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los tiempos estudiados. A los 15 días de tratamiento el valor de la t-student es de 2.69 con una $p < 0.05$; a los 30 días la t-student es de 1.55 con una $p < 0.1$ (estadísticamente no significativa, pero con una relativa significación biológica); a los 60 días la t-student es de 6.43, con un valor de $p < 0.05$; tras 90 días de tratamiento el valor de la t-student es de 4.36 con $p < 0.01$ y a los 120 días es de 4.36 con $p < 0.01$.

4.2. ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO:

4.2.1. Estudio macroscópico:

Realizado el estudio necrópsico completo de cada animal de experimentación se observaron detalladamente los órganos desde el punto de vista macroscópico. En el tallado de cerebro, cerebelo, corazón, riñón, hígado, pulmón y timo se apreció la morfología, tamaño, peso, coloración y consistencia normal en todos ellos.

4.2.2. Estudio microscópico:

4.2.2A. MUSCULO CARDIACO:

- Animales grupo control.-

Se observa una arquitectura conservada en todos los animales de este grupo (Figura 4.1).

- Animales tratados con AZT.-

* En el lote I (15 días de tratamiento) tanto animales del grupo 1 como los del 2 no presentan alteraciones morfológicas, teniendo un aspecto similar a los animales del grupo control (grupo 3).

* En el lote II (30 días de tratamiento), ocasionalmente y de forma aislada, entre los haces de fibras musculares aparecen células musculares que en los cortes transversales muestran una eosinofilia aumentada y uniforme con pérdida en la estructura de los campos de Cohnheim. Además poseen un núcleo hipercromático, en ocasiones hipertrófico. Este aspecto, observado con tinción de hematoxilina eosina, se pone de manifiesto con el tricrómico de Masson (Figs 4.2).

* En el lote VI (30 días de tratamiento más 15 de agua) el aspecto y arquitectura del tejido muscular es similar al de los controles.

* En el lote III (60 días de tratamiento) se observan fascículos en los cuales no aparecen los campos de Cohnheim. Esta particularidad aparece sin localizaciones específicas respecto aurícula o ventrículo, siendo minoritarias en relación a la secciones observadas (Figs 4.3, 4.4).

* El lote VII (60 días de AZT más 15 de agua) presenta una estructura del músculo estriado cardíaco de aspecto similar a grupo control.

* En los lotes VI y VII (90 y 120 días de tratamiento con AZT) con ambas concentraciones la arquitectura con técnicas de microscopía óptica no presenta alteraciones, resultando similar a los animales del grupo control.

4.2.2B. HIGADO:

- Animales del grupo control.-

Resultan en todos los casos con un aspecto perfectamente estructurado con las tinciones utilizadas para el estudio mediante microscopía óptica. Tienen ausencia total de signos de tumefacción celular. Carecen de esteatosis, resultando la técnica de Sudán III negativa (Figs 4.5, 4.6, 4.7).

- Animales tratados con AZT.-

Las características morfológicas observadas, en el hígado de los animales de experimentación utilizados, son graduales en su aparición e intensidad, guardando una estrecha relación con el tiempo de tratamiento y no encontrándose diferencias respecto a las dos dosis utilizadas para los experimentos.

El tratamiento con AZT mantiene la estructura de lóbulos y lobulillos así como el armazón conectivo, no ocurriendo lo mismo con los hepatocitos.

* En el lote I (15 días de tratamiento) el patrón morfológico observado en *todos los animales corresponde a dilatación de sinusoides con adelgazamiento de trabéculas y tumefacción del citoplasma de los hepatocitos (degeneración hidrópica o degeneración vacuolar), de distribución panlobulillar, con infiltrados linfoides focales (Figs 4.8, 4.9).*

Hay que destacar la ausencia de otras alteraciones relacionadas con

hepatotoxicidad como son colostasis, fibrosis, colangitis, eosinofilos, granulomas y esteatosis.

* En el lote II (30 días de tratamiento) los hallazgos microscópicos de este lote son superponibles, desde el punto de vista morfológico, a los observados en el lote anterior de 15 días de tratamiento, aunque con mayor intensidad de la tumefacción citoplasmática (Figs 4.10 y 4.11).

* Si observamos el lote VI (30 días de AZT y 15 de agua) los cambios observados son similares a los de 30 días pero menos intensos.

* En el lote III (60 días de tratamiento) la morfología de la reacción hepática frente al fármaco es superponible, tanto cualitativa como cuantitativamente, a la observada en el lote de 30 días de ingesta del AZT.

* En el lote VII (60 días con AZT y 15 de agua) las alteraciones morfológicas son superponibles a las de los animales con 60 días de tratamiento (lote III).

* En el lote IV (90 días con medicamento) la lesión hepática se manifiesta por esteatosis muy abundante de distribución panlobulillar (Figs 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16). La grasa, positiva por técnicas de Sudán III, se acumula en microvacuolas citoplasmáticas por todo el hepatocito (Figs 4.17, 4.18 y 4.19).

* El lote V (120 días con AZT) muestra alteraciones histopatológicas idénticas a las descritas en los animales con 90 días de tratamiento.

4.2.2C. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (cerebro y cerebelo):

En ninguno de los grupos y lotes se observan diferencias en la arquitectura del tejido con las tinciones realizadas, siendo superponibles las secciones de los diversos tratamientos a las que corresponden a animales controles (Figs 4.20, 4,21).

4.2.2D. RIÑÓN:

No observamos diferencias entre los distintos grupos y lotes de tratamiento con los controles. Con las técnicas convencionales de microscopía óptica (Figs 4.22, 4.23, 4.24, 4.25).

El resto de los órganos (pulmón, pancreas, bazo, timo e intestino) no muestran alteraciones histopatológicas a nivel de microscopía óptica.

4.3. RESULTADOS HISTOENZIMOLOGICOS:

4.3.1. Ratas tratadas con AZT:

Seguidamente se comentaran los resultados del análisis histoenzimológico para la málico deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenas, succinato deshidrogenasa, NADH y NADPH deshidrogenasas en los diferentes órganos estudiados. A este nivel no aparecen grandes diferencias entre animales que han ingerido AZT con respecto al grupo control, pero con ayudastecológicas como el análisis de imagen aportan valoraciones con que proporcionan resultados objetivos y con significasción estadística como se describirá en este capítulo posteriormente.

4.3.1A. MALICO-DH:

La actividad de esta enzima fue investigada en diversas regiones del cerebro (corteza cerebral, hipocampo, núcleo caudado-putamen, globus palidus, y cerebelo), hígado, riñón, y miocardio, como se describió en material y métodos.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (Cerebro y cerebelo):

La actividad málico-DH fue detectada, en forma de granulaciones finas azul-violeta en neuronas, células gliales y neuropilo. En el cortex cingulado la máxima actividad fue encontrada en la capa II, mientras en el córtex motor y en el somatosensorial esa máxima actividad fue observada en la capa III. En el cortex somato-sensorial fueron encontradas, además, neuronas intensamente positivas, en número escaso, en la capa VI (Fig. 4.26).

En el hipocampo, la mayor intensidad de la reacción enzimática fue observada en los estratos oriens y molecular, asociada especialmente al neuropilo que en esas capas es especialmente denso. También fue encontrada una fuerte positividad de la reacción en el pericarión de las neuronas del estrato piramidal. En cambio, dicha positividad fue observada menos intensa en el pericarión de las células del estrato granular.

En el caudado-putamen la reacción histoenzimológica fue observada especialmente intensa en el neuropilo, y mas débil en los pericariones neuronales. En el globus palidus, en cambio, esta reacción es fuertemente positiva en el pericarión de las neuronas, y mucho más débil en el neuropilo (figs 4.29, 4.30).

En el cerebelo la actividad málico-DH más intensa fue observada en la capa granular, en donde se observó una fuerte reacción histoenzimológica en las células y en el neuropilo.

En la capa molecular esta reacción fue observada especialmente marcada en los axones de las células cesto, situadas paralelamente a la capa de las células de Purkinje. El resto de la capa molecular, neuronas, células gliales y neuropilo presentaron una reacción enzimática moderada. Los citoplasmas de las células de Purkinje mostraron también inmunoreacción de intensidad moderada (Fig. 4.26).

En los núcleos cerebelosos centrales se observó reacción Málico-DH positiva en los pericariones neuronales y en las prolongaciones.

HIGADO:

En el citoplasma de los hepatocitos se detectó una reacción histoenzimológica positiva en forma de finas granulaciones, observándose la mayor intensidad de dicha reacción alrededor de las venas centrolobulillares (Fig 4.27).

RIÑON:

Se observó intensa reacción histoenzimológica de málico-DH en el citoplasma de las células de los tubos contorneados. Dicha reacción fue encontrada, en cambio, con baja intensidad en los glomérulos y en los tubos colectores (Fig. 4.28).

CORAZON:

Se observó actividad málico-DH en forma de finisímas granulaciones en las fibras musculares.

4.3.1B. ISOCITRATO-DH:

La reacción histoquímica para revelar la actividad de esta enzima fue estudiada también en diversas regiones del cerebro, en el hígado, en el riñón y en el miocardio.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:

En la corteza cerebral (cortex motor, cortex somatosensorial y cortex cingulado) fué encontrada una reacción positiva, bajo el aspecto de un fino precipitado azul- violeta, en neuronas y células gliales, tanto en el cuerpo neuronal como en las prolongaciones. La reacción más intensa fue observada en la capa II del cortex cingulado y en la III de los cortex somatosensorial y motor. En el cortex somatosensorial fueron también encontradas algunas neuronas positivas, en número escaso, en la última capa (capa VI) (Figs 4.31, 4.32).

En el hipocampo la mayor intensidad de la reacción histoenzimológica fué encontrada en las prolongaciones neuronales existentes en los estratos oriens y molecular, observandose también reacción positiva, pero de menos intensidad en los cuerpos celulares pertenecientes a estos estratos. También se observó reacción

histoquímica intensa en el pericarión de las neuronas situadas en el estrato piramidal, mientras que en las células del estrato granular la intensidad de dicha reacción se mostró más débil.

En el núcleo caudado-putamén destacó por su intensidad la reacción histoenzimológica del neuropilo, observándose también, pero más débil, dicha reacción en los cuerpos celulares. En el globus palidus, en cambio, la reacción histoquímica se ha visto más intensa en los pericariones neuronales que en el neuropilo (Fig 4.33).

En el cerebelo se evidenció actividad histoquímica de isocitrato- DH en todas las capas que constituyen este centro nervioso, viéndose finos precipitados de formazán azul-violeta en los citoplasmas celulares y en el neuropilo.

En la capa molecular la reacción histoenzimológica se encontró intensa en los axones de las células cesto, los cuales pudieron verse descender hacia la capa de las células de Purkinje, adoptando allí una disposición en paralelo, poniéndose en contacto con dichas neuronas formando los ya conocidos "cestos". También fué observada reacción positiva en el pericarión de las células de Purkinje y de todas las neuronas de la capa molecular, así como también en sus prolongaciones y en las células gliales de Bergmann. En estas células gliales de Bergmann la reacción histoquímica era especialmente intensa (Fig 4.34).

En la capa granular del cerebelo fué observada también reacción histoenzimológica positiva, tanto en las neuronas y células gliales como en el neuropilo, encontrándose especialmente intensa en formaciones presumiblemente correspondientes a los "glomérulos cerebelosos". En los núcleos cerebelosos

centrales los pericariones y las prolongaciones de las neuronas y de las células gliales mostraron reacción positiva, siendo esta más intensa en las neuronas que en las células gliales.

HIGADO:

Depósitos de formazán (indicativos de reacción histoenzimológica positiva, para isocitrato-DH) se han encontrado en el citoplasma de los hepatocitos y de las células de Kupffer. Esta reacción positiva era especialmente intensa en las áreas relacionadas con la vena centrolobulillar.

RIÑÓN:

Una débil reacción histoquímica de isocitrato-DH fué observada en los glomérulos y en los tubos colectores, mientras que dicha reacción fué encontrada especialmente intensa en las células de los tubos contorneados proximales y distales.

CORAZON:

Reacción histoenzimológica para isocitrato-DH fué encontrada en forma de finos depósitos de formazán en las fibras musculares.

4.3.1C. SUCCINATO-DH:

Cuándo en el medio de incubación histoquímico no estuvo presente succinato las reacciones histoquímicas fueron negativas. En las incubaciones con los medios

histoquímicos estandar se observaron, evidentemente, reacciones histoenzimológicas positivas.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:

En los cortex cingulado, motor y somatosensorial de la corteza cerebral se observaron depósitos de formazán, indicativos de actividad succinato-DH, en neuronas y células gliales, tanto en el pericarión como en las prolongaciones. En los cortex motor y somatosensorial la reacción más fuerte fue vista en la capa III, observándose también escasas y diversas neuronas fuertemente positivas en la capa VI de esta última zona cortical. En el cortex cingulado, en cambio, la capa II fué la que exhibió reacción más intensa (Fig 4.35).

Todas las neuronas y células gliales del hipocampo presentaron reacción histoquímica positiva para succinato-DH, variando la intensidad de la reacción en el neuropilo de los estratos oriens y molecular, y en las neuronas (pericarión) del estrato piramidal. En las neuronas del estrato granular la intensidad de la reacción era menor.

En el núcleo caudado-putamén se observó una fuerte reacción histoenzimológica en el neuropilo, y una reacción de menor intensidad en los cuerpos de las neuronas y células gliales. Por el contrario, en el globus palidus se observó reacción histoenzimológica positiva más intensa en los cuerpos neuronales que en el neuropilo (Fig 4.36).

En el cerebelo se observaron depósitos finos de formazán azul-violetas, en todas las capas de este centro nervioso. Mostraron reacción positiva los

pericariones de las células de la capa molecular, distinguiéndose las células cesto por la disposición especial de sus axones. Las células de Purkinje, tanto el pericarión como sus prolongaciones, mostraron reacción positiva, al igual que las células granos y gliales de la capa granular. En las proximidades del pericarión y dendrita principal de las neuronas de Purkinje se evidencian células gliales de Bergmann que exhiben una fuerte reacción histoquímica. También se observa intensa reacción histoenzimológica en los glomérulos de la capa granular (Fig 4.37).

Reacción histoquímica intensa para la succinato-DH se encontró en los pericariones y prolongaciones de las neuronas de los núcleos cerebelosos centrales y en las células gliales de este nivel.

HIGADO:

Todos los hepatocitos mostraron reacción positiva intensa de succinato-DH en el citoplasma de los hepatocitos centrolobulillares y en las células de kupffer. Reacción también positiva, pero en menor intensidad, se demostró en los hepatocitos restantes.

RIÑÓN:

Las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales presentan una reacción histoenzimológica intensa. En los glomérulos y en los tubos colectores la intensidad de la reacción era muy débil.

CORAZON:

Se observó reacción histoenzimológica positiva bajo el aspecto de finos granulos azul- violeta de formazán en las fibras musculares.

4.3.1D. NADH-DH (NADH-diaforasa, NADH-tetrazolio reductasa):

Presenta las mismas características de localización que la málico -DH , succinato -DH e isocitrato-DH, en todos los centros del sistema nervioso central y el resto de los tejidos estudiados (Figs 4.38,4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45).

4.3.1E. NADPH-DH:

SISEMA NERVIOSO CENTRAL:

En general la intensidad de la reacción histoenzimológica para NADPH-DH (-diaforasa, -tetrazolio reductasa) fue débil en las diversas áreas de la corteza cerebral estudiadas (corteza motora, somatosensorial y cingulada). Destaca, sin embargo, la presencia de escasas neuronas, de tipo multipolar, que exhiben una intensísima reacción tanto en el pericarión como en las prolongaciones (Fig 4.46). Neuronas con las mismas características se han encontrado en el núcleo caudado-putamen e hipocampo (Fig 4.47, 4.48). El neuropilo presentó también fuerte reacción.

En el cerebelo, se observó fuerte reacción en el neuropilo de la capa granular, y reacción débil en el resto. Las células de Purkinje mostraron muy débil actividad

histoenzimológica NADPH-DH, ocurriendo lo mismo en los núcleos cerebelosos centrales. En la capa molecular la reacción histoquímica se muestra débil, observándose precipitados muy dispersos de formazán (Fig 4.49).

HIGADO:

Se observó reacción positiva débil en los hepatocitos, de los cuales los situados en la región centrolobulillar mostraron reacción de mayor intensidad.

RIÑÓN:

Se observó reacción positiva, de mediana intensidad, en las células de los túbulos proximales y distales. Reacción más débil fue vista en los glomérulos y tubos colectores.

CORAZON:

Se observó reacción histoenzimológica positiva en las fibras miocárdicas.

4.4. ESTUDIO FOTOMETRICO:

El análisis cuantitativo, realizado con citofotómetro "scanning" Zeiss en músculo cardiaco, no reveló diferencias significativas entre los grupos de ratas que consumieron AZT en los distintos tiempos establecidos en el modelo experimental (30, 60 y 120 días). Se observaron, en cambio, diferencias en relación con los

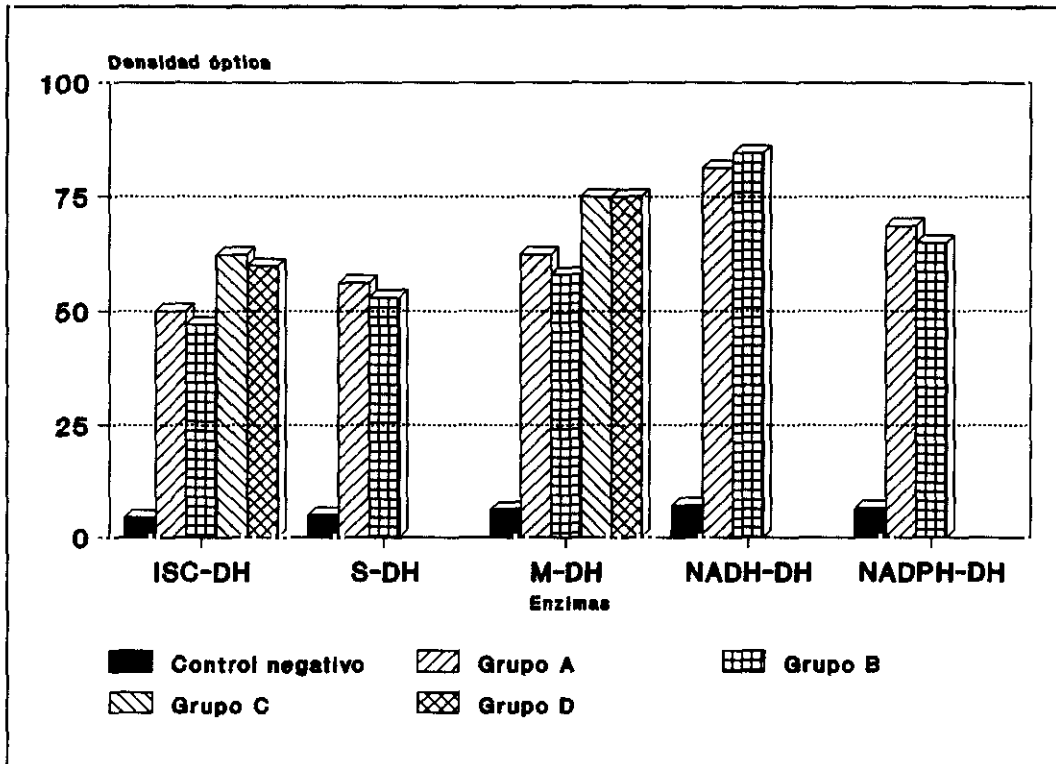
cortes control (reacciones histoenzimáticas carentes de sustrato) en los que las reacciones fueron negativas (Gráf. 4.5, 4.6, 4.7).

Las Gráficas 4.5, 4.6 y 4.7 representan las densidades ópticas (D.O.) obtenidas por citometría de músculo cardíaco con las distintas actividades histoenzimáticas y poseen en común:

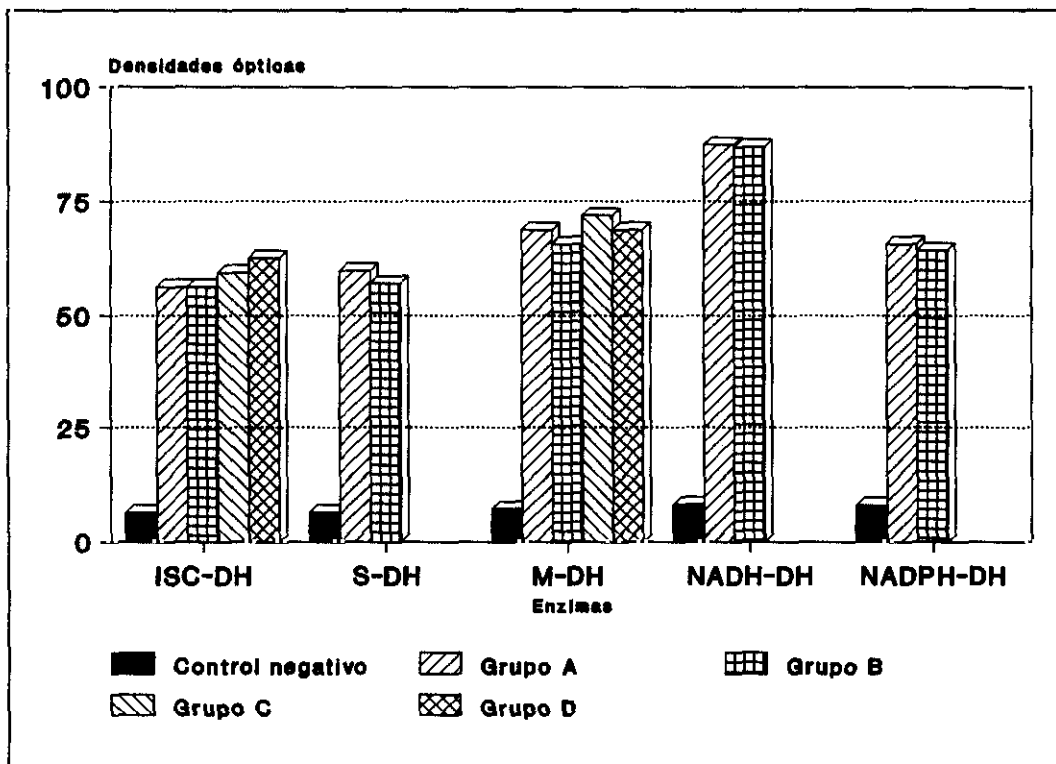
- * El control negativo es la sección con incubación carente de sustrato.
- * Grupo A: se refieren en este caso a animales del grupo control incubados con el enzima.
- * Grupo B: Animales tratados con AZT (esto varía en cada gráfica siendo en la 4.5 para 30 días de AZT, en la 4.6 para 60 días con AZT y en la 4.7 para 120 días con AZT.
- * Grupo C: Animales control incubados con meldola blue.
- * Grupo D: Ratas tratadas con AZT (como en el grupo B varía el tiempo para cada gráfica) + meldola blue.

En la gráfica 4.5, 4.6 y 4.7 se aprecian diferencia estadísticamente significativas con respecto al grupo control cuando su incubación fue carente de sustrato, con un valor de $p < 10^{-6}$, para los tres tiempos analizados. No resultando estadísticamente significativo al estudiar las distintas actividades enzimáticas (en los distintos tiempos) de ingesta de AZT de los animales respecto a los animales control.

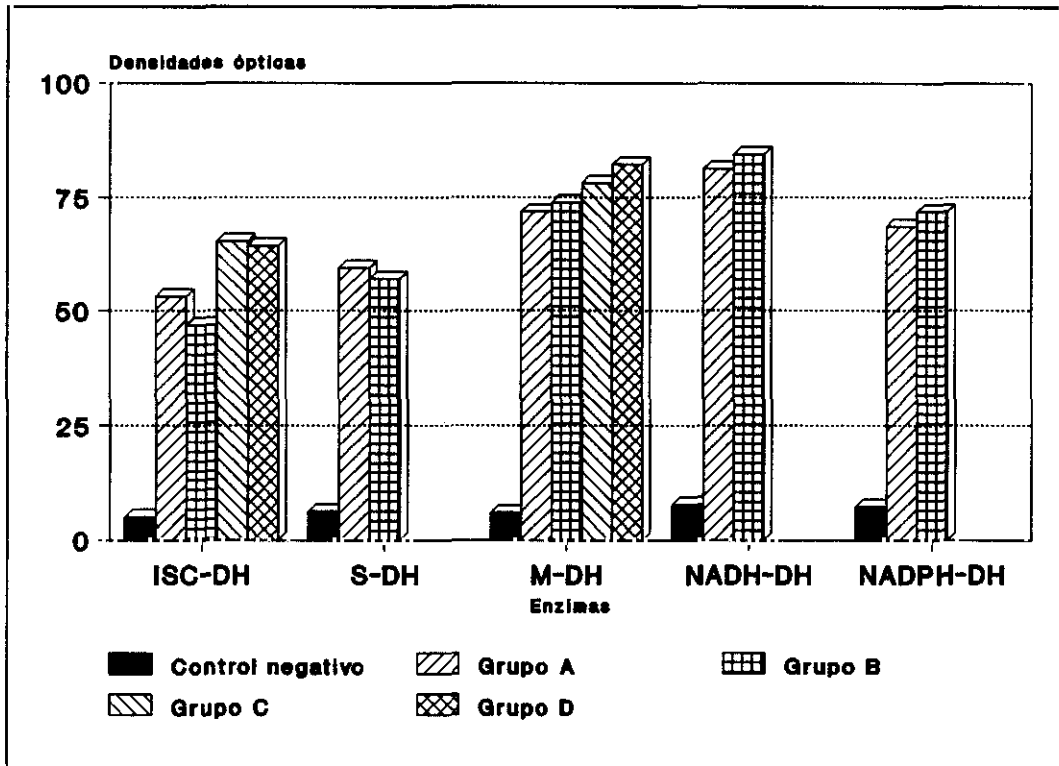
Gráfica 4.5. D.O. de animales tratados 30 días con AZT y control.



Gráfica 4.6. D.O. de animales tratados con AZT 60 días y control.



Gráfica 4.7. D.O. de animales tratados con AZT 120 días.



4.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA:

4.5.1. Estudio ultraestructural del músculo cardiaco:

Grupo control.-

La arquitectura del tejido muscular cardiaco a nivel de microscopía electrónica en los animales que forman el grupo control está inalterada (Figs 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54).

Grupos de tratamiento con AZT.

Las alteraciones morfológicas observadas no están relacionadas con respecto a aurículas ni ventrículo a nivel de morfología ultraestructural, ni existen diferencias relevantes respecto a las dos concentraciones de AZT utilizadas.

*** Lote I (15 días de AZT).-**

El tejido muscular cardiaco mantiene una ultraestructura en la que las fibras y bandas que los componen son semejantes a las del grupo control. La morfología mitocondrial es, en general, de aspecto semejante al grupo de animales control tan solo en algunos campos, y de forma aislada, se aprecian algunas mitocondrias con destrucción interna parcial de sus crestas. No se aprecian ni vacuolas intramitocondriales ni intracitoplásmicas. No se observan diferencias entre las dos concentraciones de AZT utilizadas.

Las lesiones son zonales y no generalizadas en el tejido. Las miofibrillas

conservan las estriaciones, observándose en perfecto estado de conservación las bandas I y A. la línea Z esta igualmente inalterada. Las células miocárdicas se distinguen con un núcleo alargado centralizado, y con un aparato de Golgi poco desarrollado y con posición polar respecto al núcleo. Las mitocondrias, numerosas y voluminosas como las de los animales que forman el grupo control, se localizan en los espacios interfibrilares y poseen numerosas crestas dispuestas paralelamente en algunas zonas. En otras mitocondrias se observan alteraciones en las crestas, con ligera desorganización de las mismas. El sarcolema en los extremos, por los que se une a las células próximas, tiene un aspecto escaleriforme al igual que el grupo control.

* Lote II (30 días con AZT).-

Las mitocondrias muestran un aspecto diferente a las del grupo control (estas aparecían con una matriz de alta densidad electrónica con numerosas crestas en disposición paralela y compactas). La matriz mitocondrial ha perdido parte de su densidad electrónica pudiendo observarse cierto grado de vacuolización. Las crestas presentan distintos grados de desorganización, unas tienden a formar remolinos, y en algunas se observa una destrucción parcial, en otras se observa una retracción de las crestas (Figs 4.55 y 4.56).

Aparecen signos de hiperplasia e hipertrofia por aumento del número de crestas (Fig 4.57). Hay tumefacción de las mitocondrias con edema intramitocondrial y presencia de vacuolas (Fig 4.58), con las crestas que unas veces se evidencian más y otras parece que han disminuido.

En algunas zonas adoptan una disposición en mosaico, por compresión de

unas mitocondrias con otras por tener un aumento de volumen al vacuolizarse (Figs 4.59,4.60, 4.61), a diferencia de los controles que estaban próximos pero no unidos.

Estas alteraciones no son generalizadas, pudiendo observarse en las mismas zonas tanto mitocondrias en buen estado de conservación como otras parcial o totalmente alteradas (Figs 4.62 y 4.63). Las fases para cuantificar el número de mitocondrias con alteraciones morfológicas respecto a las que poseen aspecto similar a las de los grupos control realizado con el análisis de imagen se representa en las Figs 4.65, 4.66, 4.67, 4.68 y 4.69.

Se observa en algunas zonas edema intracelular e intramitocondrial con reducción del número de crestas, pero sin vesículas mitocondriales (Fig 4.64).

Se observan fibras musculares en las que las mitocondrias están muy alteradas. Las fibras musculares contiguas aparecen con un mayor grado de compactación pero sin desorganización (Fig 4.60). Los núcleos de las células miocárdicas permanecen inalterados.

* Lote VI (30 días de AZT más 15 días de agua).-

Al quitar de la dieta el AZT comienza a regresar la lesión producida durante el tiempo de la ingestión del fármaco. Esta regresión ocurre a nivel de las miofibrillas y a nivel de las mitocondrias.

Las mitocondrias se reducen en tamaño, y aparecen fenómenos de división mitocondrial (Fig 4.70). Hay un aumento claro del número y tamaño de las crestas que adoptan diferentes disposiciones. En unas se aprecian transversales (Fig 4.71),

otras longitudinales y otras con crestas en disposición circular o "huella dactilar" (Figs 4.72, 4.73, 4.74).

Las miofibrillas van recuperándose, desapareciendo la atrofia visualizada a los 30 días de tratamiento. Aunque estos cambios son los predominantes se observa, sin embargo, en algunas áreas mitocondrias con signos de tumefacción y vacuolización (Fig 4.75).

* Lote III (60 Días de AZT).-

Las mitocondrias de las fibras cardiacas aparecen en unos casos con una matriz de alta densidad electrónica y otras presentan baja densidad. Las crestas presentan distintos aspectos, unas permanecen inalteradas y otras desestructuradas por presentar vacuolizaciones intramitocondriales así como formaciones "de tipo mielínico" (Fig 4.77). Las crestas desorganizadas a veces se observan parcialmente unidas a la membrana interna (Fig 4.76).

Algunas miofibrillas de forma aislada están atroficas, y esto contrasta con las de otras zonas donde están perfectamente estructuradas.

También resulta evidente el aumento de tamaño de las mitocondrias con 30 y 60 días de tratamiento respecto a los animales del grupo control, como se observa en la figura captada mediante análisis de imagen (Fig 4.78).

* Lote VII (60 días con AZT y posteriormente 15 días de agua).-

Las lesiones mitocondriales son muy escasas, solamente se visualizan en

algunas mitocondrias y no en todos los campos observados. Las mitocondrias que no están perfectamente estructuradas presentan alteraciones similares a las de los animales que ingirieron 60 días AZT.

* Lotes IV y V (90 y 120 con AZT).-

Se observa la presencia de acúmulo de mitocondrias en zonas determinadas (Figs 4.79), situadas junto a otras en la que aparecen las mitocondrias con la disposición alineada típica de la fibra cardiaca. Practicamente han desaparecido las alteraciones morfológicas mitocondriales tras estos tiempos de tratamiento con el medicamento. Los fenómenos de vacuolización mitocondrial son escasos y ocasionales (Fig 4.80).

La estructura de la fibra miocárdica está escasamente alterada, incluso muy bien conservada y no aparecen signos de atrofia por compresión mecánica (Fig 4.81).

Hay que destacar que los núcleos presentan pequeñas alteraciones. El núcleo del miocito de los animales control se caracteriza por poseer una cromatina más densa y periférica que los que forman los grupos de 90 y 120 días (Fig 4.82).

4.5.2. Estudio ultraestructural del hígado:

Grupo control.-

A nivel ultraestructural la arquitectura del tejido hepático no muestra

alteraciones en los animales que componen este grupo, en todas sus células y orgánulos (Figs 4.83, 4.84, 4.85).

Grupos de tratamiento con AZT.-

Tanto el grupo 1 como el grupo 2 muestran alteraciones morfológicas estructurales semejantes.

* El lote I (15 días de tratamiento con AZT). Los hepatocitos en el lobulillo hepático se observan formando trabéculas y están separados de los sinusoides por el espacio de Disse que delimita con los canalículos biliares.

Los hepatocitos presentan binucleación en numerosas células, con una disposición central del núcleo, circular u oval y sin escotaduras. Su cromatina es laxa, con uno o dos nucleolos, las mitocondrias son muy abundantes y alargadas. El retículo endoplásmico rugoso aparece constituido por numerosas cisternas apiladas entre las cuáles existe gran cantidad de mitocondrias. El retículo endoplásmico liso aparece disperso por el citoplasma. El Golgi, en general, se sitúa entre el núcleo y el canalículo biliar, y está formado por sacos con vesículas pequeñas. También se distinguen lisosomas próximos a los canilículos, y peroxisomas que son pequeños, densos y rodeados por una membrana. En algunas células aparecen cuerpos de aspecto mielínico de procedencia fosfolipídica y que están como formas libres en algunos citoplasmas (Figs 4.86, 4.87, 4.88).

En un porcentaje muy alto de campos observados aparecen hepatocitos con dilatación del retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas alteradas y matriz de baja densidad electrónica (Fig 4.89).

Algunas células endoteliales que constituyen la pared del sinusoides muestran pocas mitocondrias pero con morfología bien conservada, aunque de menor tamaño que las de los hepatocitos. Su núcleo tiene la cromatina periférica. Se distingue el espacio de Disse, con un aspecto normal, localizado entre la célula epitelial y los hepatocitos, con numerosas microvellosidades (Fig 4.87).

* Lote II (30 días de tratamiento) las mitocondrias aparecen con baja densidad electrónica y las crestas desorganizadas (Fig 4.90), siendo en muchos casos dificultosa su visualización (Fig 4.91).

Es muy abundante la presencia de vacuolas autofágicas que engloban dentro la mitocondria (Figs 4.92, 4.93, 4.94).

Aparece mayor abundancia de retículo endoplásmico liso que en el grupo control y que en el grupo tratado durante 15 días (Figs 4.91, 4.93, 4.94).

El retículo endoplásmico rugoso aparece formado por cisternas apiladas con mayor dilatación que en animales tratados 15 días (Figs 4.95, 4.96). Entremezclado con el RER aparecen algunas mitocondrias degeneradas (Figs 4.97, 4.98, 4.91). Los núcleos están inalterados.

* En el lote V (30 días con AZT + 15 días con agua) el tejido aparece con una estructura, en general, similar al grupo control. Tan solo, de forma aislada aparecen mitocondrias con alteraciones como las descritas en el grupo anterior, y están presentes en algunos hepatocitos vacuolas autofágicas.

* En el lote III (60 días de tratamiento) se observan alteraciones similares pero menos generalizadas que a los 30 días, apareciendo como pequeños focos,

por lo que se pueden visualizar zonas sin alteraciones morfológicas (Fig 4.99).

Algunas mitocondrias están alteradas. Sus crestas aparecen parcialmente desorganizadas y algo vacuolizadas, mientras que otras conservan intacta su estructura (Fig 4.100, 4.102).

En algunos hepatocitos se observa una necrosis biliar, con bilis de aspecto laminar (Fig 4.101). Los núcleos y el retículo endoplásmico rugoso (RER) están bien conservados. Existen células almacenadoras de grasa y depósitos de glucógeno repartidos por el citoplasma.

* Lote VI (60 días de tratamiento más 15 días con agua). La estructura en general es bastante semejante a la del grupo control. Tan sólo algunas mitocondrias tienen su morfología parcialmente alterada, el resto permanecen intactas. Aparecen acúmulos de bilis de aspecto mielínico dispersos por el citoplasma.

* Lotes IV y V (90 y 120 días de tratamiento). Los hepatocitos aparecen semejantes a los del grupo control en algunos campos observados, pero en muchas células hepáticas aparecen grandes cantidades de lípidos y vacuolas autofágicas que a veces tienen un tamaño aproximado al núcleo y en otros casos más pequeñas y muy numerosas (Figs 4.103, 4.104, 4.105, 4.106, 4.107, 4.109). Hecho que se observa por técnicas de microscopía óptica (Hematoxilina-eosina y sudán III). Las mitocondrias, en general, presentan un aspecto normal en la mayoría de los campos observados, apareciendo otras con inclusiones en su interior (Figs 4.110, 4.111, 4.112). Se observan también, como en los tiempos anteriores, figuras de aspecto mielínico intracitoplásmico (Fig 4.108), el RER bien desarrollado y en sus proximidades aparecen las mitocondrias. El espacio de Disse conserva su

arquitectura con numerosos microvellosidades. Los núcleos de las células también se conservan intactos (Fig 4.113).

4.5.3. Sistema nervioso central:

CEREBELO

Grupo control.-

Se observa que las células y neuropilo de ambas capas molecular y granular presentan características morfológicas normales, no habiéndose encontrado alteraciones ultraestructurales de ningún tipo (Figs 4.114, 4.115, 4.116, 4.117).

Grupos de animales tratados con AZT.-

Los animales tratados con AZT en dosis de 2mg AZT/ml de agua y 1mg AZT/ml respectivamente y sacrificadas a los distintos tiempos ya indicados, presentan las mismas características cuando se comparan entre sí estos dos grupos, al igual que sucedió en el músculo cardíaco y en el hígado.

* Lote I (15 días de tratamiento).

En la capa granular se aprecia una elevada densidad de elementos neuronales. La mayoría de las neuronas que componen esta capa son las células grano (5-8 μm de diámetro) que poseen un cuerpo globular con escasas dendritas, cortas, típicamente sinuosas y que en los glomérulos cerebelosos presentan

cavidades donde se alojan las expansiones terminales de las fibras musgosas. Sus núcleos son grandes y redondos, con acúmulos de cromatina en la perifería, con un citoplasma escaso en el que aparecen pocas mitocondrias y lisosomas, también contiene poco retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Se aprecian axones de la célula grano que sinaptan con espinas dendríticas de Purkinje, Golgi, células estrelladas y cestos. En esta misma capa se observan también las células de Golgi, de mayor tamaño que las células grano y aisladas poseen núcleos excéntricos y circulares. El citoplasma posee retículo endoplásmico con ribosomas tanto asociados como libres, aparato de Golgi, desarrollado y pequeñas mitocondrias en buen estado de conservación. El soma tiene pocas dendritas y sinaptan con las células grano mediante el plexo axónico que es muy ramificado. Se ven en esta capa axones miélinicos y amielínicos que pueden corresponder a células de Purkinje.

En la capa de las células de Purkinje se comprueba que sus células, piriformes y bipolares, adoptan una disposición lineal entre la capa molecular y granular y con un tamaño aproximado de 25 μm . El núcleo es circular con cromatina dispersa. La membrana nuclear presenta una invaginación. En el citoplasma aparece un aparato de Golgi con cisternas paralelas. El retículo endoplásmico rugoso está muy desarrollado.

La capa molecular, situada debajo de la superficie, es pobre en células y consta predominantemente de fibras amielínicas. En esta capa observamos las células estrelladas y las cestas. Las células cesto tienen una forma estrellada de 20 μm de diámetro y están situadas en el tercio inferior de la capa molecular. Su superficie es irregular y rugosa al igual que su núcleo. El citoplasma es denso y con gran número de ribosomas y mitocondrias. El axón de estas células se origina en el

cuerpo celular y se dirige hacia la superficie del cerebelo, hacia las células de Purkinje.

Las células estrelladas, se situadas en el tercio superior, son esféricas y con un escaso citoplasma y pocas sinapsis. Su núcleo circular tiene como característica una invaginación de su membrana. En esta capa observamos prolongaciones neuronales, tanto axónicas como dendríticas.

* Lote II (30 días de ingesta de medicamento). Las alteraciones ultraestructurales comienzan a resultar evidentes, observandose edema intracitoplasmático visualizado por una matriz de muy baja densidad electrónica, y mitocondrias con morfología interna alterada consistente en desorganización de crestas y disminución aparente de las mismas. Estos hechos se aprecian a nivel de todas las células que componen el cerebelo, incluso en el interior de las fibras miélicas (Figs 4.118, 4.119).

* Estos cambios son más evidentes después de 60 días de tratamiento con el fármaco (Lote III). Las mitocondrias mantiene la estructura de sus membranas pero la matriz sigue apareciendo con una baja densidad electrónica. Estas alteraciones afectan a diferentes células. (Figs 4.120, 4.121).

* A los 90 y 120 días (Lotes IV y V) los cambios son prácticamente inapreciables (Fig 4.122). En los animales de los lotes VI y VII (30 días de tratamiento y quince de agua, y 60 días con AZT más 15 de agua) las alteraciones son similares a las encontradas en los de los lotes de 30 y 60 días de tratamiento (lotes II y III).

CEREBRO

Grupo control.-

Se observan citoplasmas neuronales y gliales bien estructurados con las membranas plasmáticas perfectamente integras. Las zonas sinápticas muestran una estructura morfológicamente normal y las mitocondrias en perfecto estado de conservación tanto en lo que se refiere a sus membranas como aspecto interno incluyendo sus crestas (Fig 4.123). Esto se ha observado en todas las capas de la corteza cerebral.

Grupos tratados con AZT.-

Al igual que en los órganos antes comentados los cambios observados en las dos dosis de AZT son semejantes. También, como en el cerebelo, se observan alteraciones morfológicas ultraestructurales a partir de los 30 días de tratamiento con el fármaco. Tras 30 y 60 días de tratamiento se aprecia que las alteraciones mitocondriales están presentes en las diferentes células. Las mitocondrias, contenidas en las fibras, también presentan crestas desorganizadas y matriz con baja densidad electrónica, pero esta característica no sucede en todas las fibras sino en algunas. Lo mismo ocurre a nivel global del tejido, existen unas zonas con mas lesiones que en otras (Figs 4.124, 4.125, 4.126).

Se aprecia un edema intracitoplasmático y una alteración en sus mitocondrias consistente en desorganización y desaparición parcial de las crestas, con conservación de la membrana externa (Figs 4.127, 4.128, 4.129, 4.130, 4.131,

4.132, 4.133). Los lotes VI y VII presentan un aspecto bastante semejante al grupo control, y solamente de forma aislada aparecen alteraciones como las anteriormente descritas. Estas alteraciones disminuyen en número con el tiempo, no estando presentes prácticamente a los 90 y 120 días de tratamiento (Figs 4.134, 4.135).

4.4.4. Estudio ultraestructural del riñón:

Grupo de ratas control.-

Se observa en todas las ratas de este grupo una morfología ultraestructural bien organizada (Figs 4.136, 4.137, 4.138, 4.139).

Grupos de animales tratados con AZT.-

Como en los órganos comentados anteriormente, no se observan diferencias entre las dos dosis de AZT utilizadas, por lo que se describirá por tiempos sin tener en cuenta la concentración de AZT.

*** Lote I (15 días de tratamiento).-**

A los quince días de tratamiento en algunas células epiteliales que constituyen los túbulos del riñón aparecen mitocondrias semejantes a las del grupo control (Fig 4.140), mientras que en otras las mitocondrias aparecen con una matriz que presenta menor densidad electrónica y crestas parcialmente desorganizadas (Figs 4.141, 4.142). A nivel del glomérulo, estas alteraciones son ocasionales y

menos evidentes, destacando única y exclusivamente una ligera pérdida de la uniformidad del espesor de la membrana basal. En ésta se pierden también los caracteres de densidad electrónica y aparecen zonas de desflecamiento en la cara capilar con edema a ese nivel (Fig 4.143).

* Lote II (30 días de tratamiento).-

En las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal se observan mitocondrias con estructura normal y otras con matriz clara a los electrones y crestas mitocondriales desorganizadas (Fig 4.144).

En el Asa de Henle aumenta la presencia de retículo endoplásmico liso, observándose edema intracelular (Figs 4.145, 4.146). Las mitocondrias parecen coalescer con vesículas del retículo endoplásmico liso, quedando las crestas mitocondriales desorganizadas.

Dentro de la misma célula se distinguen claramente grupos de mitocondrias sin alteraciones morfológicas junto a otras con desestructuración de las crestas y aclaramiento de matriz (Figs 4.144, 4.148, 4.149). Otras presentan edema y dilataciones (Fig 4.146).

* Lote VI (30 días de tratamiento más 15 de agua).-

El resultado es similar a los 30 días de tratamiento con el fármaco. En el túbulo contorneado proximal aparecen mitocondrias con matriz de baja densidad electrónica y las crestas mitocondriales totalmente desorganizadas (Fig 4.147) y en algunos casos ancladas en la membrana mitocondrial interna.

* Lote III (60 días de tratamiento).-

Se mantienen las lesiones mitocondriales a lo largo de las diferentes células que constituyen la nefrona (Fig 4.150).

Las alteraciones mitocondriales en los túbulos contorneados proximales resultan más acusadas que a los 30 días. Las mitocondrias poseen una matriz de menor densidad electrónica. Las crestas aparecen con distintas morfologías (Fig 4.153) pudiendo observarse crestas que atraviesan toda la mitocondria, crestas cortas ancladas en la membrana mitocondrial interna o crestas totalmente desorganizadas que dan un aspecto granular a la mitocondrias que la contiene (Figs 4.150, 4.151).

Se observa a nivel del glomérulo una hipertrofia con multilobulación nuclear (Fig 4.153), en la que se contempla una vesiculación a expensas de retículo endoplásmico y probablemente del aparato de Golgi.

Aunque los pedicelos, en general, están bien conservados se observan áreas de fusión de los mismos (Fig 4.154) y sin embargo la membrana basal no muestra alteraciones evidentes.

El epitelio parietal de la cápsula de Bowman conserva su estructura aplanada, aunque muestra vesiculación citoplasmática.

* Lote VII (60 días con AZT + 15 días con agua).-

Aparece el tejido con características morfológicas mas similares al control.

Pero se observan algunos campos con aspecto similar al descrito tras 60 días de tratamiento.

* Lotes IV y V (90 y 120 días de tratamiento).-

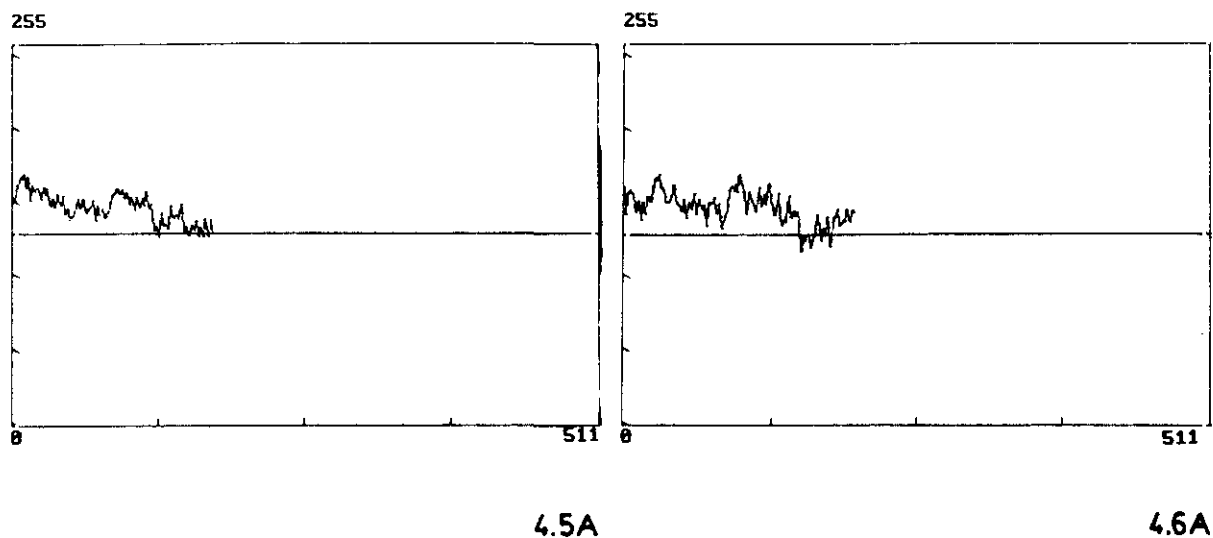
El número de crestas mitocondriales, en general, es menor que las observadas de los animales del grupo control. No aparecen aclaramientos en la matriz ni otro tipo de alteraciones ultraestructurales a nivel de estos orgánulos (Fig 4.155, 4.156).

4.6. ANALISIS DE IMAGEN APLICADO A SECCIONES CON REACCIONES HISTOENZIMATICAS:

4.6.1. Perfiles densitométricos de músculo cardiaco:

Los perfiles densitométricos, realizados mediante el análisis de imágenes en las secciones histológicas con reacciones histoenzimáticas, resultan todos similares (Gráficas 4.5 y 4.6). No se aprecian diferencias entre los distintos grupos y lotes ni en los mismos respecto al grupo control. Tampoco aparecen diferencias zonales dentro de cada sección.

Gráfica 4.5y 4.6▲Perfiles densitométrico de músculo cardiaco con reacción málico-DH, con análisis de imagen. (Fig 4.5A:30 días de tratamiento con AZT y Fig 4.6A:grupo control).



4.6.2. Estudio del área ocupada por fibras nerviosas en cerebelo por técnicas de análisis de imagen:

La investigación por medio de análisis de imagen en secciones de cerebelo demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas, en los animales tratados con AZT en relación a los controles, en el área ocupada por las fibras con actividad enzimática positiva, del tercio inferior de la capa molecular del cerebelo (Tablas 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16). (Figs 4.157, 4.158, 4.159).

Como se describe en el capítulo de material y métodos se midió con un analizador de imágenes el área ocupada por las fibras nerviosas positivas para cada determinación en el grupo 1 (2 mg AZT/ml) respecto a controles. Se hizo un archivo

con estas medidas y se procedió al análisis independiente de estos lotes mediante la t-student, para valorar la significación estadística de las diferencias a los diferentes tiempos de tratamiento. Los resultados se indican en las tablas 4.12 a 4.17, las cuales contienen en común:

* CONTROL: Grupo control.

* Todas las determinaciones se han realizado en el grupo 1 (2mg AZT/ml) y los distintos lotes I a V (que corresponden a 15, 30, 60, 90 y 120 días).

Estas tablas representan el valor hallado de p, al obtener un resultado cuantitativo del área que ocupan esas fibras por campo captado con el analizador. Así, obtenemos una serie de medidas para cada actividad enzimática (representada cada una en una tabla) y estudiamos la diferencia, si existen mediante pruebas estadísticas, entre los distintos tiempos.

Tabla 4.12. Estudio estadístico del área ocupada por fibras nerviosas, NADPH-DH positivas, en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelo de los animales.

| | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días | 120 días |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | $p < 2 \times 10^{-2}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 15 días | -- | $p < 2 \times 10^{-5}$ | $p < 2 \times 10^{-4}$ | $p < 6 \times 10^{-5}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 30 días | -- | -- | No sig | No sig | $p < 2 \times 10^{-3}$ |
| 60 días | -- | -- | -- | No sig | $p = 10^{-2}$ |
| 90 días | -- | -- | -- | -- | $p < 7 \times 10^{-2}$ |

Tabla 4.13. Estudio estadístico del área ocupada por fibras nerviosas, NADH-DH positivas, en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelo de los animales.

| | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días | 120 días |
|----------------|----------------|------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| Control | $p < 10^{-3}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 15 días | -- | $p < 3 \times 10^{-5}$ | $p < 10^{-4}$ | $p < 10^{-5}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 30 días | -- | -- | No sig | No sig | $p < 10^{-2}$ |
| 60 días | -- | -- | -- | No sig | $p < 10^{-2}$ |
| 90 días | -- | -- | -- | -- | $p = 10^{-2}$ |

Tabla 4.14. Estudio estadístico del área ocupada por fibras nerviosas, málico-DH positivas, en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelo de los animales.

| | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días | 120 días |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Control | $p < 3 \times 10^{-3}$ | $p < 10^{-5}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 15 días | -- | $p < 2 \times 10^{-4}$ | $p < 3 \times 10^{-4}$ | $p < 4 \times 10^{-5}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 30 días | -- | -- | No sig | No sig | $p < 2 \times 10^{-2}$ |
| 60 días | -- | -- | -- | No sig | $p < 10^{-2}$ |
| 90 días | -- | -- | -- | -- | $p = 10^{-2}$ |

Tabla 4.15. Estudio estadístico del área ocupada por fibras nerviosas, succinato-DH positivas, en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelo de los animales.

| | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días | 120 días |
|----------------|------------------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|
| Control | $p < 3 \times 10^{-4}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 15 días | -- | $p < 10^{-5}$ | $p < 10^{-4}$ | $p < 2 \times 10^{-4}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 30 días | -- | -- | No sig | No sig | $p < 10^{-2}$ |
| 60 días | -- | -- | -- | No sig | $p = 10^{-2}$ |
| 90 días | -- | -- | -- | -- | NO sig |

Tabla 4.16. Estudio estadístico del área ocupada por fibras nerviosas, isocitrato-DH positivas, en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelo de los animales.

| | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días | 120 días |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|
| Control | $p < 3 \times 10^{-5}$ | $p < 10^{-5}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 15 días | -- | $p < 3 \times 10^{-4}$ | $p < 2 \times 10^{-4}$ | $p < 10^{-4}$ | $p < 10^{-6}$ |
| 30 días | -- | -- | No sig | No sig | $p < 2 \times 10^{-2}$ |
| 60 días | -- | -- | -- | No sig | $p < 10^{-2}$ |
| 90 días | -- | -- | -- | -- | No sig |

4.6.3. Estudio densitométrico en sección de hígado:

La técnica de análisis de imagen muestra diferencias estadísticamente significativas en las secciones histológicas de hígado incubadas con isocitrato DH. Las determinaciones realizadas procedían de animales del grupo control, y animales tratados con AZT 30 días y 120 días del grupo 1 (2 mg AZT/ml). Partiendo de 25 campos aleatorios, en muestras tomadas al azar, se obtienen los resultados reflejados en las Tablas 4.17 y 4.18 (Figs 4.160, 4.161, 4.162, 4.163).

La tabla 4.17 describe la media de la densidad óptica \pm la desviación estandar de los 25 campos de cada grupo estudiado. Destaca la homogeneidad en los resultados, la cual viene reflejada por la pequeña desviación estandar encontrada. La tabla 4.18 contiene los resultados de la significación estadística (t-student y el valor de p) basada en los valores reflejados en la tabla anterior.

Tabla 4.17. Medias y desviaciones estandar de la media de las densidades ópticas.

| | Grupo control (1) | Grupo 30 días AZT (2) | Grupo 120 días AZT (3) |
|----------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Media | 22.80 | 24.18 | 18.03 |
| Desviación estandar | 1.75 | 2.01 | 1.20 |

Tabla 4.18. T- Student y valor de p de la media de las densidades ópticas. (1)= grupo control, (2)= grupo con 2 mg AZT/ml 30 días, (3)= 2mg AZT/ml durante 120 días.

| | (1) y (2) | (2) y (3) | (1) y (3) |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| T- student | 2.55 | 12.19 | 10.84 |
| p | p< 0.05 | p<0.001 | p<0.01 |

4.7. ESTUDIO ANALITICO DE SANGRE:

Los resultados obtenidos en el estudio hematológico tanto a nivel de parametros celulares como de actividades enzimáticas y de glucosa se muestran en las tablas 4.19 y 4.20. En los animales del grupo control, los valores hematológicos y los bioquímicos se encuentran dentro de los límites normales, tanto en los animales que fueron anestesiados con equitesín como en los dos anestesiados con eter y sangrados por yugular en lugar de por aorta. La hemoglobina tiene un valor por debajo del normal en los animales que se analizaro. A los 30 días del inicio de experimento.

La hematología de los animales tratados con AZT muestran valores más bajos de los normales respecto al hematocrito, hematies y leucocitos así como la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

En cuanto a las determinaciones bioquímicas resulta elevada en todos los casos, tanto en controles como en tratados con el AZT, el valor de Lactato

deshidrogenasa (LDH). En un animal del grupo control (30 días) el valor de la glucosa basal aparece elevado y ligeramente elevado tras 60 días de tratamiento con AZT. De los animales tratados con AZT destaca respecto a los controles una elevación respecto a los límites normales en cuanto a la determinación de la CK, que tras 60 días con AZT revierten a unos valores semejantes a los control. Tras 15 días de tratamiento con AZT aparece elevada la GOT y disminuido a los 30 días mientras que la GTP aparece elevada tras 30 días con AZT. En el resto de los valores expresados en la tabla no aparece nada destacable.

Tabla 4.19. Hematología de los animales.

| | <i>Grupo control</i> | | | <i>Grupo AZT</i> | | | | |
|-------------------|----------------------|----|-----|------------------|----|----|----|-----|
| | 15 | 30 | +30 | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 |
| ADE | N | N | -- | N | N | N | N | N |
| CHCM | N | N | N | N | NB | N | N | N |
| Leuc | N | N | N | N | B | N | N | NE |
| Hematocrit | N | N | N | N | B | N | N | N |
| Hb | N | NB | N | N | N | N | N | N |
| Hematies | B | N | N | N | NB | N | N | N |
| Linfocitos | N | N | N | N | -- | N | N | N |
| Monocitos | N | N | N | N | -- | N | N | N |
| Segmentado | N | N | N | N | -- | N | N | N |
| Eosinófilo | N | N | N | N | -- | N | N | N |
| VCM | N | N | N | N | N | N | N | N |
| HCM | N | N | N | N | N | N | N | N |

Grupo AZT: 2mg AZT/ml.

Grupo control: agua de bebida sin medicamento.

N = Valores normales.

NB = Valores normales bajos (10% debajo del valor normal).

NE = Valores normales elevados (umbral 10% superior a normales).

E = Valores elevados (+ del 10% de los valores normales).

B = Valores bajos (Umbral 10% mas bajos de los valores normales).

-- = No se pudo relizar.

15,30, 60, 90 y 120 = Días.

Tabla 4.20. Bioquímica de los animales.

| | Grupo control | | | Grupo AZT | | | | |
|-------------|----------------------|-----|------|------------------|-----|-----|-----|------|
| | 15D | 30D | +30D | 15D | 30D | 60D | 90D | 120D |
| GOT | N | N | N | E | B | N | N | N |
| GPT | N | N | N | N | E | N | N | N |
| LDH | E | E | -- | E | E | E | E | E |
| CK | N | N | N | E | E | N | N | N |
| Gluc | N | E | N | N | N | NE | N | N |

Grupo AZT: 2mg AZT/ml.

Grupo control: Solamente agua de bebida.

N = Valores normales.

E = Valores elevados.

NE = Elevados muy ligeramente.

D = Dias.

-- = No se realizó la prueba.

Fig 4.1. Corte semifino longitudinal de músculo cardíaco de animal del grupo control. Tinción azul de toluidina. N= Núcleos, CE= Célula endotelial (X 2.000).

Fig 4.2. Microfotografía de un corte transversal de músculo cardíaco de animales que han ingerido AZT durante 30 días. Tinción hematoxilina eosina. Se observa pérdida de las estructuras de los campos de Conheim en algunas fibras. Mio= Miofibrillas, N= Núcleo (X 800).

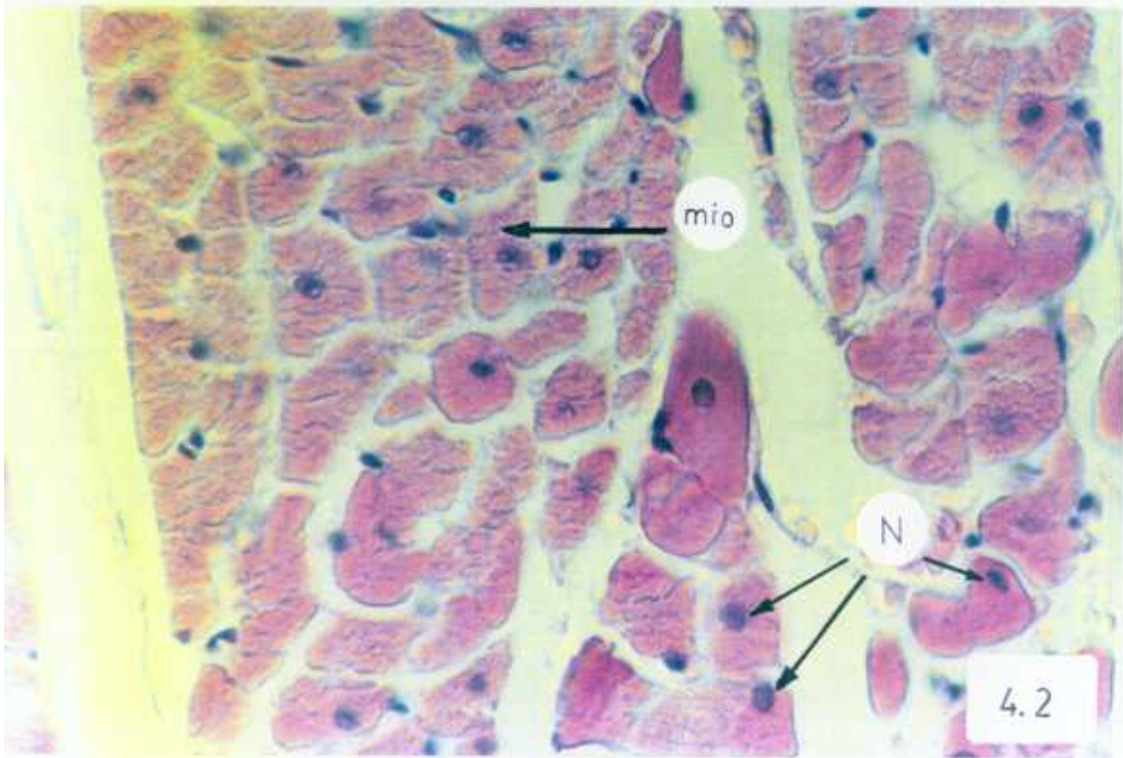
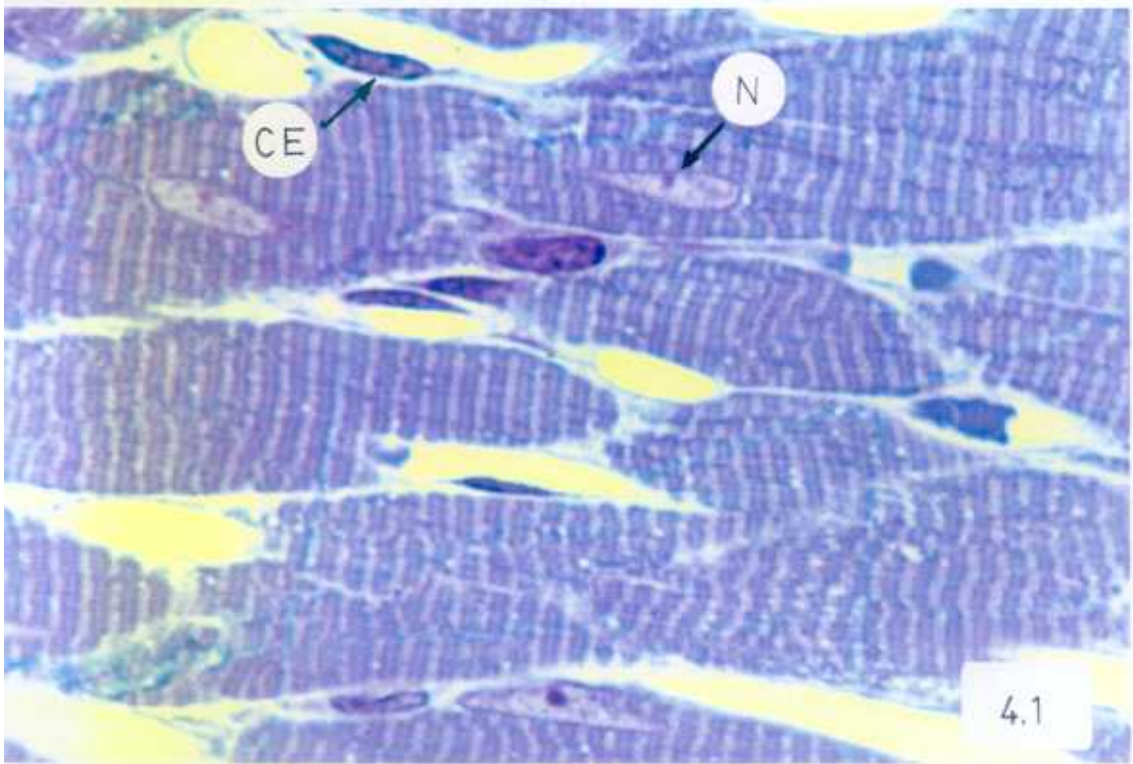
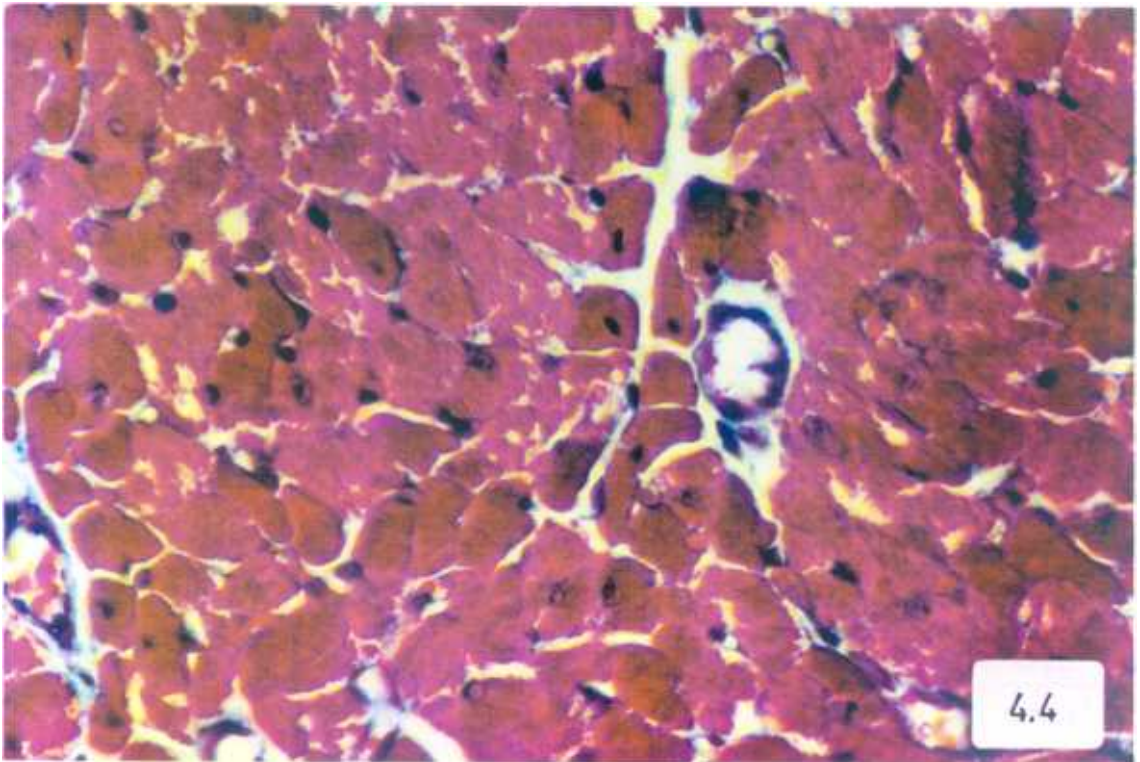
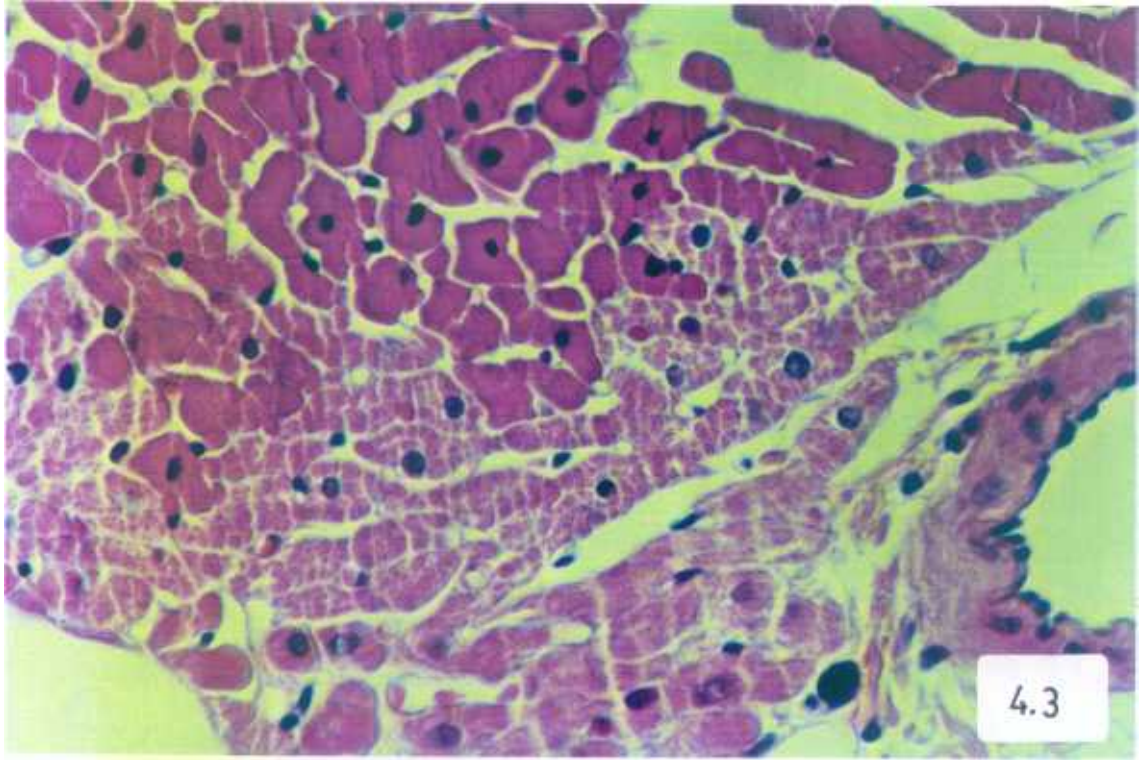
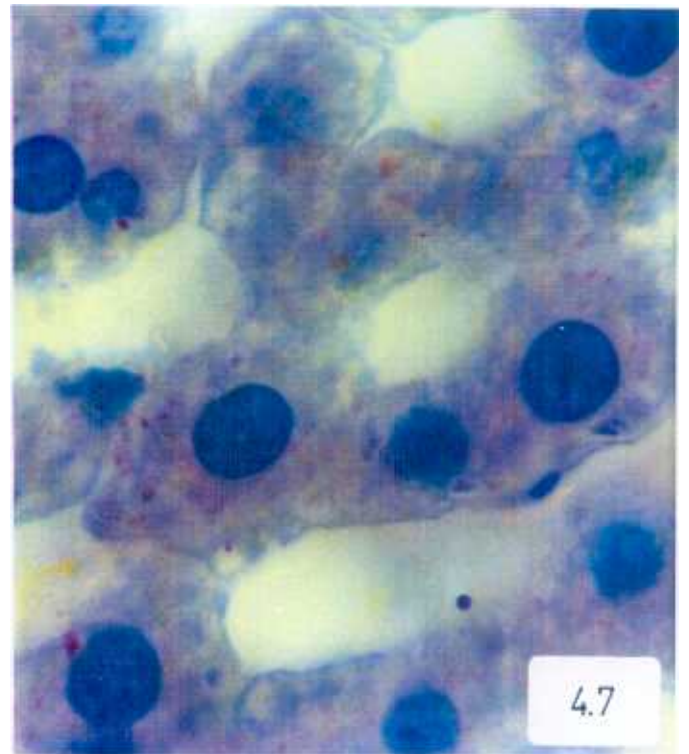
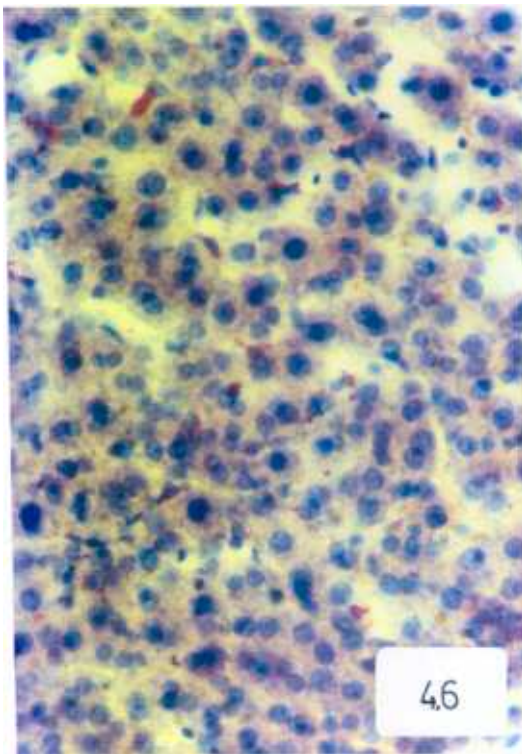
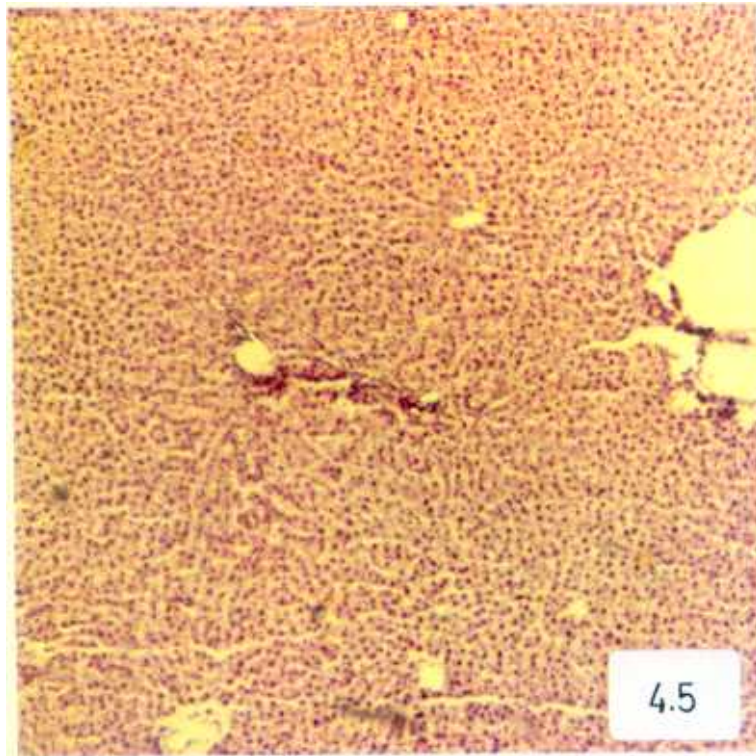


Fig 4.3. Microfotografía en la que aparecen fascículos en los que no se aprecian campos de Cohnheim. Tinción hematoxilina eosina (X 800).

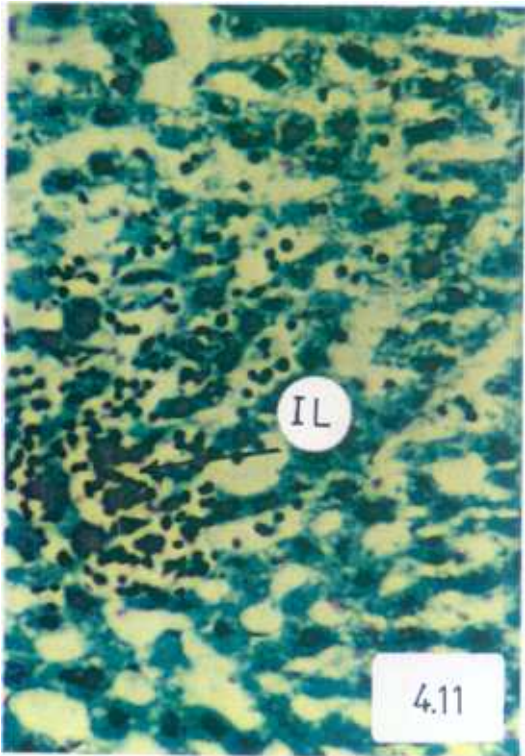
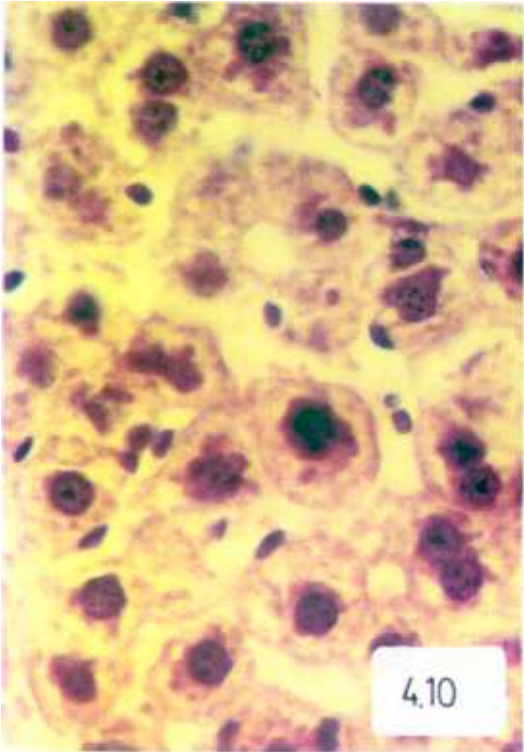
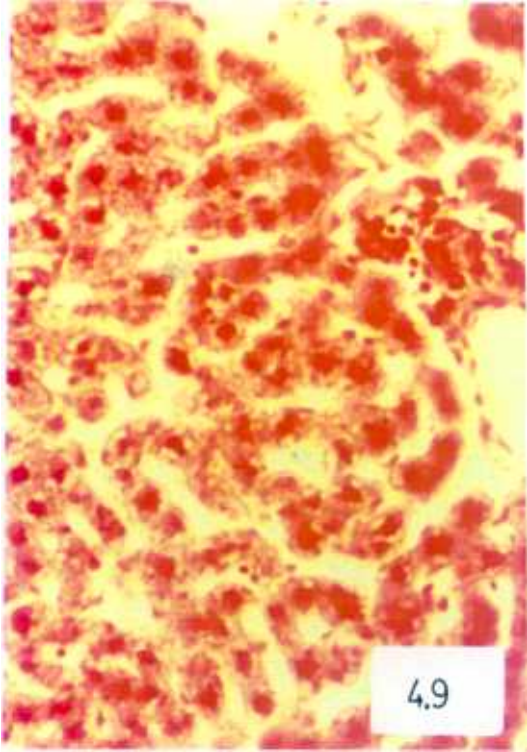
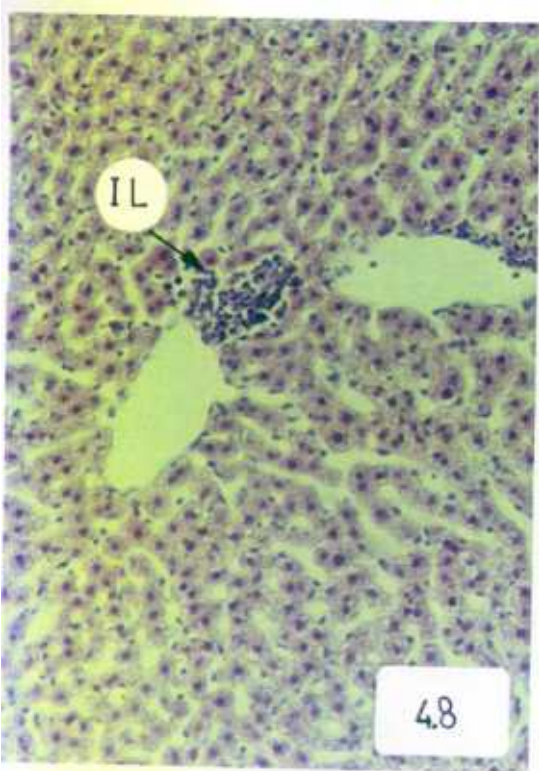
Fig 4.4. Tinción Tricrómico de Masson de fibras musculares de animales tratados con AZT 60 días. Pérdida de la estructura de los campos de Cohnheim en algunos fascículos, junto a otros que presentan aspecto morfológicamente inalterado (X 800).



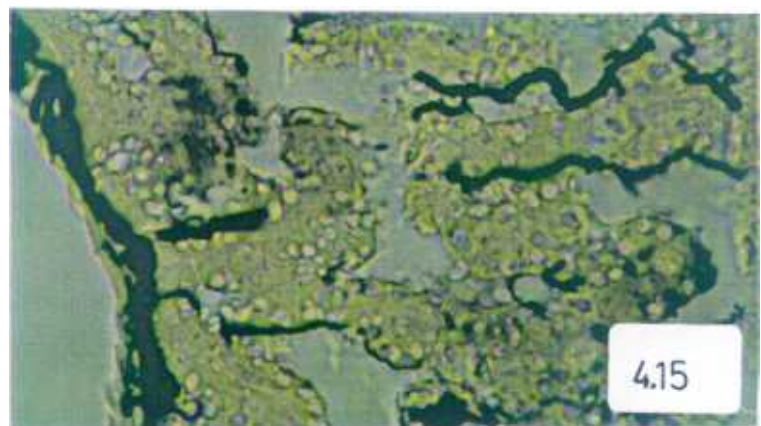
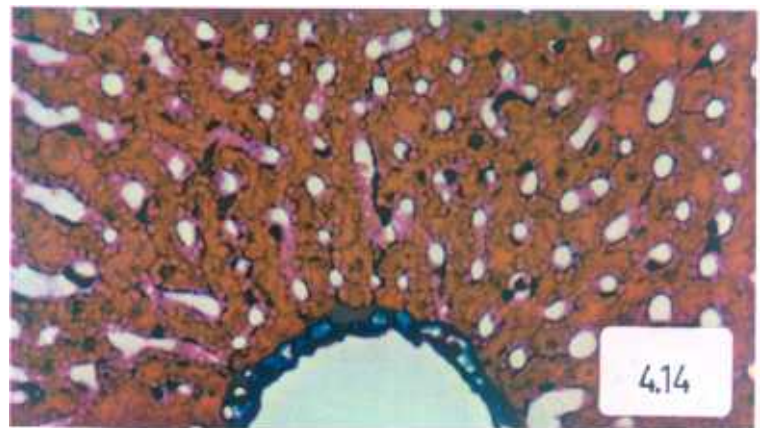
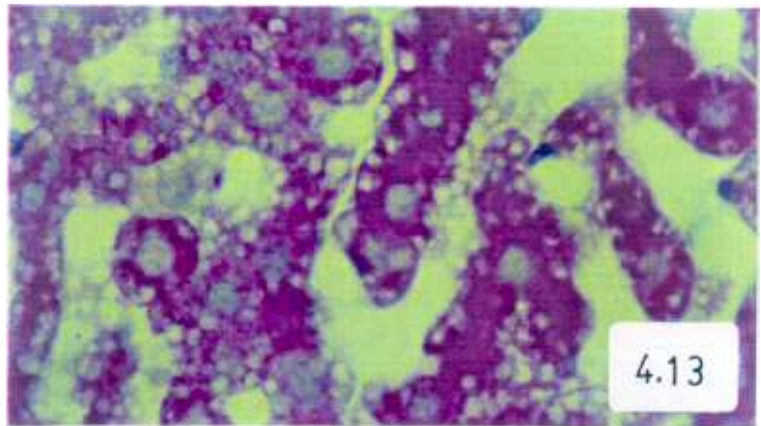
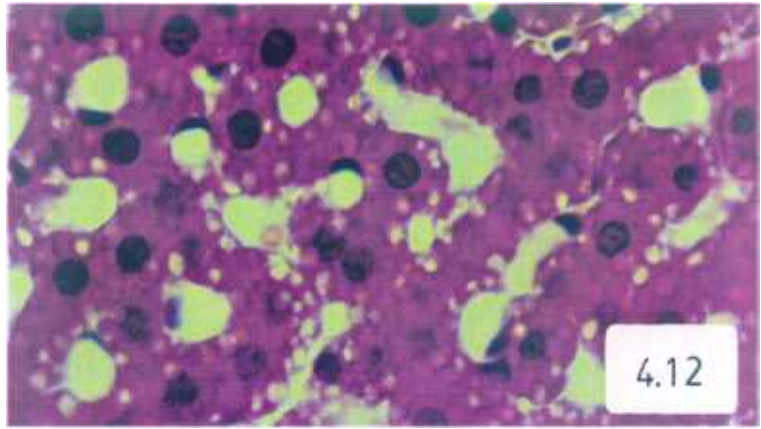
- Fig 4.5.** Sección de hígado de rata (grupo control). Tinción hematoxilina eosina (X 80).
- Fig 4.6.** Hígado con tinción Sudan III y hematoxilina. En la que se observa reacción negativa para la grasa (X 200).
- Fig 4.7.** Detalle de un hepatocito con tinción Sudán III y hematoxilina. En la que se observa tinción negativa (X 2000).



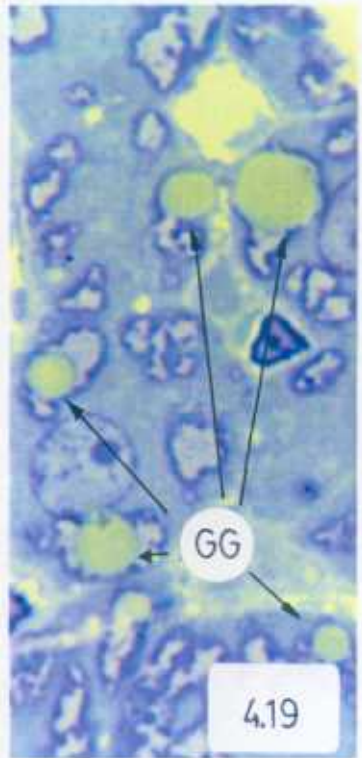
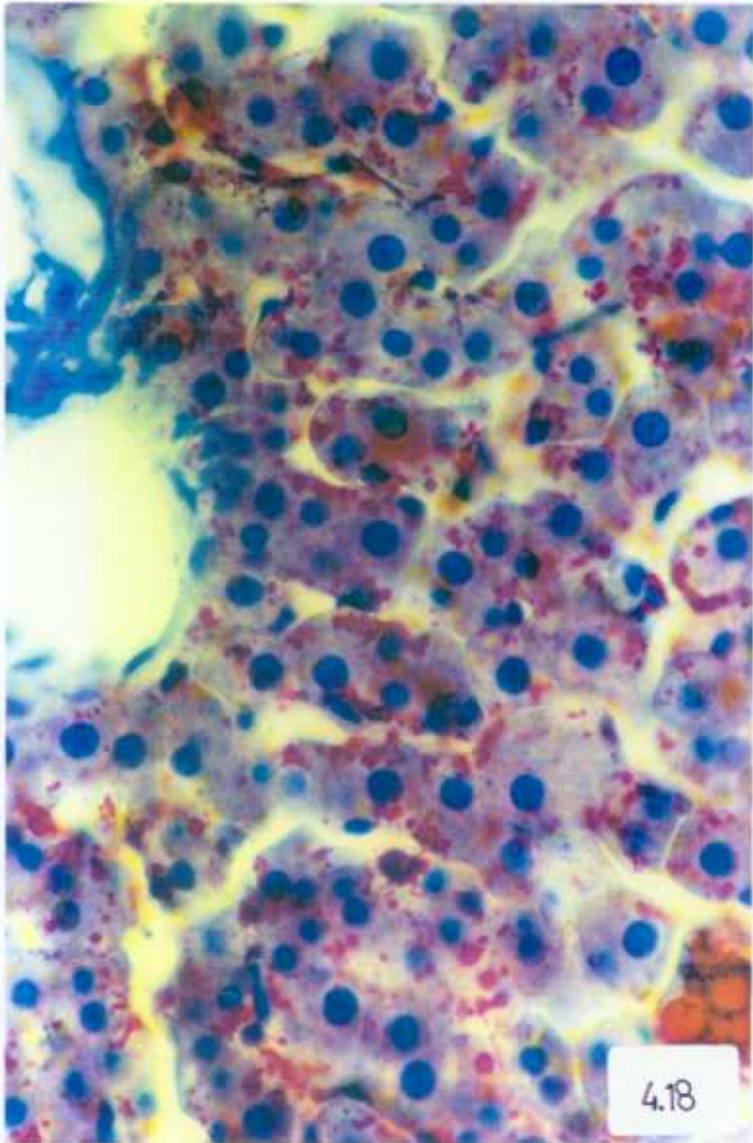
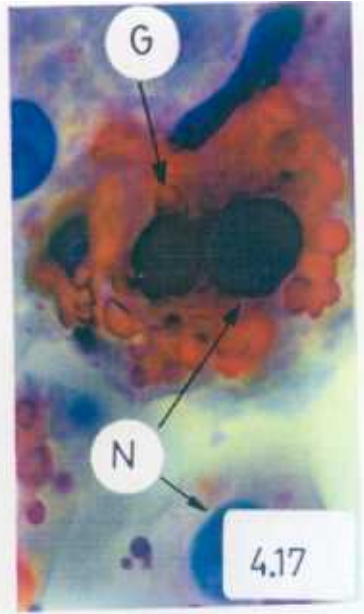
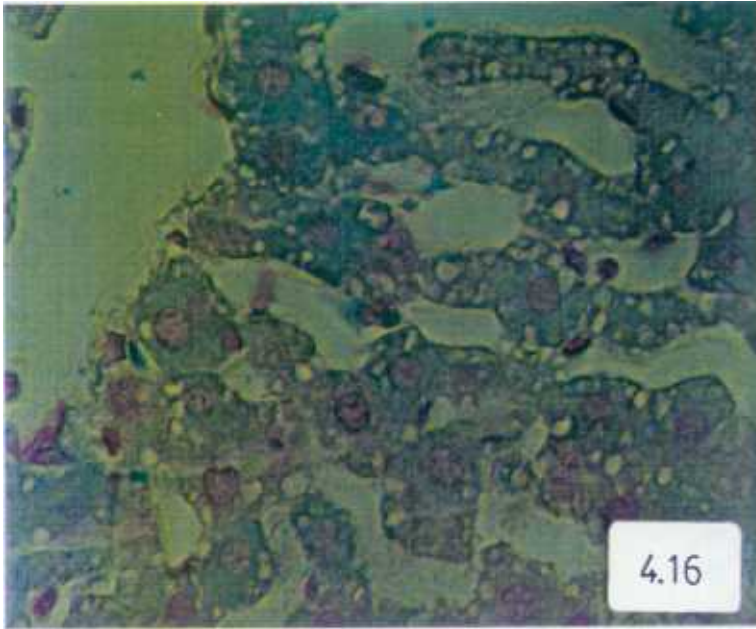
- Fig 4.8.** Sección hepática de animales que han ingerido AZT. Se observa junto a la zona centrolobulillar un infiltrado linfoide (IL) (X 50).
- Fig 4.9.** Tinción para pigmento férrico (técnica de Pearl's) en una sección transversal de tejido hepático. (15 días AZT) (X 200).
- Fig 4.10.** Hígado de rata que ha ingerido AZT 30 días consecutivos con tinción hematoxilina eosina. Vacuolización de hepatocitos (X 800).
- Fig 4.11.** Tricrómico de Masson en sección de hígado de ratas (30 días AZT). Se observa un infiltrado linfoide (IL) (X 400).



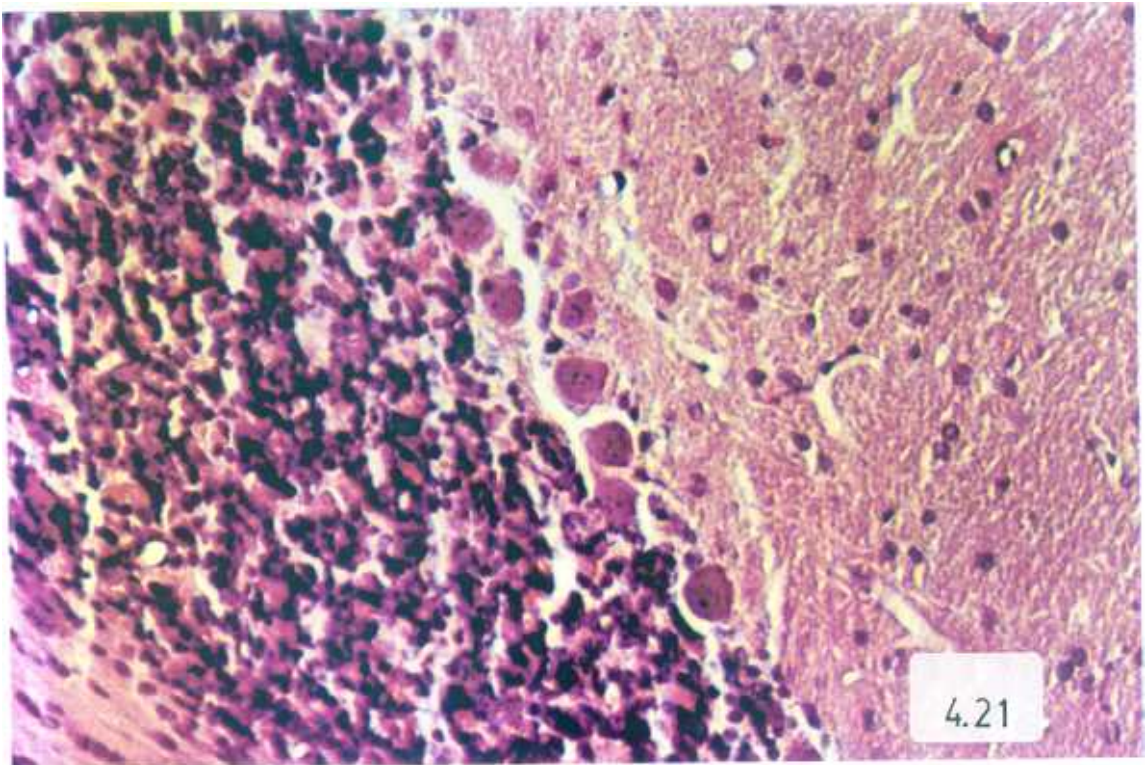
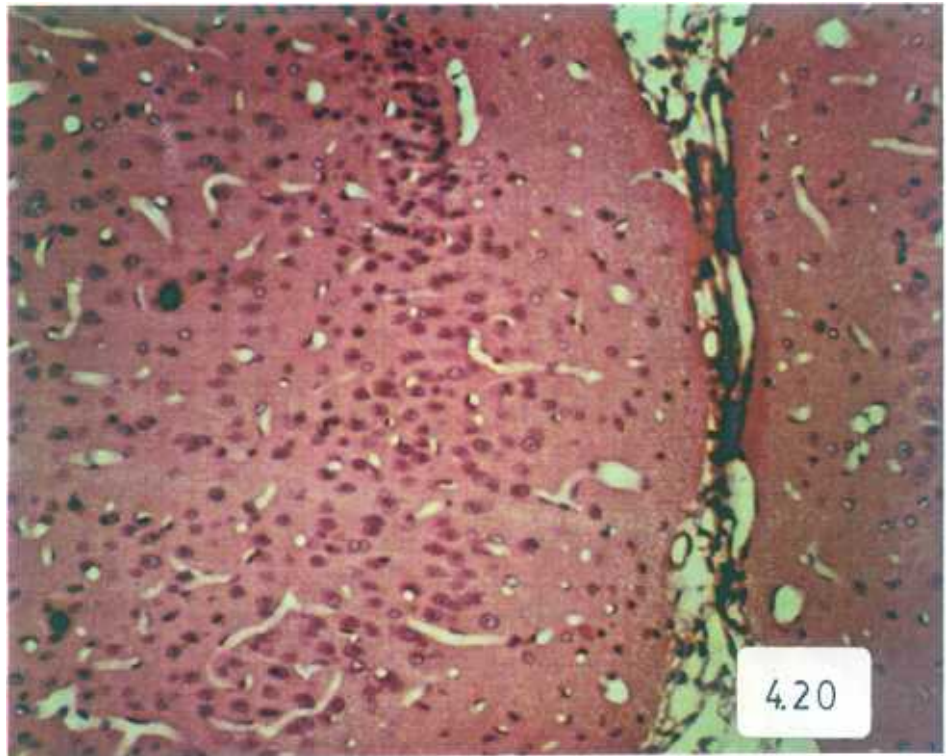
- Fig 4.12.** Tinción con hematoxilina eosina de tejido hepático de animales que han ingerido 90 días AZT (X 800).
- Fig 4.13.** Sección de hígado con tinción PAS. (AZT 90 días) (X 800).
- Fig 4.14.** Hígado de rata teñido con Tricrómico de Masson (X 400).
- Fig 4.15.** Técnica de reticulina de Wilder en corte de hígado de rata (AZT 90 días) (X 800).



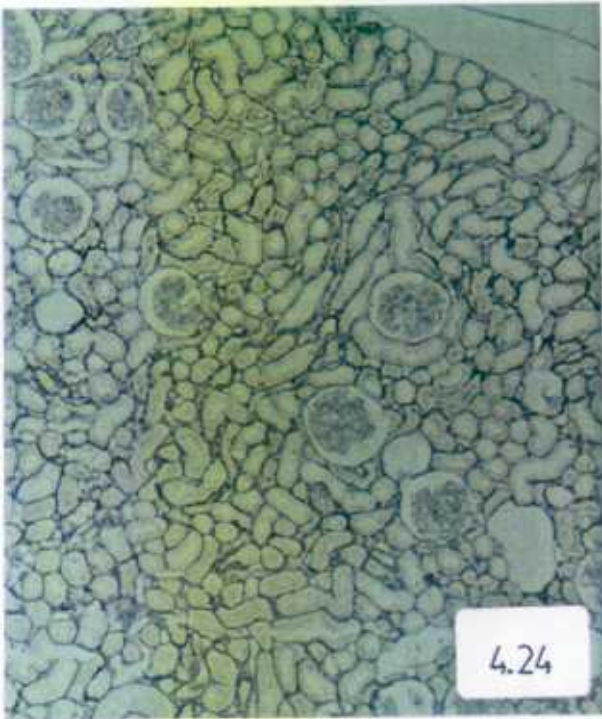
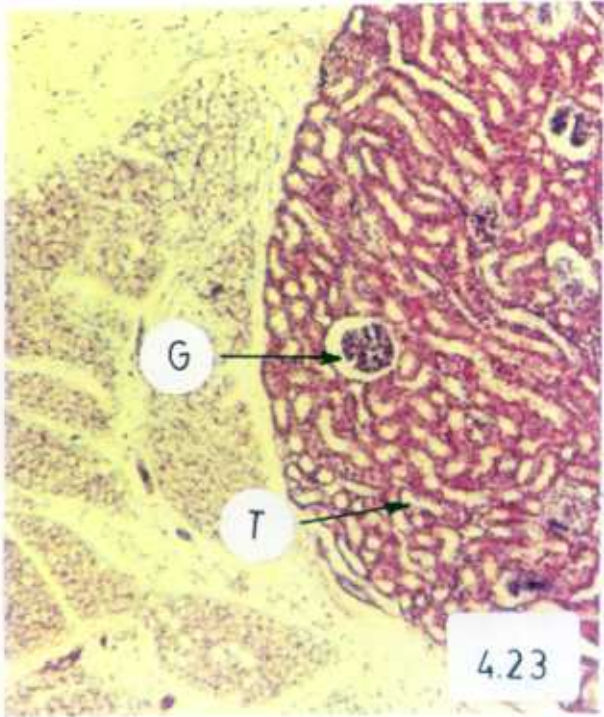
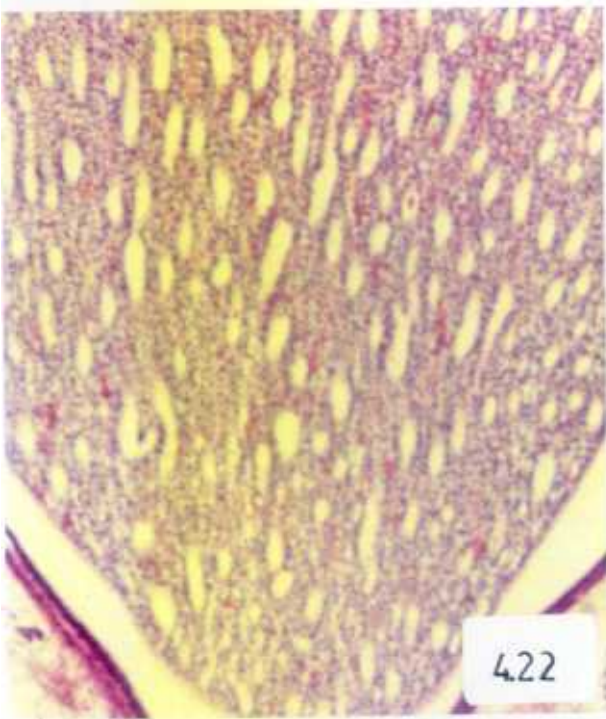
- Fig 4.16.** Tinción de Pearl's en hígado de rata que ha ingerido 90 días AZT. Se aprecian citoplasmas vacuolizados (X 800).
- Fig 4.17.** Célula positiva con tinción Sudán III contrateñido con hematoxilina. El citoplasma contiene gran cantidad de grasa (GG) (X 2000).
- Fig 4.18.** Panorámica de sección hepática de rata (90 días AZT) con Sudán III y hematoxilina. Se observa en todos los citoplasmas reacción positiva (de color rojo) (X 800).
- Fig 4.19.** Corte semifino hepático teñido con azul de toluidina. Resaltan las gotas de grasa intracitoplásmicas (GG) (X 2000).



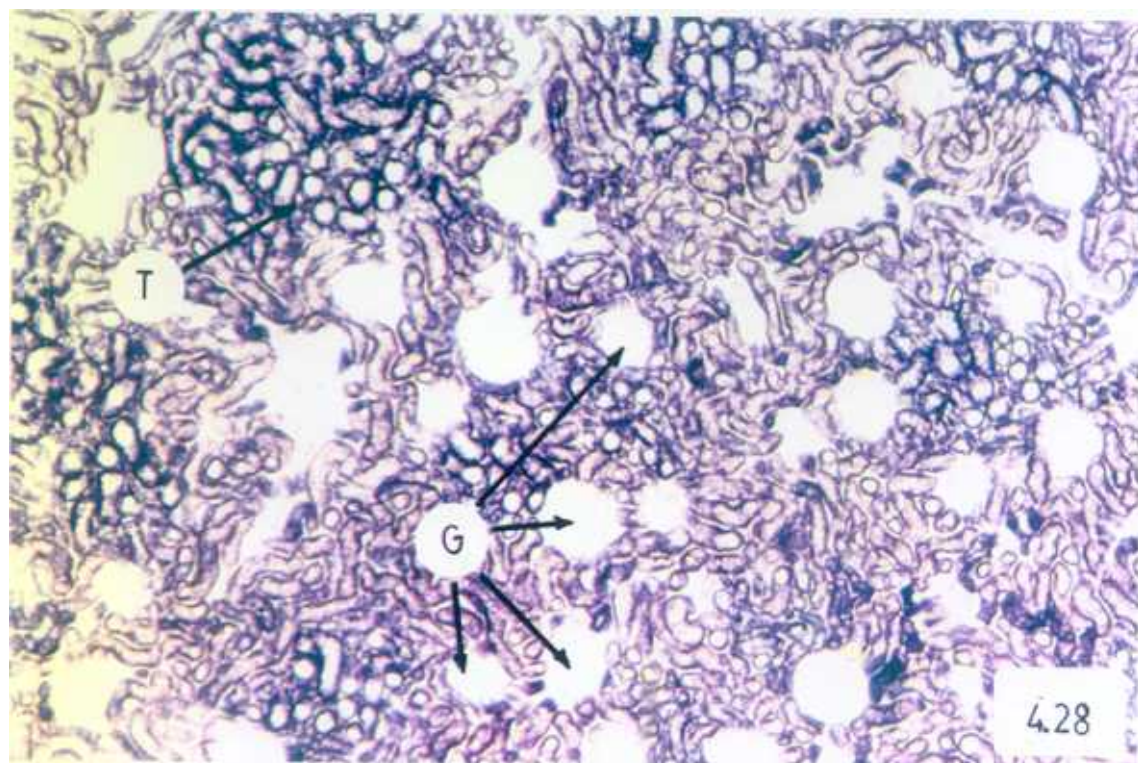
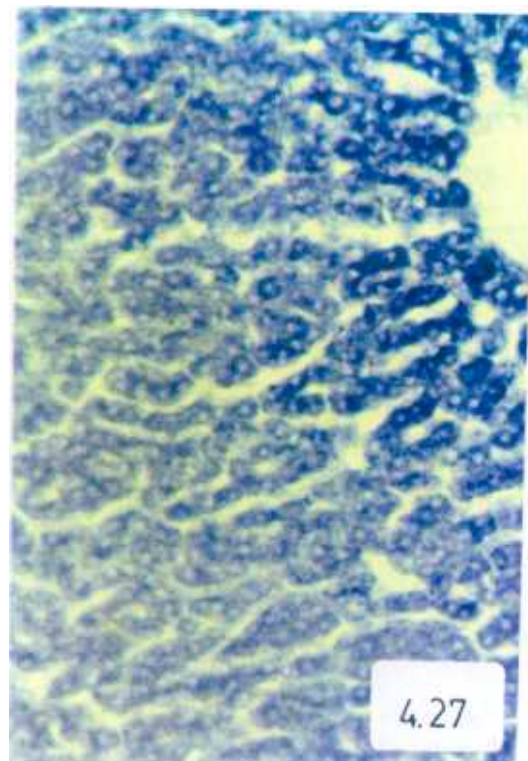
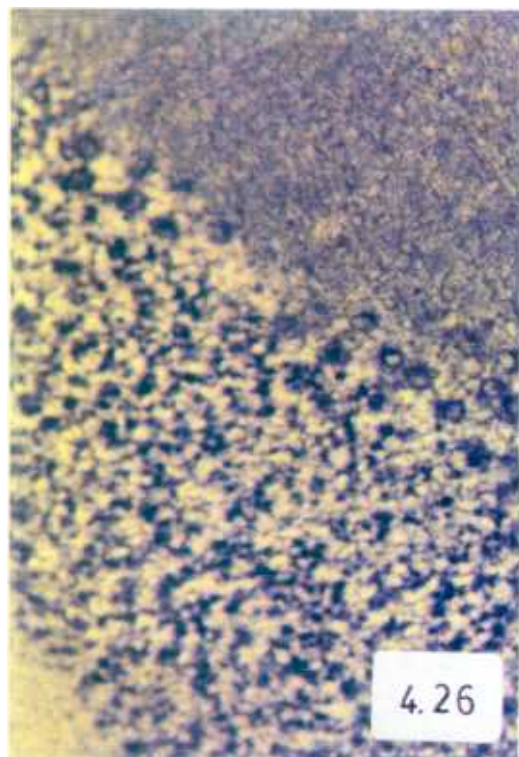
- Fig 4.20.** Fotografía que muestra el aspecto normal de sección cerebral de rata (X 800).
- Fig 4.21.** Sección cerebelosa de animal del grupo control (X 800).



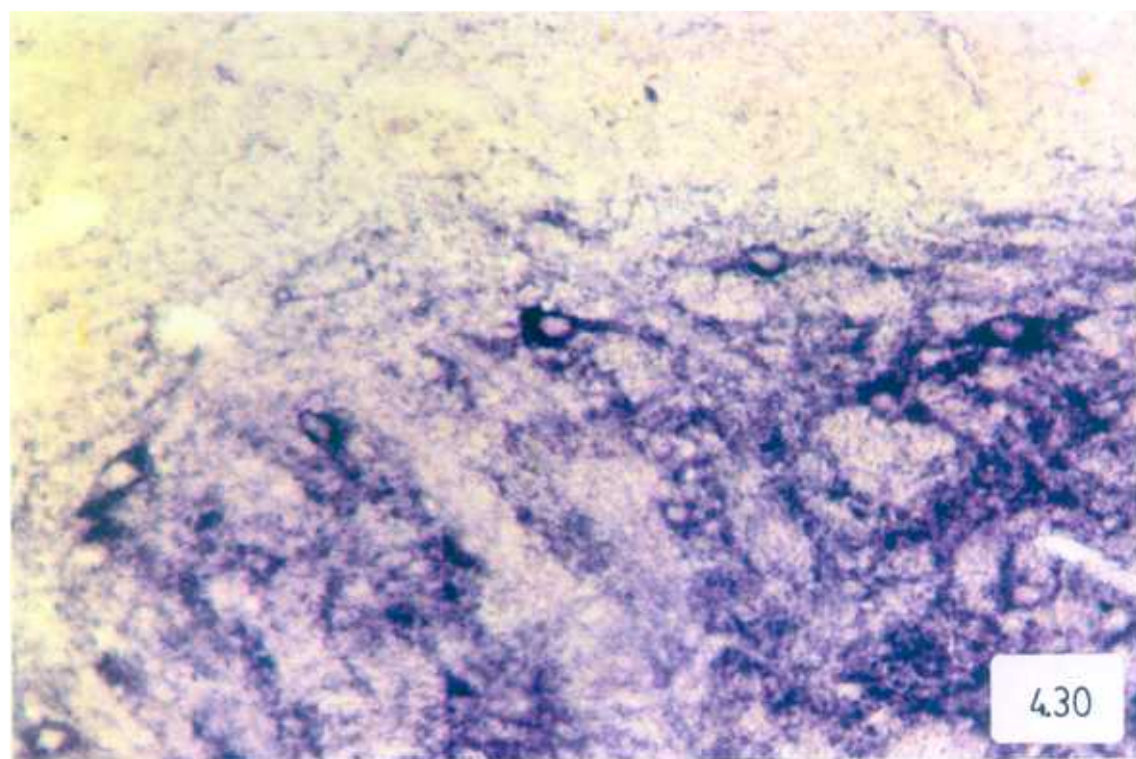
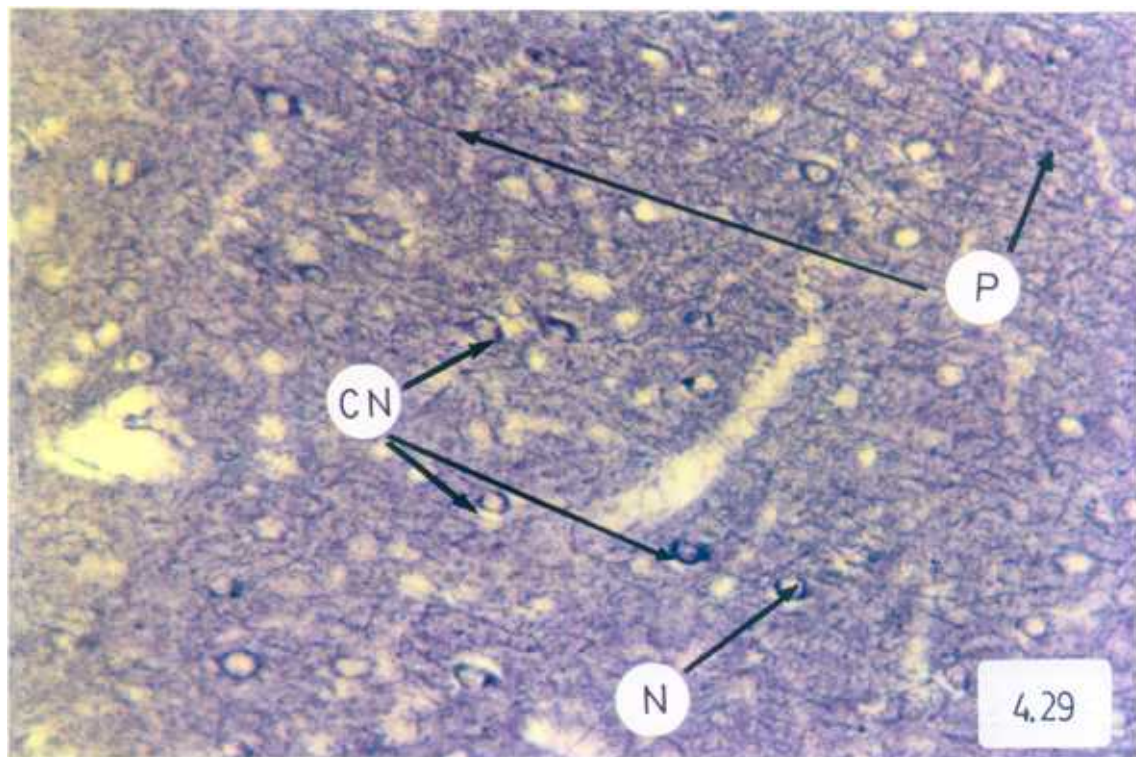
- Fig 4.22.** Zona medular de riñon de rata con tinción de hematoxilina eosina (X 80).
- Fig 4.23.** Riñon de rata grupo control. Zona cortical con glomérulos (G) y tubulos (T). Tinción HE (X 80).
- Fig 4.24.** Zona cortical renal con túbulos sin alteraciones. Tinción reticulina de Wilder (X 80).
- Fig 4.25.** Tricrómico de Masson de zona cortical de riñón (X 200).



- Fig 4.26.** Actividad málico DH en la capa molecular y granular de cerebelo de animales que han ingerido AZT. Destacan por su actividad los citoplasmas de las células de Purkinje (CP) y de las células grano (CG) (X 200).
- Fig 4.27.** Sección de hígado con actividad málico DH con reacción positiva en los citoplasmas de los hepatocitos (X 200).
- Fig 4.28.** Corte de riñón de rata (tratada con AZT) con actividad málico DH en los túbulos contorneados (T). Apareciendo negativos los glomérulos (G) (X 80).



- Fig 4.29.** Actividad málico DH en cerebro (cortex somatosensorial) de ratas que han ingerido AZT. Fotografía que corresponde a las capas V y VI. Se observan citoplasmas neuronales (CN) y prolongaciones (P) con actividad enzimática. Los núcleos (N) aparecen negativos (X 800).
- Fig 4.30.** Málico DH con actividad positiva en caudado putamen (X 1200).



- Fig 4.31.** Actividad isocitrato DH en animales que han ingerido AZT 30 días. Capas V y VI del cerebro donde se distinguen neuronas con un marcaje enzimático en citoplasmas, así como prolongaciones nerviosas (X 800).
- Fig 4.32.** Detalle de actividad isocitrato DH a mayor aumento (X 1200).

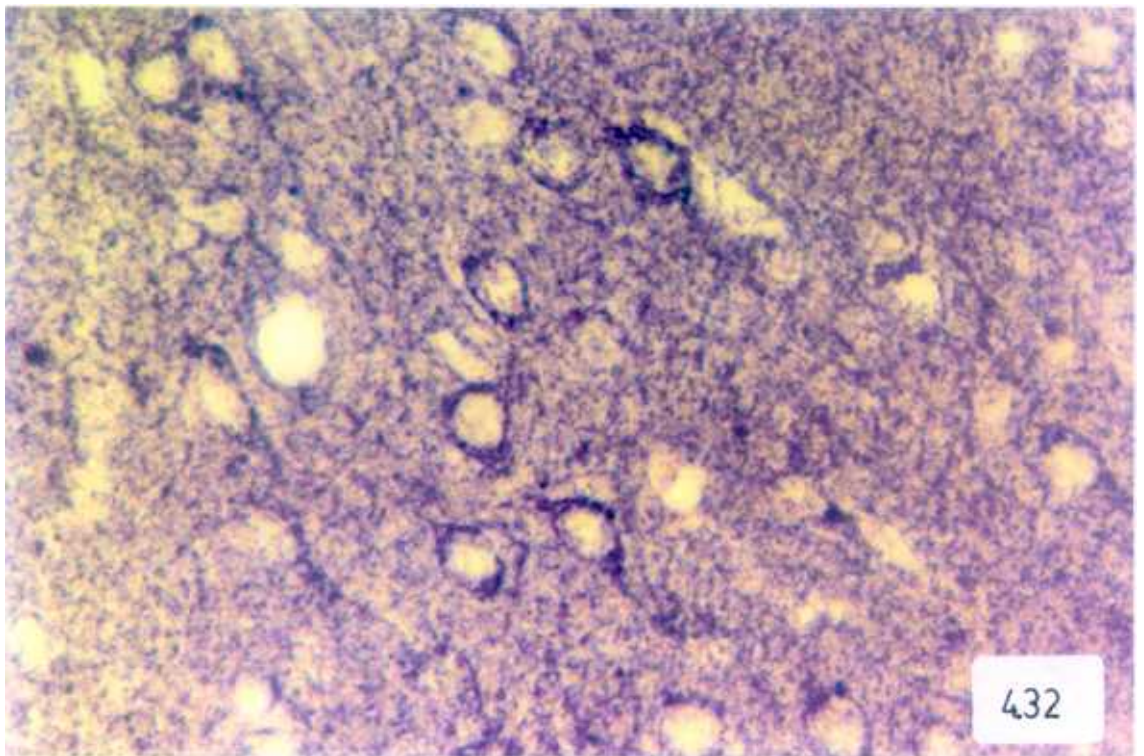
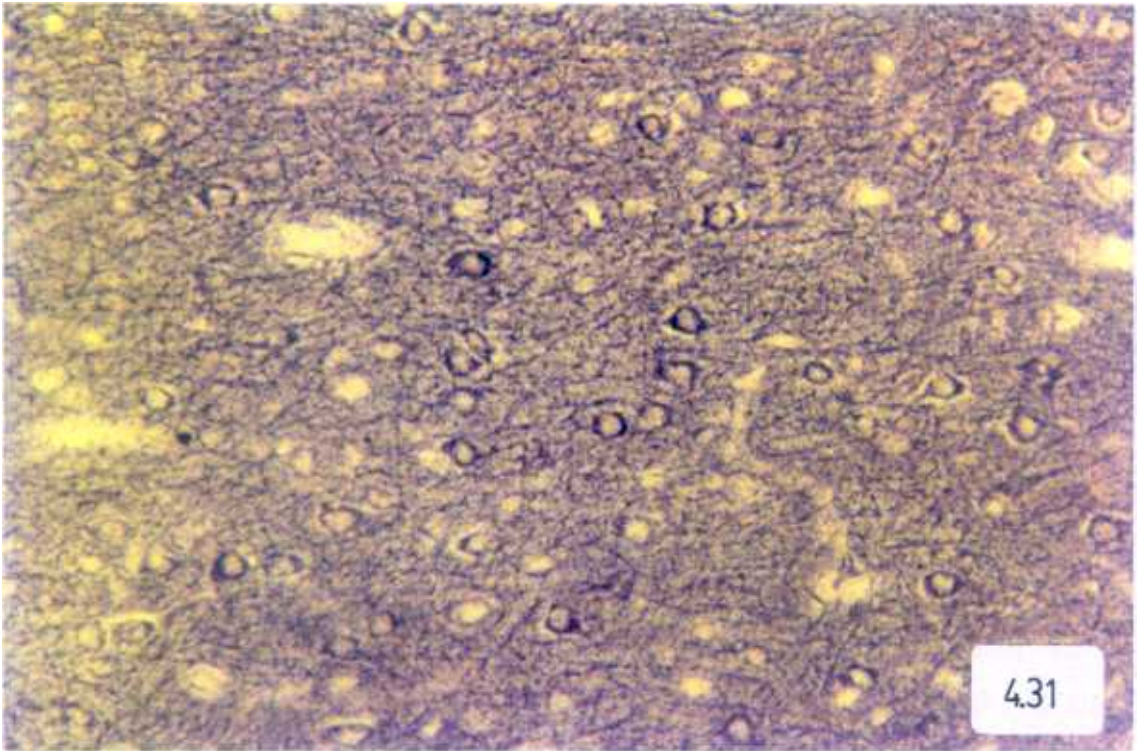
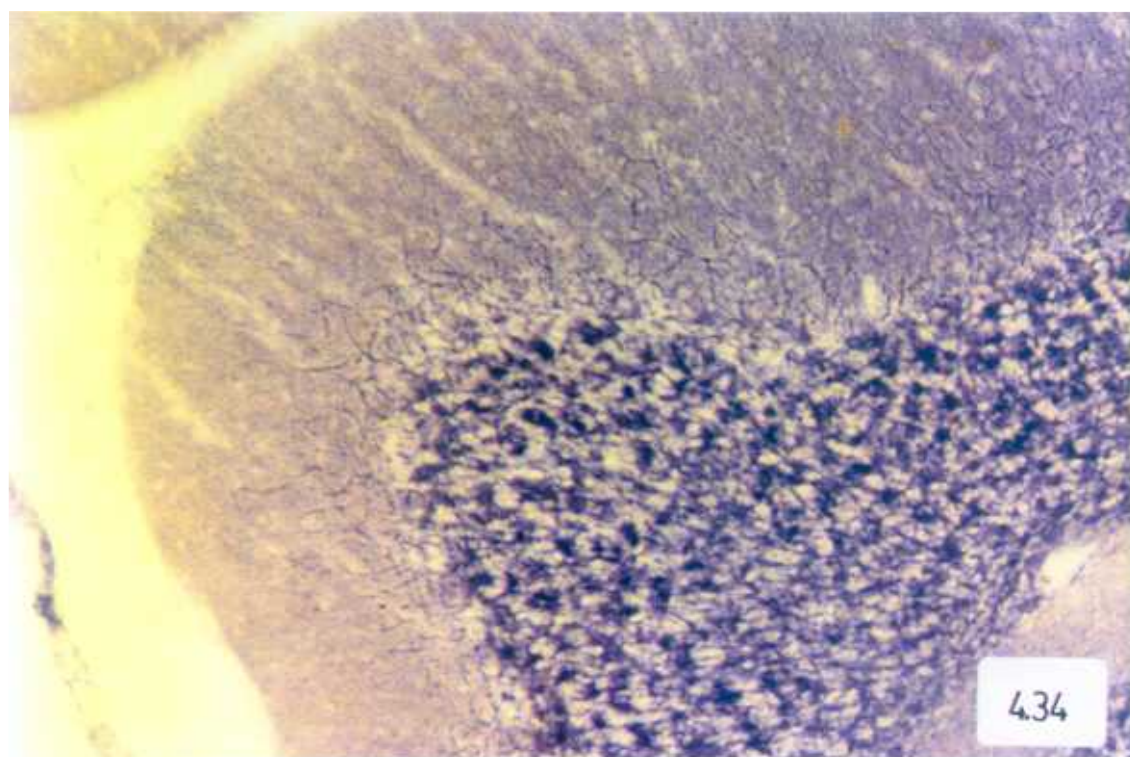
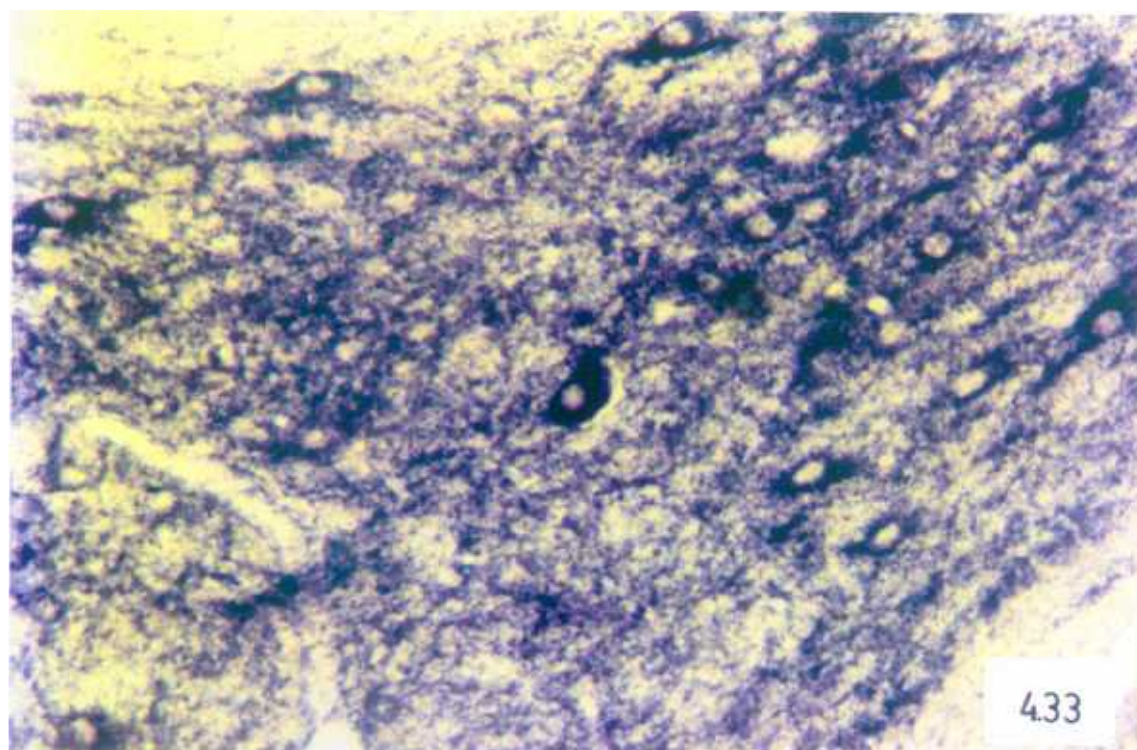
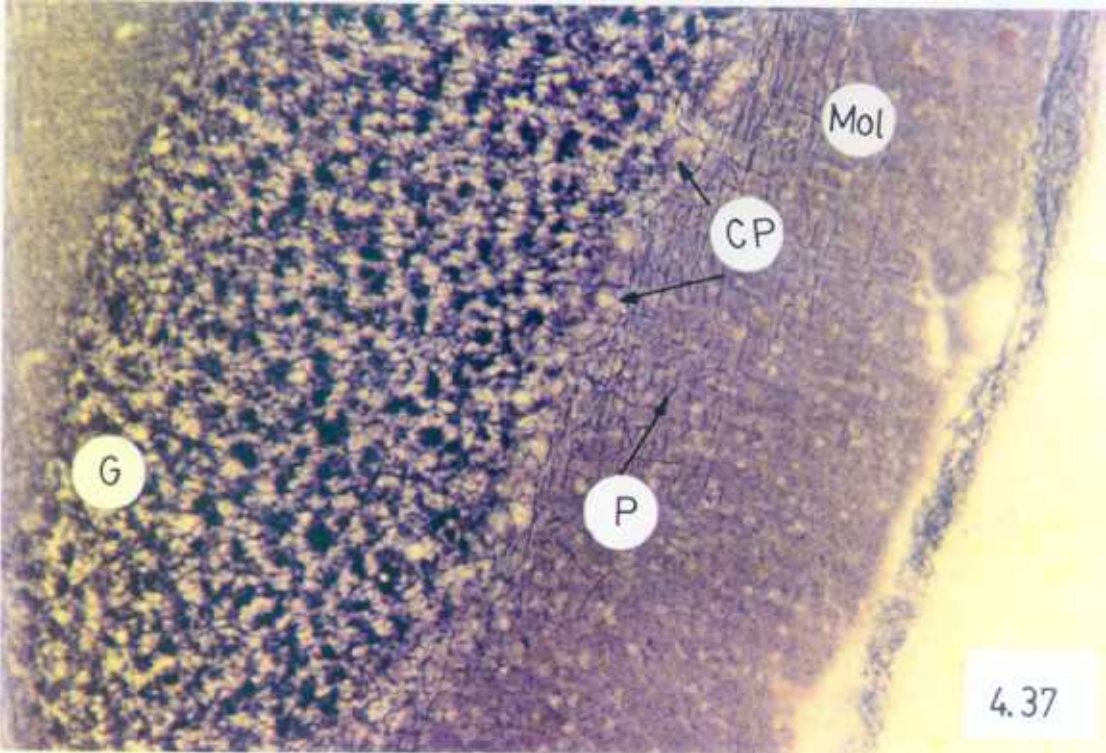
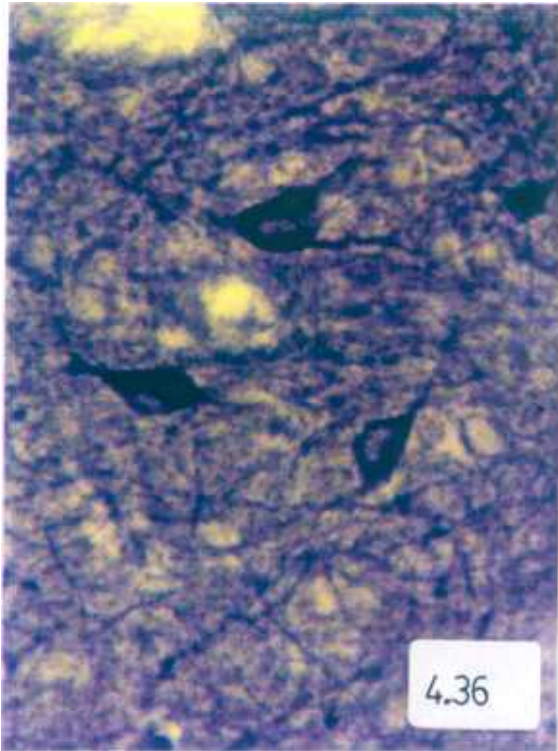
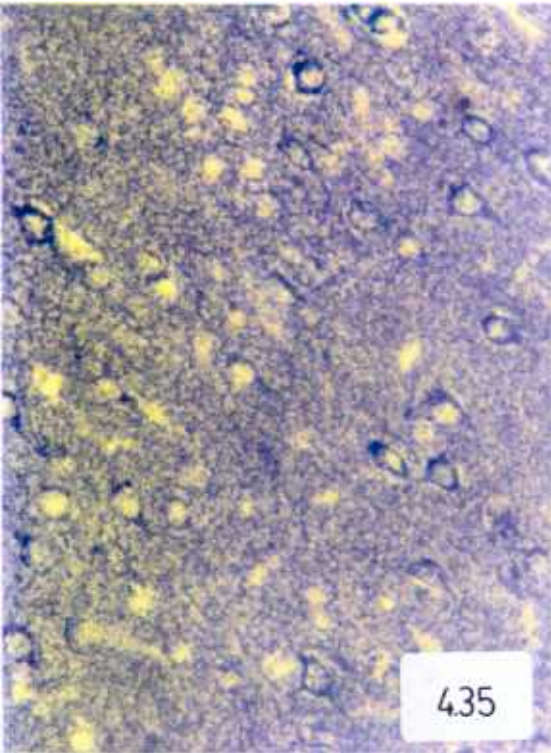


Fig 4.33. Caudado putamen con actividad enzimática positiva isocitrato DH en citoplasmas neuronales (X 1200).

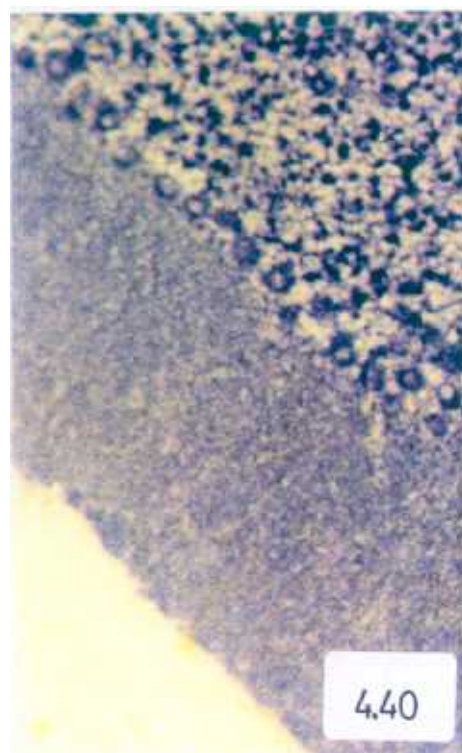
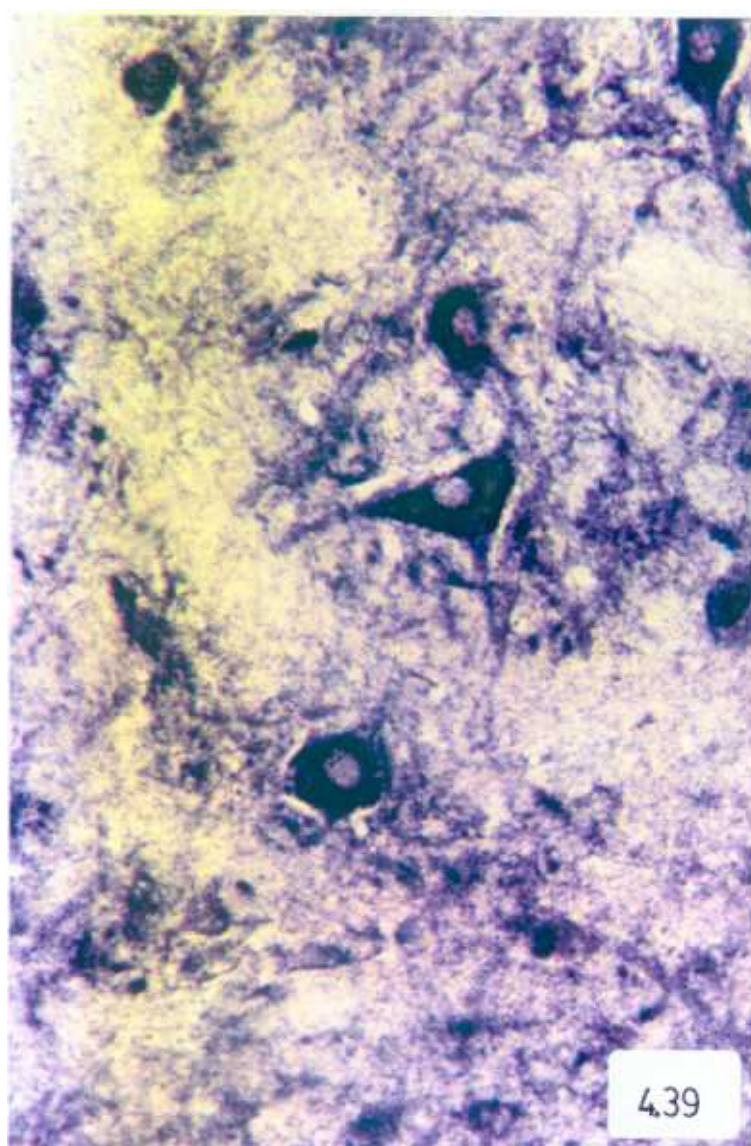
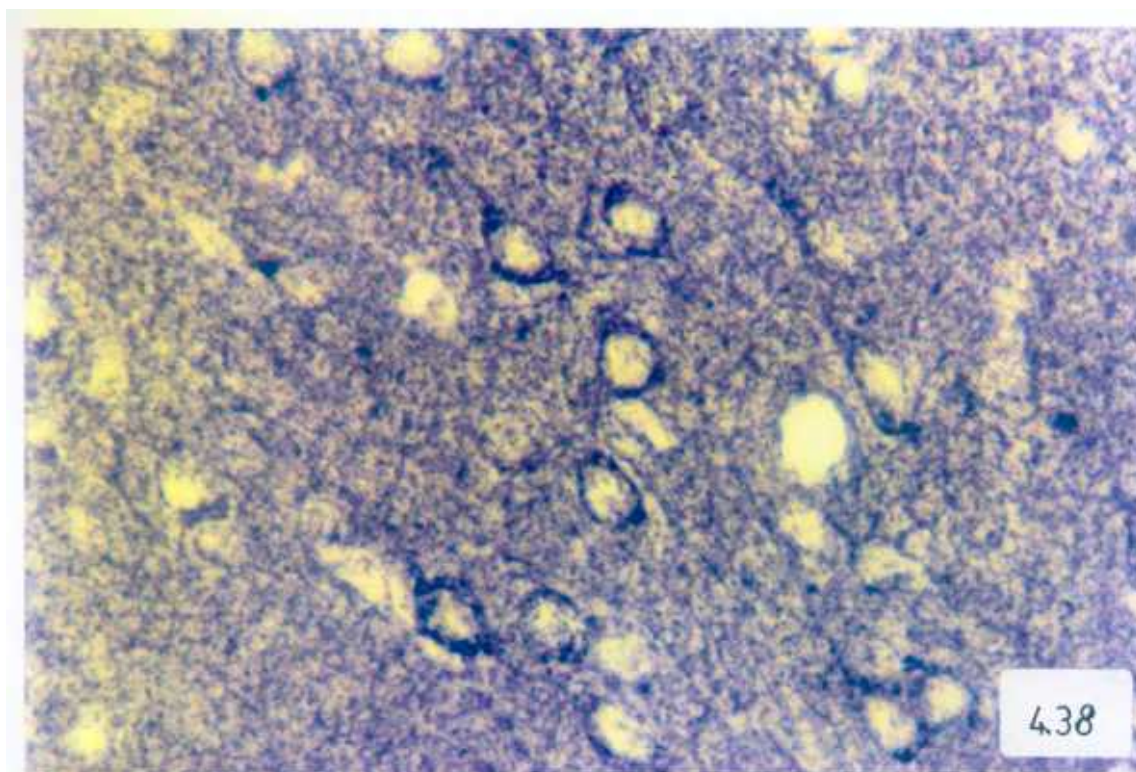
Fig 4.34. Cerebelo con actividad Isocitrato DH. Reacción positiva en ambas capas granular y molecular siendo más intensa en la capa granular sobre todo en zonas glomerulares y en células grano. En la capa molecular se observa reacción intensa en prolongaciones de células nerviosas. Las células de Purkinje muestran actividad enzimática débil (X 200).



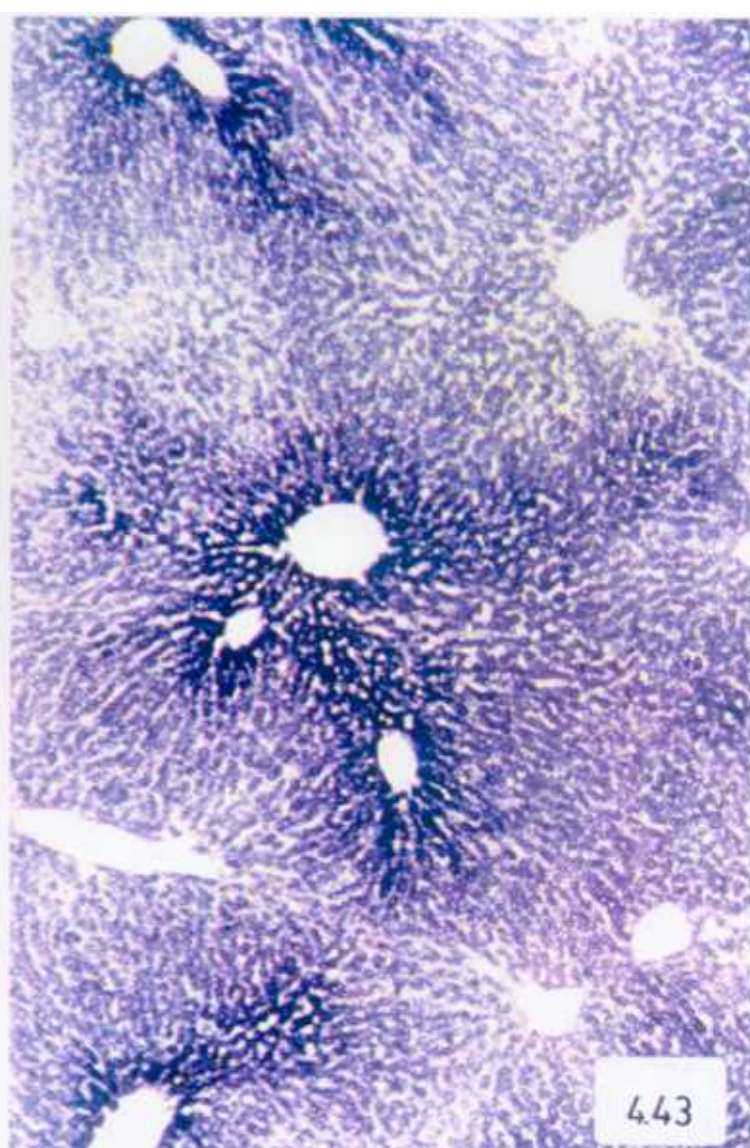
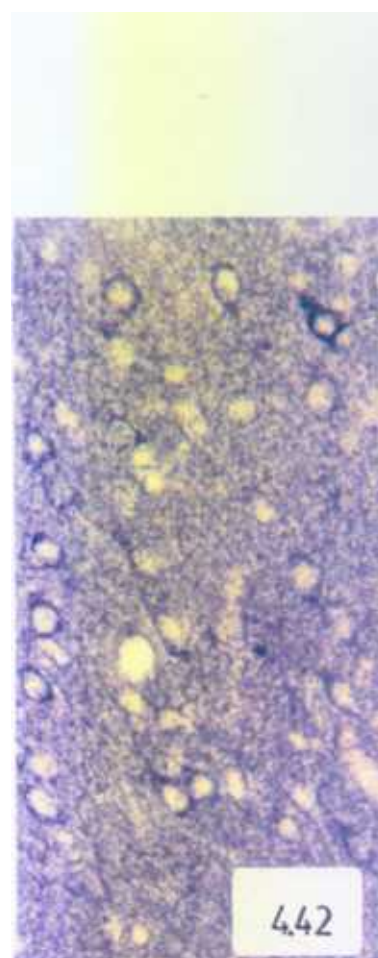
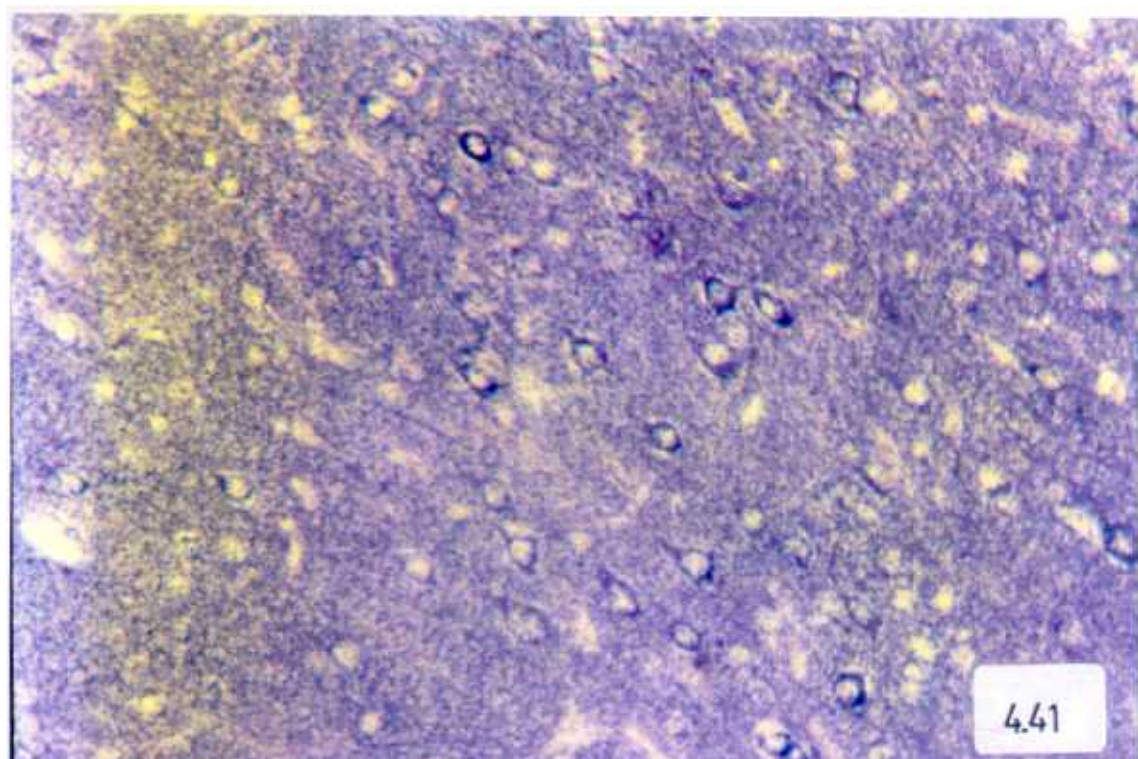
- Fig 4.35.** Sección de cerebro (cortex somatosensorial) con actividad enzimática Succinato DH positiva en citoplasmas neuronales y prolongaciones (X 800).
- Fig 4.36.** Actividad succinato DH en neuronas del caudado putamen (X 800).
- Fig 4.37.** Reacción histoenzimática succinato DH en cerebelo de animales que han ingerido AZT 30 días. Se observa reacción positiva en las capas granular (G) y molecular (Mol) siendo especialmente intensa en las prolongaciones neuronales (P) presentes en la capa molecular y en zonas glomerulares de la capa granular. Las células de Purkinje (CP) presentan reacción más débil (X 200).



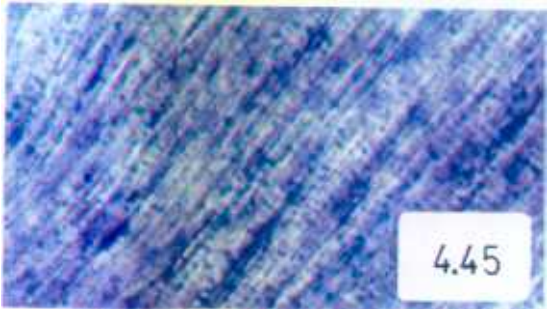
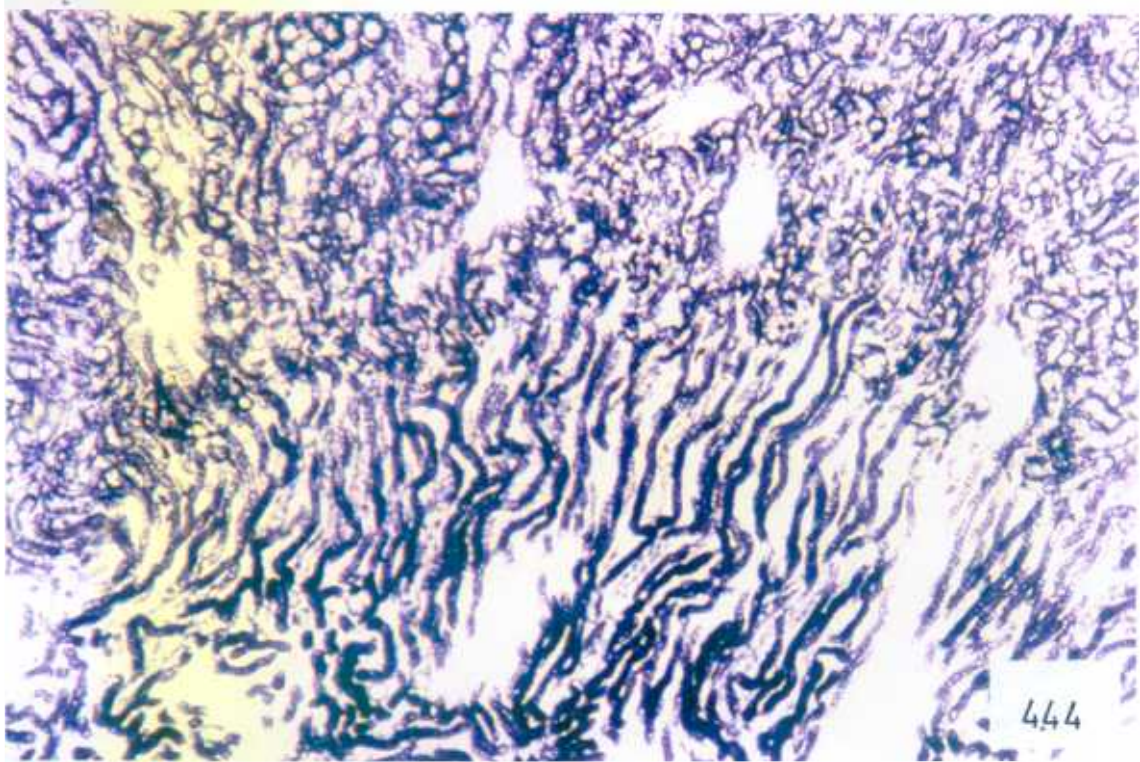
- Fig 4.38.** Actividad NADH DH en corteza somatosensorial. (X 800).
- Fig 4.39.** Sección incubada con NADH DH en caudado putamen en animales que han ingerido AZT. Se aprecian neuronas con una fuerte intensidad citoplásmica (X 800).
- Fig 4.40.** Corte de cerebelo con actividad positiva NADH DH en las capas granular y molecular. Destaca la actividad citoplasmática de las células de Purkinje y grano (X 200).



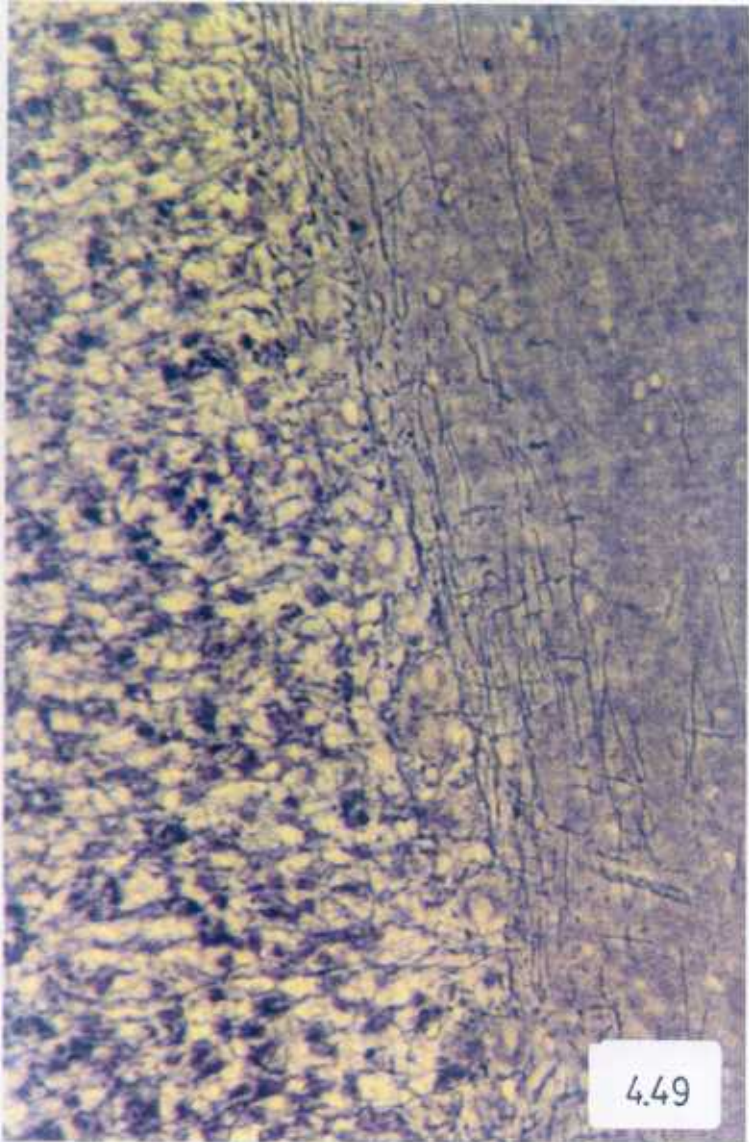
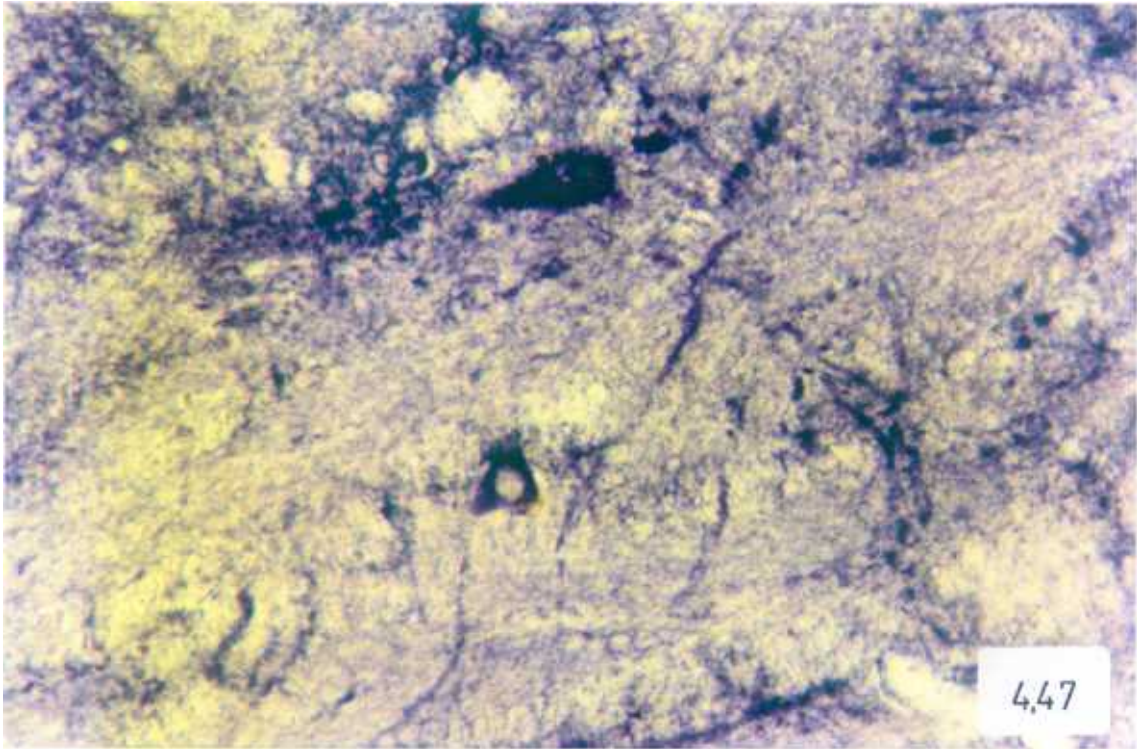
- Fig 4.41.** Corteza somatosensorial con actividad enzimática positiva NADH DH (X 800).
- Fig 4.42.** Actividad positiva NADH DH en cerebelo de animales que han ingerido AZT (X 800).
- Fig 4.43.** Hígado de rata con actividad enzimática NADH DH intensa en hepatocitos centrolobulillares (X 200).



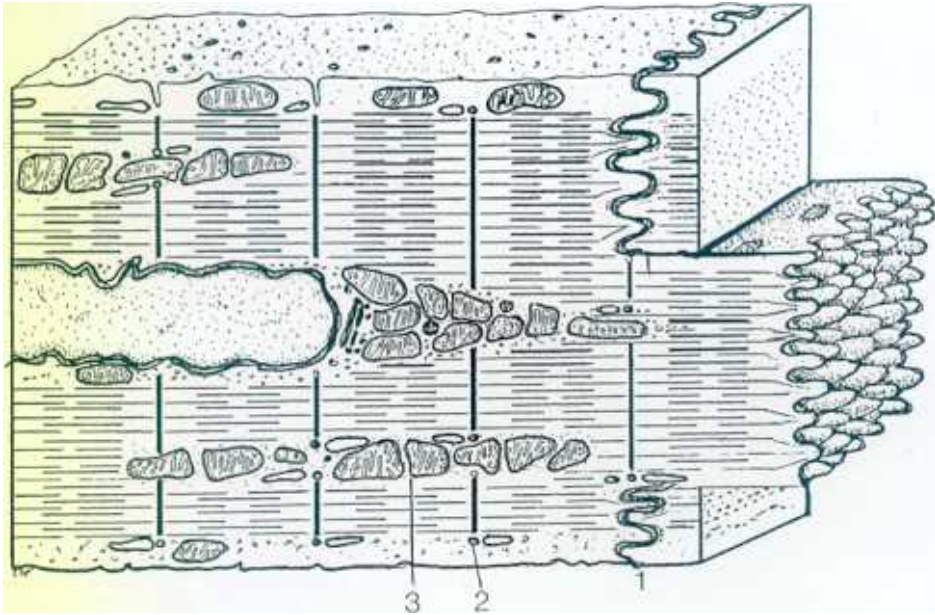
- Fig 4.44.** Sección de riñón con actividad NADH DH en animales que han ingerido AZT. Reacción más intensa en los túbulos colectores (X 200).
- Fig 4.45.** Actividad enzimática positiva NADH DH en músculo cardíaco de ratas a las que se les administró AZT (X 400).
- Fig 4.46.** Detalle de neurona con actividad NADPH DH positiva (X 800).



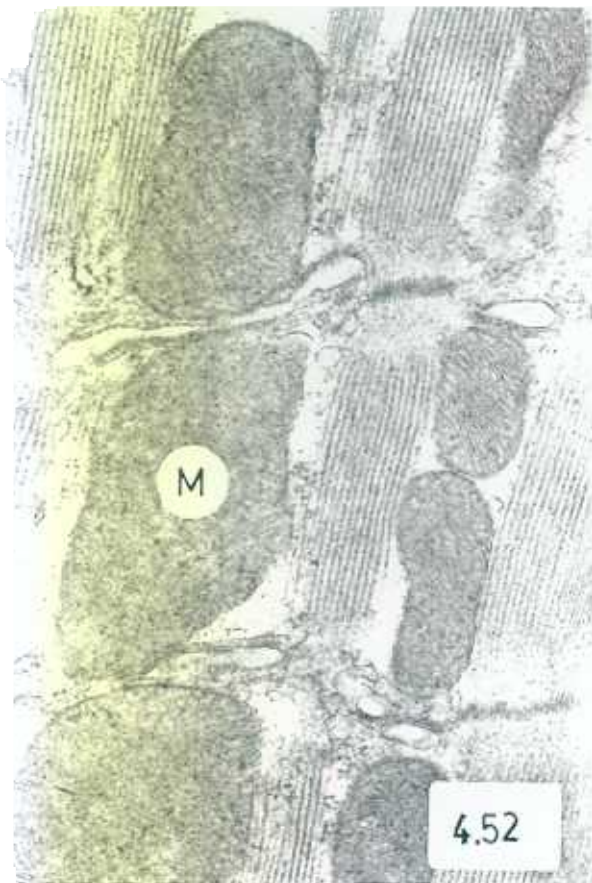
- Fig 4.47.** Actividad NADPH DH en caudado putamen. Se observan escasas neuronas con reacción positiva. Se aprecian algunas prolongaciones neuronales positivas (X 800).
- Fig 54.48.** Detalle de neurona con actividad enzimática positiva NADPH DH de rata que ha ingerido AZT (X 800).
- Fig 4.49.** Reacción enzimática positiva NADPH DH en prolongaciones neuronales y fibras nerviosas en la capa granular preferentemente. En la capa molecular aparece reacción positiva en fibras paralelas. Las células de Purkinje apenas presentan reacción positiva. En la capa granular se ve reacción positiva en zonas que sugieren glomerulos (X 400).



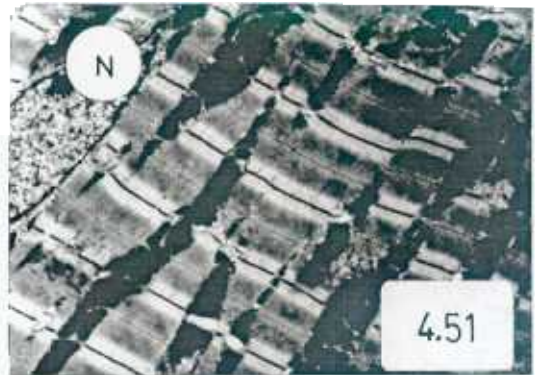
- Fig 4.50.** Esquema de fibra muscular cardiaca. (1) Banda Q escaleriforme "gap junction". (2) Tubos transversos localizados a nivel de líneas Z. (3) Acúmulos de glucógeno (Tomado de Carrascal, 1988).
- Fig 4.51.** Aspecto panorámico de músculo cardiaco de animales del grupo control, donde se observa un núcleo oval y las distintas bandas y líneas, así como numerosas mitocondrias (X 10.000).
- Fig 4.52.** Microfotografía de músculo cardiaco donde se aprecia la estructura mitocondrial con las crestas paralelas y perfectamente estructuradas. (Animales del grupo control) (X 6.000).
- Fig 4.53.** Detalle de banda escaleriforme y mitocondrias de músculo cardiaco de animales del grupo control (X 30.000).
- Fig 4.54.** Fibras musculares donde se observan las bandas (A), (I) y línea (Z), así como mitocondrias (M) (X 20.000).



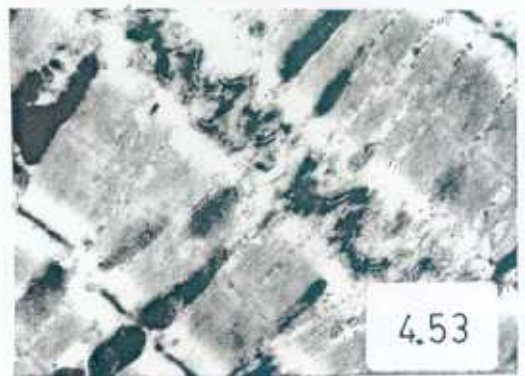
4.50



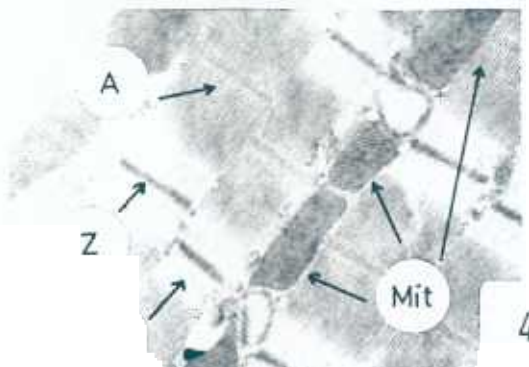
4.52



4.51

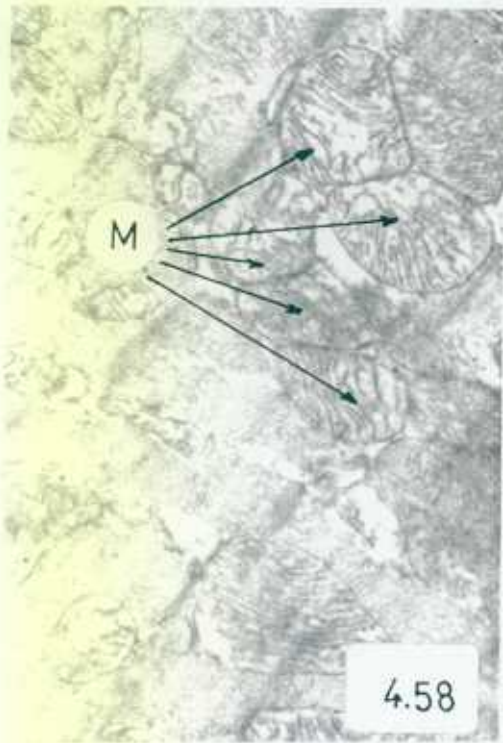
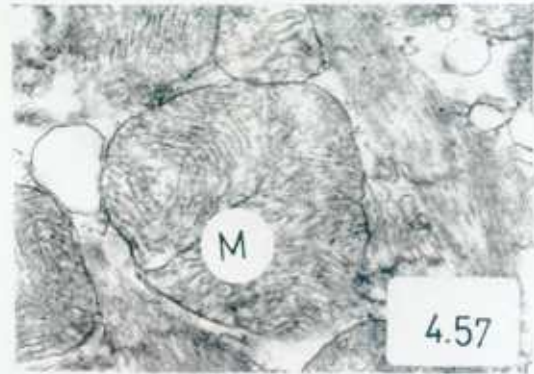
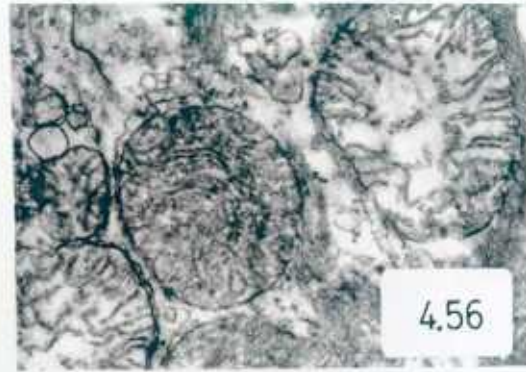
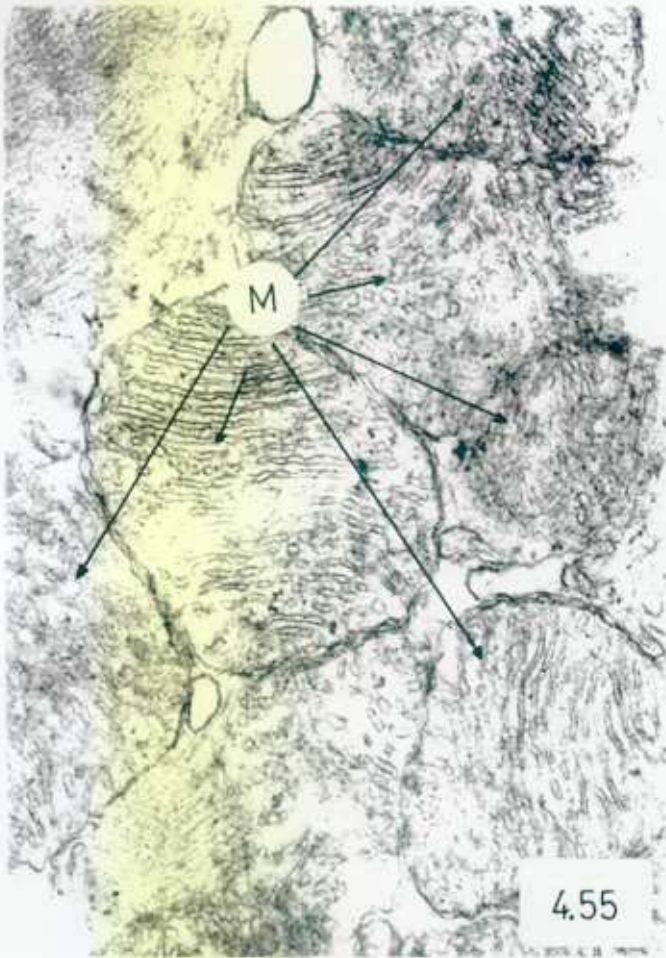


4.53

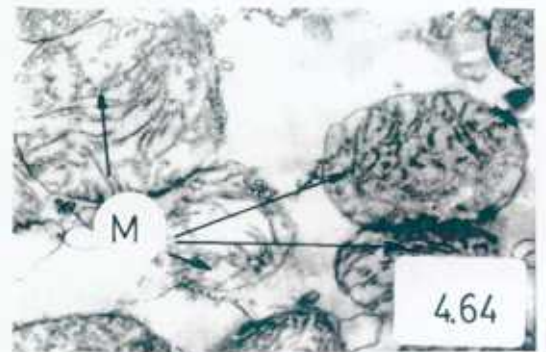
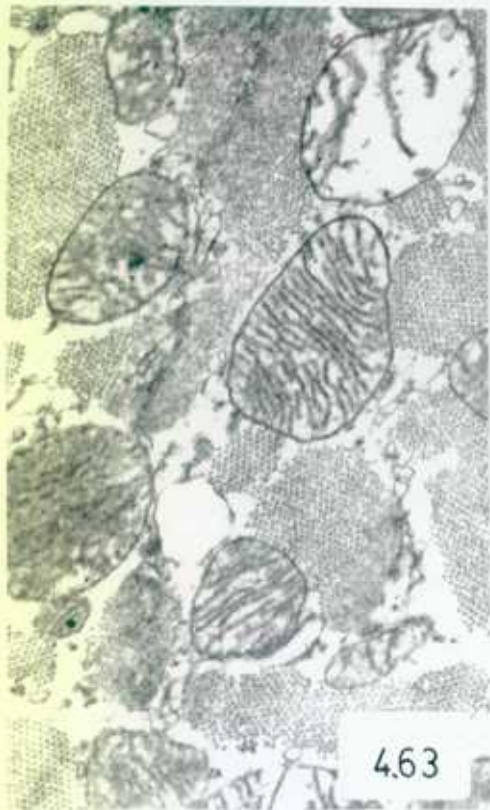
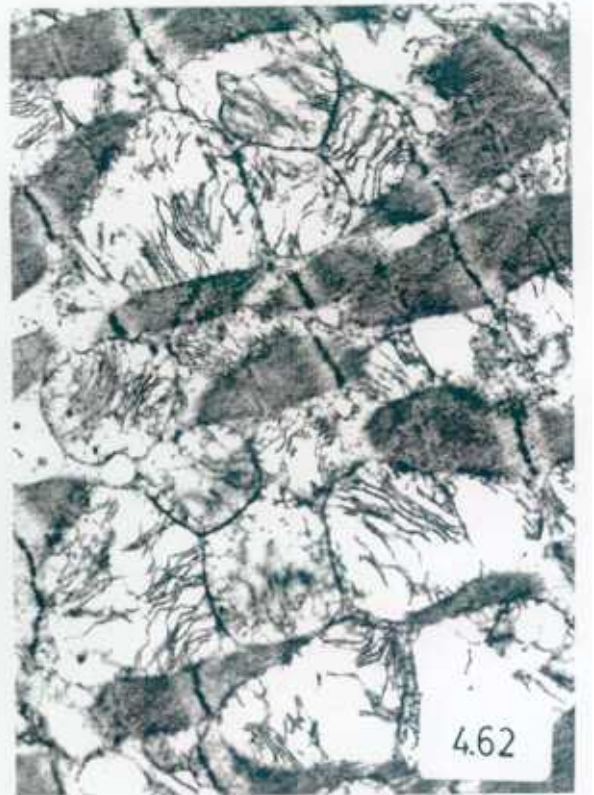
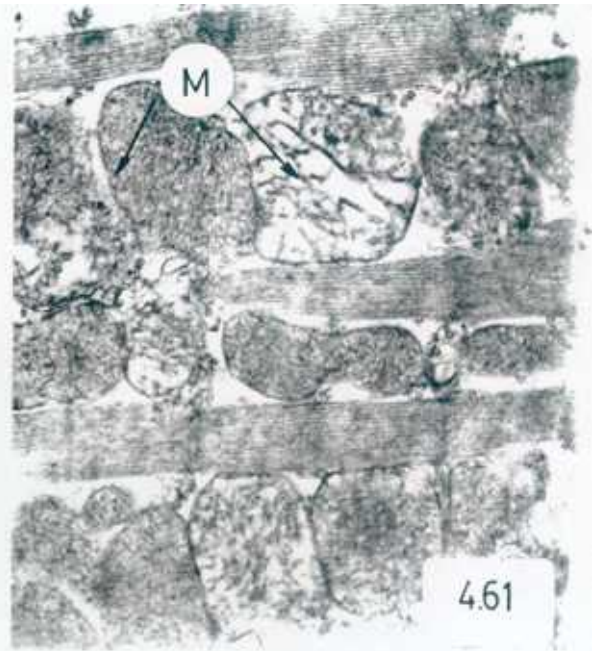
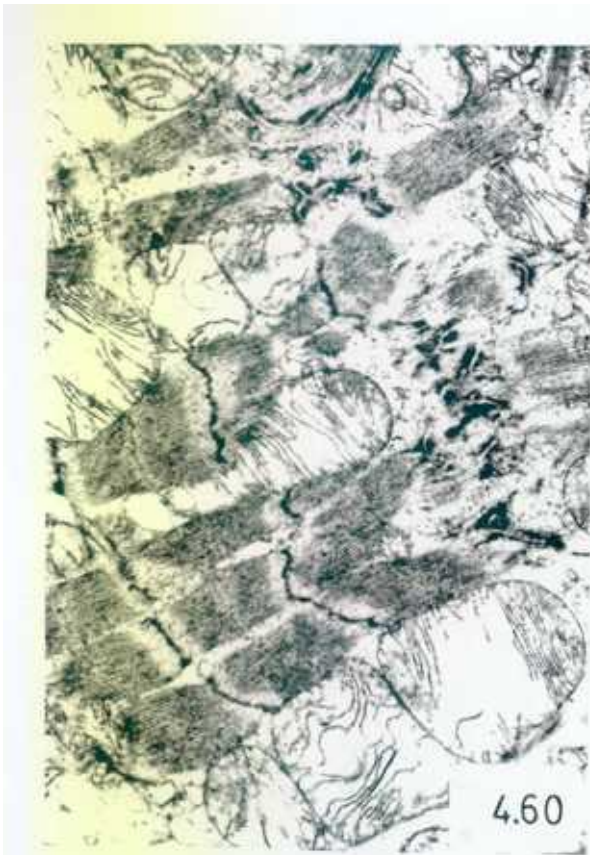


4.54

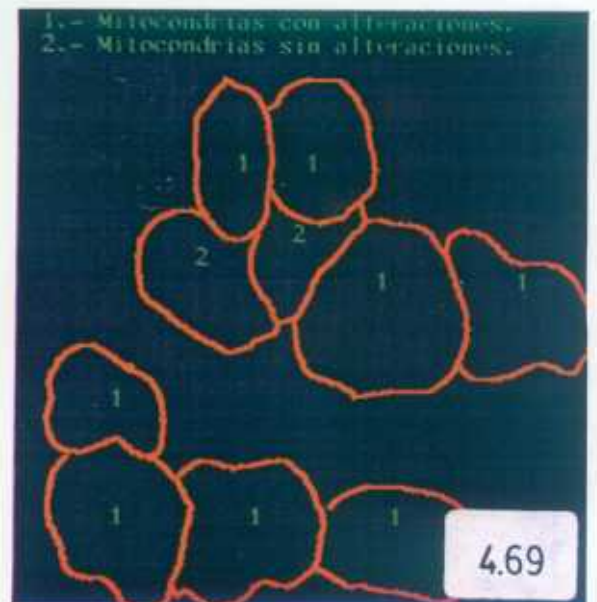
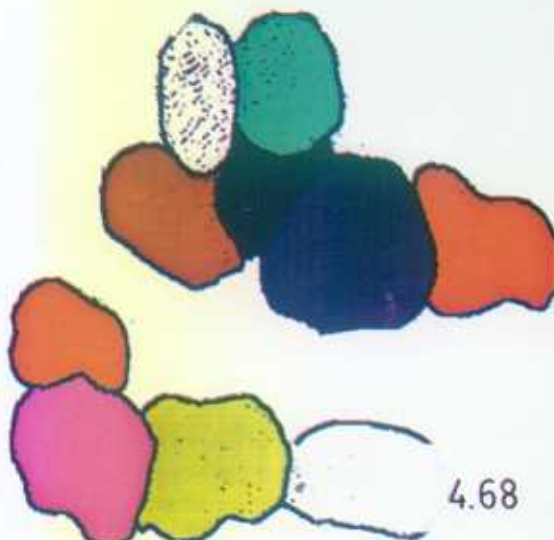
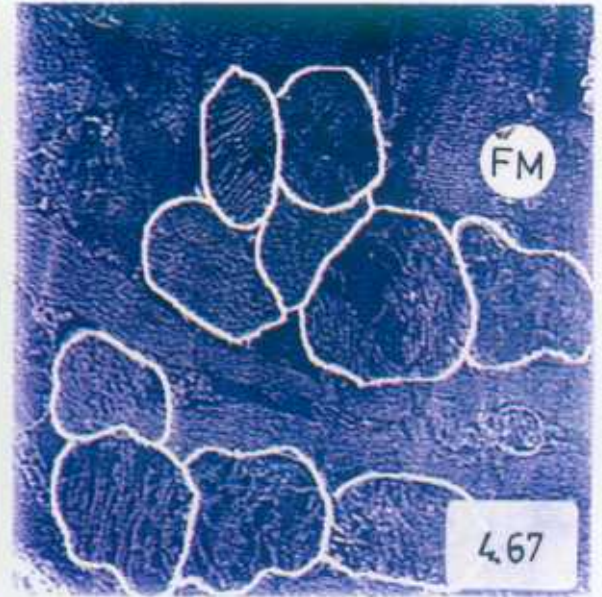
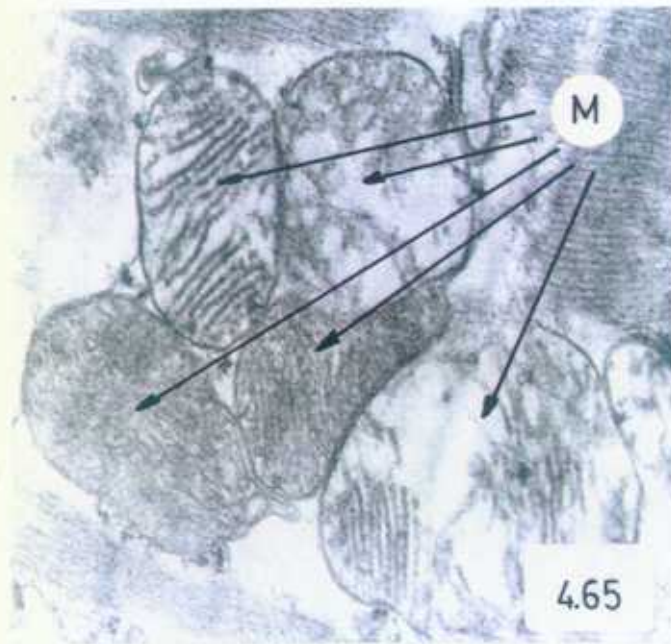
- Fig 4.55.** Microfotografía en la que destaca la presencia de mitocondrias con cierta retracción de las crestas y con destrucción parcial de las mismas a los 30 días con AZT (X 70.000).
- Fig 4.56.** Grupo de mitocondrias en las que se observa una desorganización de las crestas y una disposición normal de las mismas en otra a los 30 días con AZT (X 20.000).
- Fig 4.57.** Mitocondrias (M) que presentan cierto grado de hipertrofia (X 20.000).
- Fig 4.58.** Corte transversal de músculo cardiaco en el que aparecen mitocondrias con tumefacción y edema intramitocondrial (X 12.000).
- Fig 4.59.** Aspecto ultraestructural de mitocondrias (M) vacuolizadas con aumento de tamaño y desorganización de crestas. Las fibras musculares (FM) por algunas zonas contraídas posiblemente por compresión de las mitocondrias (X 8.000).



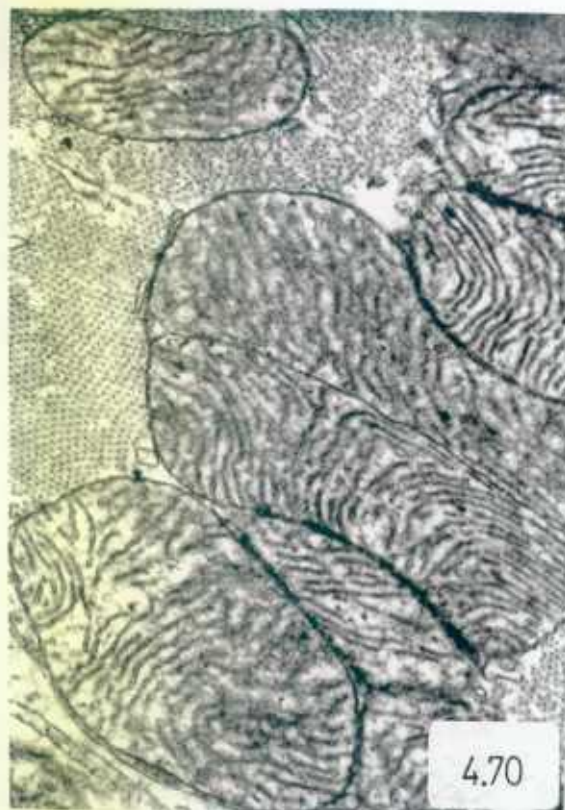
- Fig 4.60.** Fibra muscular con distinción de líneas y bandas en algunas zonas parcialmente alteradas, la banda escaleriforme se encuentra parcialmente interrumpida y con pérdida de desmosomas. Mitocondrias (M) con aspecto desestructurado (X 16.000).
- Fig 4.61.** Microfotografía panorámica en las que se visualizan mitocondrias (M) similares a los miocardios del grupo control con otras que poseen las crestas desestructuradas pero con un tamaño similar en ambos casos (X 15.000).
- Fig 4.62.** Aspecto de mitocondrias con alteraciones morfológicas y con pérdida en algunos casos de parte de la membrana externa y repercusión de la desestructuración de las fibras adyacentes (X 16.000).
- Fig. 4.63.** Corte transversal de fibras musculares que contienen mitocondrias con buen aspecto morfológico junto a otras con matriz de baja densidad electrónica y con crestas menos numerosas y desorganizadas (X 20.000).
- Fig 4.64.** Detalle de mitocondrias con alteraciones en sus crestas y con edema intracelular (X 20.000).



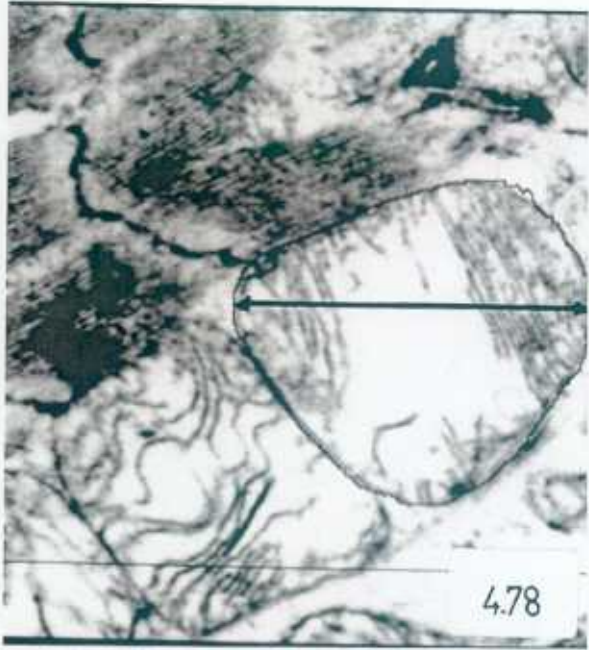
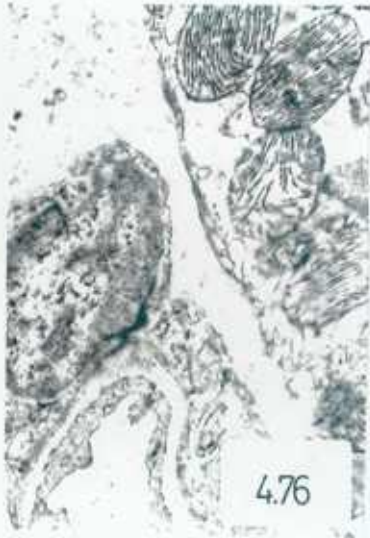
- Fig 4.65.** Microfotografía de mitocondrias con un aspecto similar a las de los animales del grupo control, junto a otras que presentan alteraciones morfológicas en sus crestas (X 37.000).
- Fig 4.66.** Negativo de microfotografía electrónica captada con analizador de imágenes, de músculo cardíaco (X 20.000).
- Fig 4.67.** Primera fase de conteo de mitocondrias con analizador de imágenes, trazado del contorno de las mismas interactivamente (X 20.000).
- Fig 4.68.** Identificación de las estructuras contorneadas (mitocondrias) (X 20.000).
- Fig 4.69.** Diferenciación de mitocondrias con estructura alterada (1) y otras con aspecto similar a las de los animales del grupo control (2) (X 20.000).



- Fig 4.70.** Conjunto de mitocondrias en corte transversal de músculo cardiaco las que se observa un fenómeno de división (X 38.000).
- Fig 4.71.** Diferente disposición de las crestas mitocondriales. Dentro de la misma fibra muscular adoptan posiciones transversales y longitudinales (X 15.000).
- Fig 4.72.** Detalle de sección transversal de músculo cardiaco con diferente disposición de las crestas mitocondriales en la que se aprecia que una de estas adopta una aspecto de "huella dactilar" (X 17.000).
- Fig 4.73.** Mitocondrias que contienen crestas con diferentes disposición respecto al mismo eje (X 30.000).
- Fig 4.74.** Corte transversal de músculo cardiaco que contiene varias mitocondrias con distintos aspectos de las crestas (X 12.000).



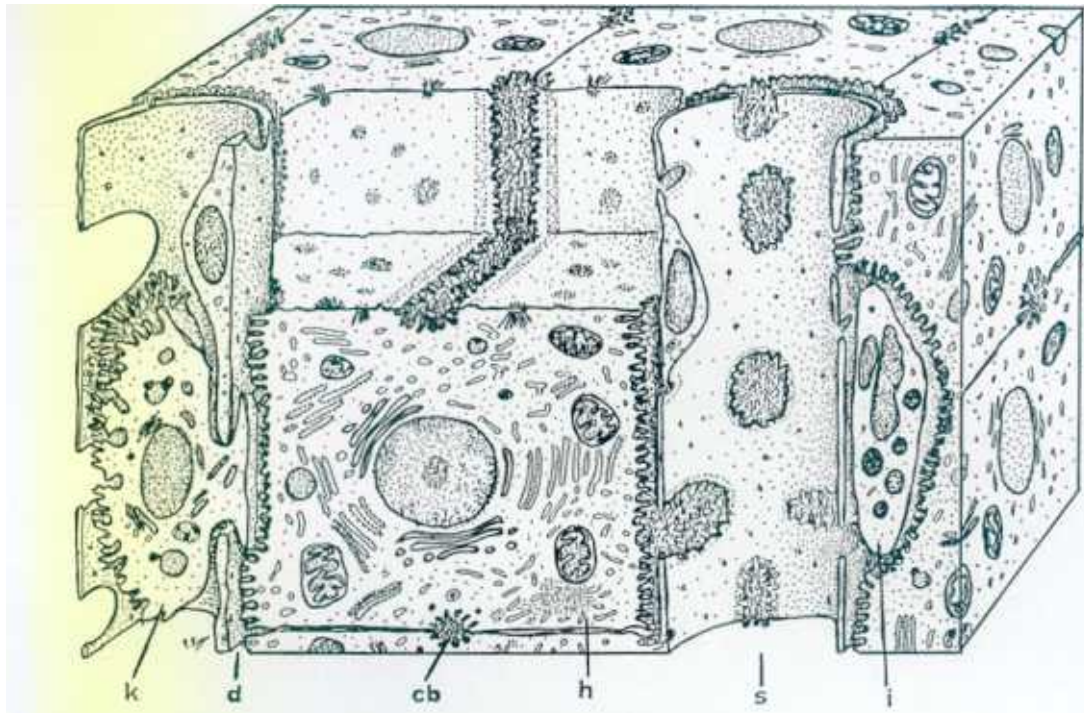
- Fig 4.75.** Tras 30 días de ingerir AZT y 15 de supresión del fármaco se observan pequeñas áreas de tumefacción y vacuolización con algunas mitocondrias alteradas (X 32.000).
- Fig 4.76.** Mitocondrias con estructura intacta junto a otra con cierta desestructuración de sus crestas. Se observa parte de una célula endotelial y un podocito bien conservado (X 40.000).
- Fig 4.77.** Detalle de vacuolización intramitocondrial tras 60 días de ingesta del medicamento (X 15.000).
- Fig 4.78.** Microfotografía que representa una sección de músculo cardiaco captada con análisis de imagen para medir diametro de mitocondrias.



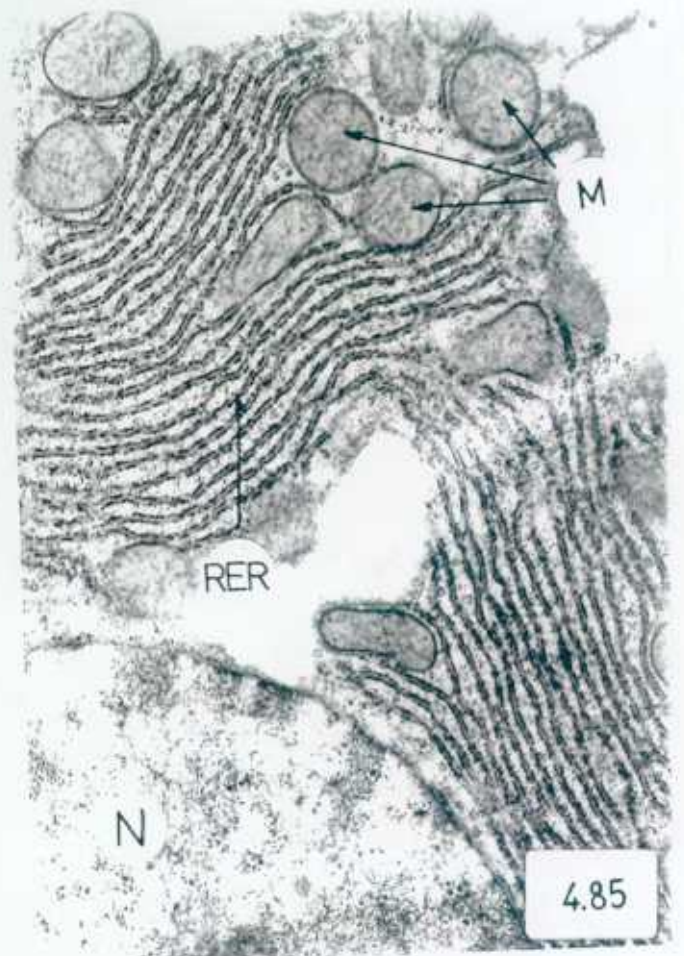
- Fig 4.79.** Microfotografía panorámica de músculo cardíaco. Se observa una estructuración de bandas y líneas similar a los animales del grupo control. Así como las mitocondrias y el núcleo (X 10.000).
- Fig 4.80.** Sección longitudinal de músculo cardíaco de animales que han ingerido AZT 90 días. Los fenómenos de vacuolización mitocondrial son ocasionales (X 12.000).
- Fig 4.81.** Estructura de fibra miocárdica con aspecto semejante a los animales del grupo control, y detalle de banda escaleriforme con multitud de desmosomas con aspecto similar al grupo control (X 12.000).
- Fig 4.82.** Panorámica de músculo cardíaco (120 días de AZT). Los núcleos de 90 y 120 días con AZT presentan una cromatina más laxa (X 8.000).



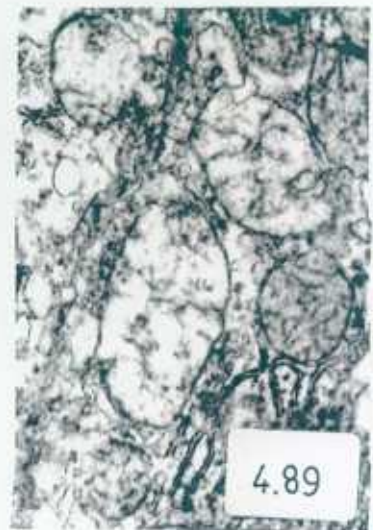
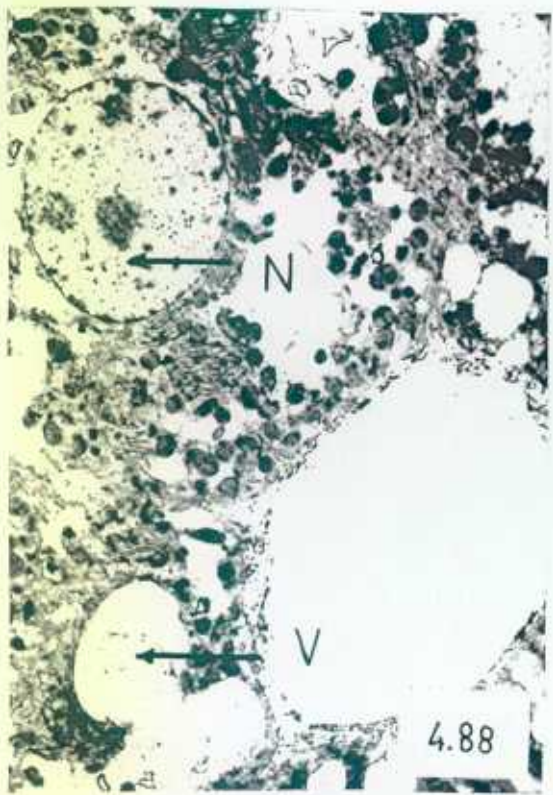
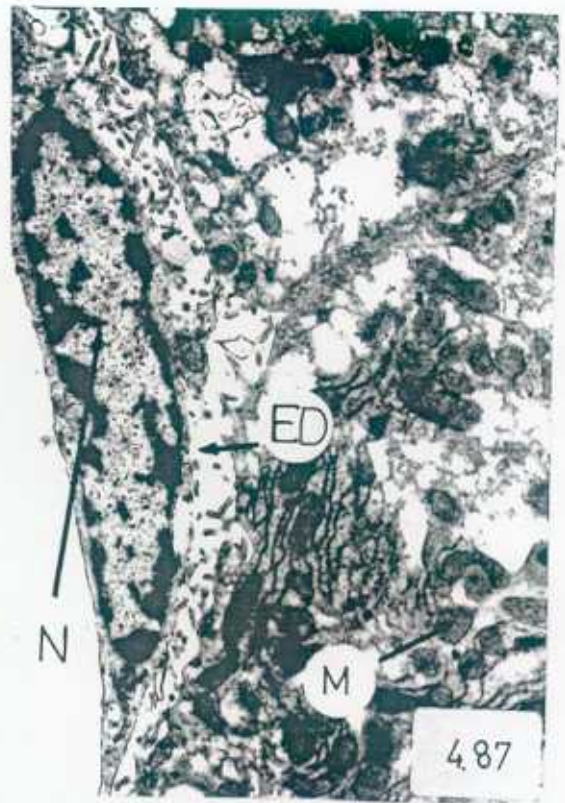
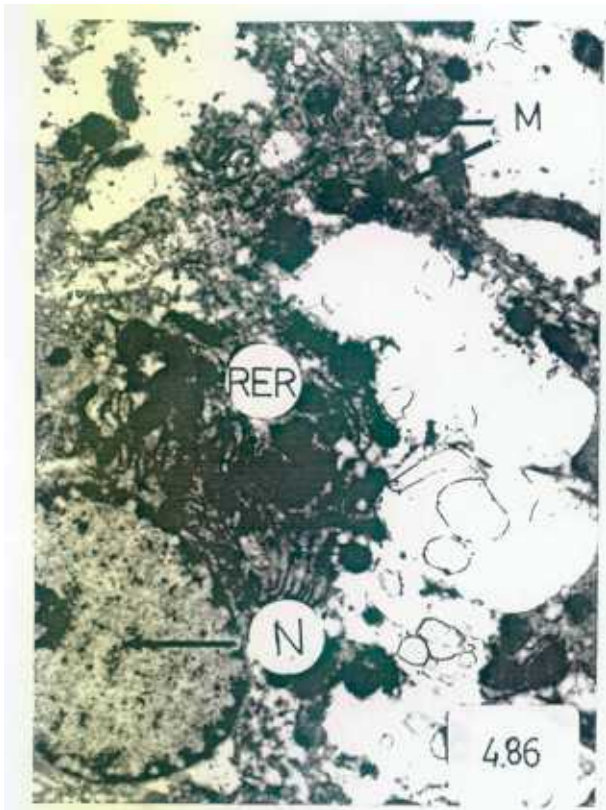
- Fig 4.83.** Esquema de una sección hepática. K= células de Küpffer, d= espacio de Disse, cb= canalículos biliares, h= hepatocito, s= capilares sinusoides, i= células de Ito (con contenido lipídico) o células almacenadoras de grasa. (Tomado de Crrascal, 1988).
- Fig 4.84.** Microfotografía panorámica de hígado procedente de animales del grupo control. En el ángulo superior izquierdo aparece el núcleo de un hepatocito rodeado de retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (M). Limita con otro hepatocito diferenciándose el espacio de Disse (ED) destacando una célula endotelial (X 10.000).
- Fig 4.85.** Hepatocito con un núcleo rodeado de retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (M) con matriz de alta densidad electrónica de aspecto y tamaño normal (X 32.000).



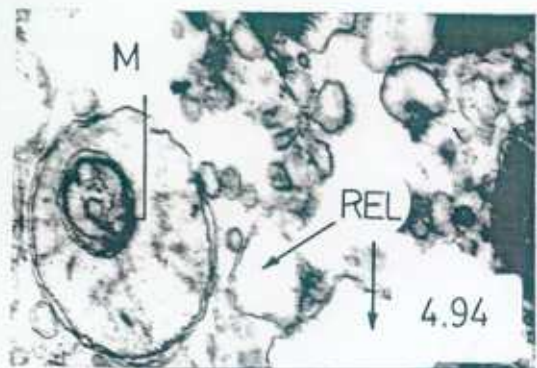
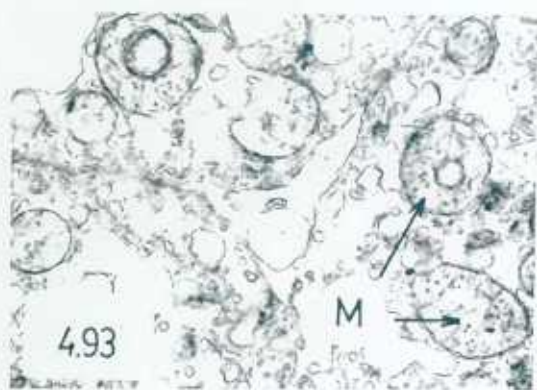
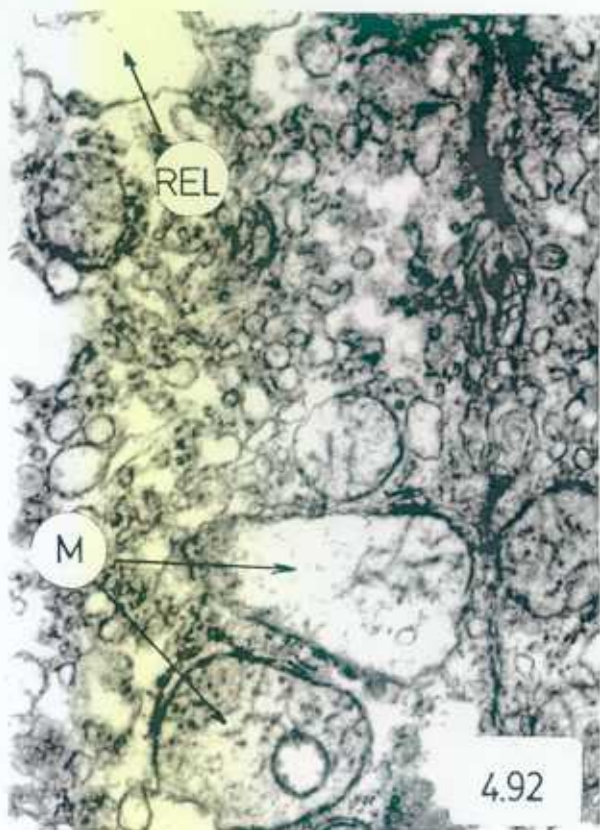
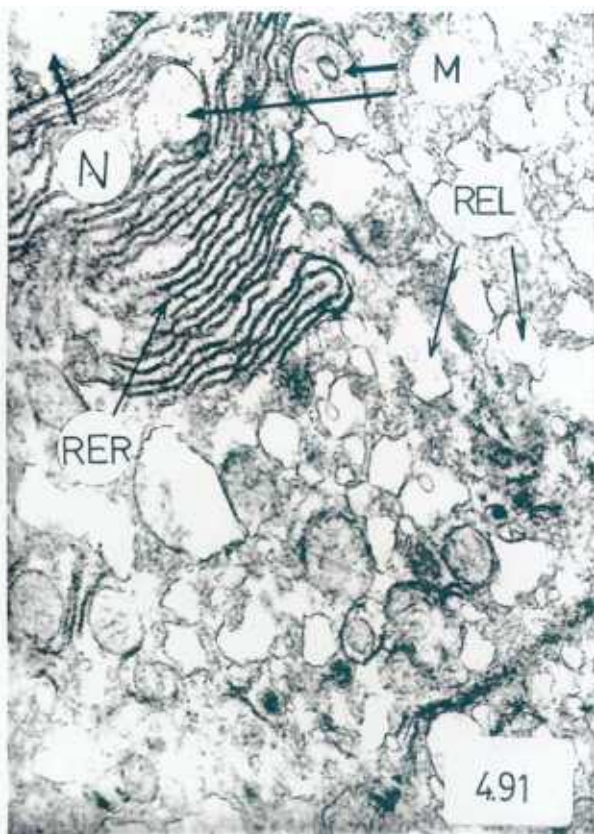
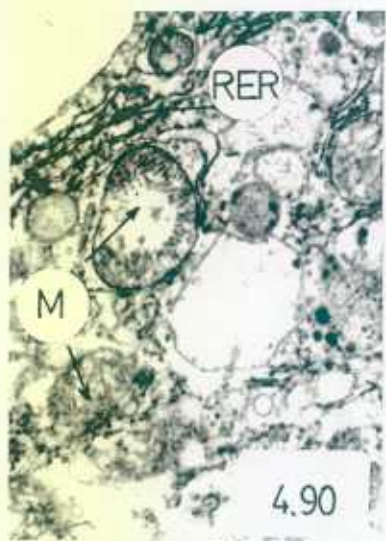
4.83



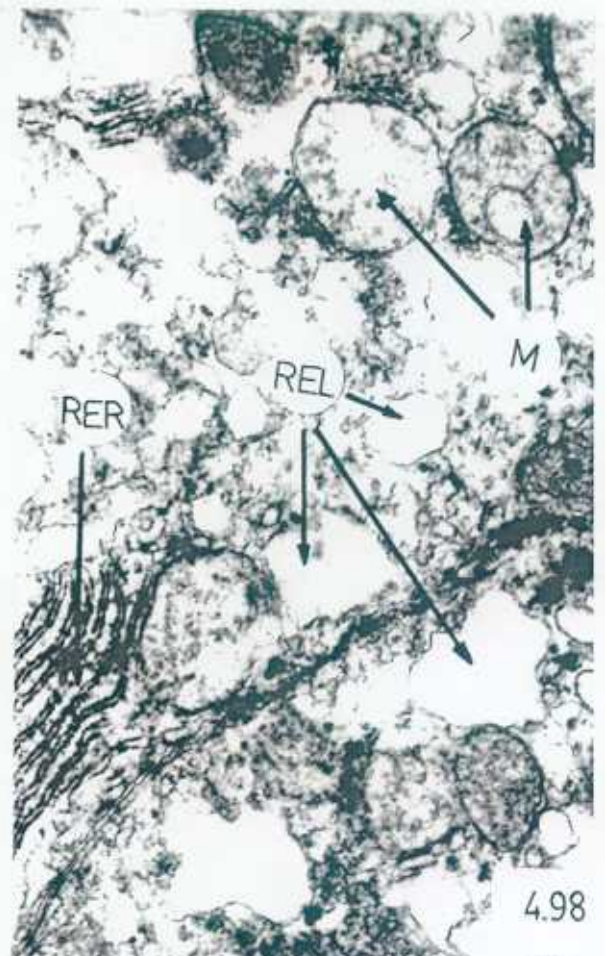
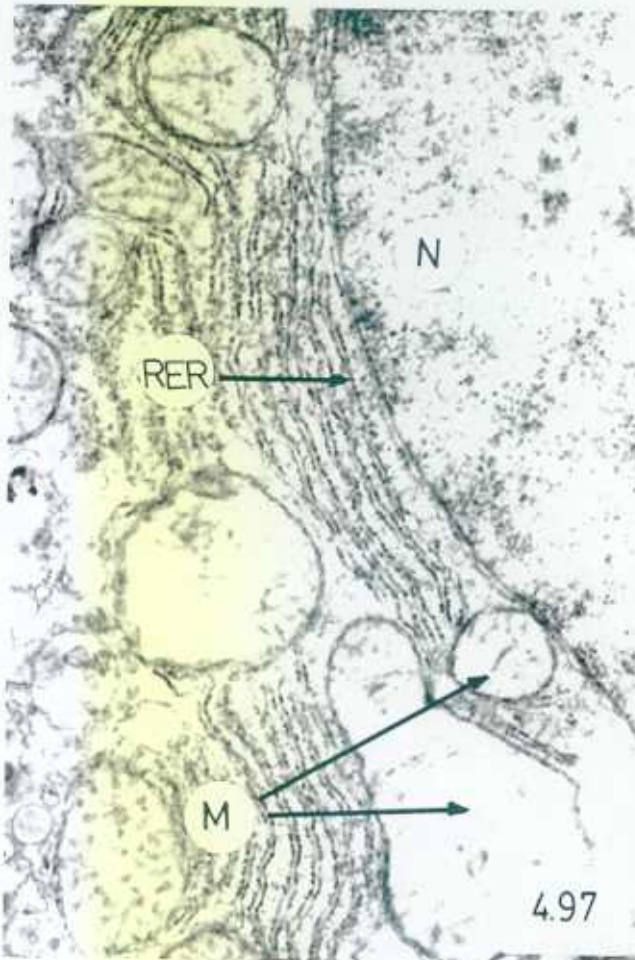
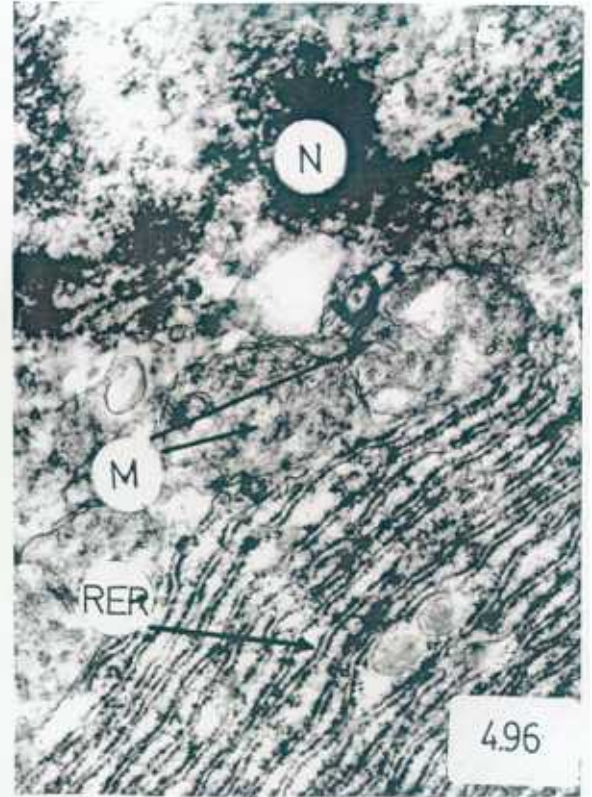
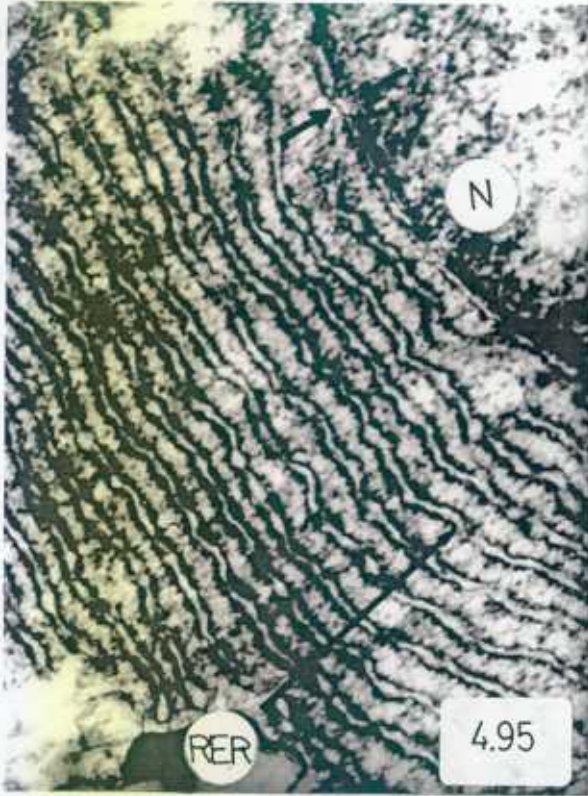
- Fig 4.86.** Hepatocito de rata (AZT 15 días) con núcleo de aspecto normal rodeado de RER y mitocondrias y vacuolas que parece englobar restos de materiales (X 10.000).
- Fig 4.87.** Célula endotelial del hígado de animal que recibió 15 días AZT. La célula endotelial con núcleo (N) alargado y finos constituyentes de la pared del sinusoides. Comunica con el espacio de Disse (ED). Aparece parte de un hepatocito que muestra numerosas mitocondrias (M) (X 12.000).
- Fig 4.88.** Panorámica de varios hepatocitos uno de los cuales contienen vacuolas autofágicas que parecen van a vertir su contenido al sinusoides (X 5.000).
- Fig 4.89.** Detalle de mitocondrias con desestructuración de crestas y matriz de baja densidad electrónica junto a otra con aspecto normal y en su proximidad RER (X 15.000).



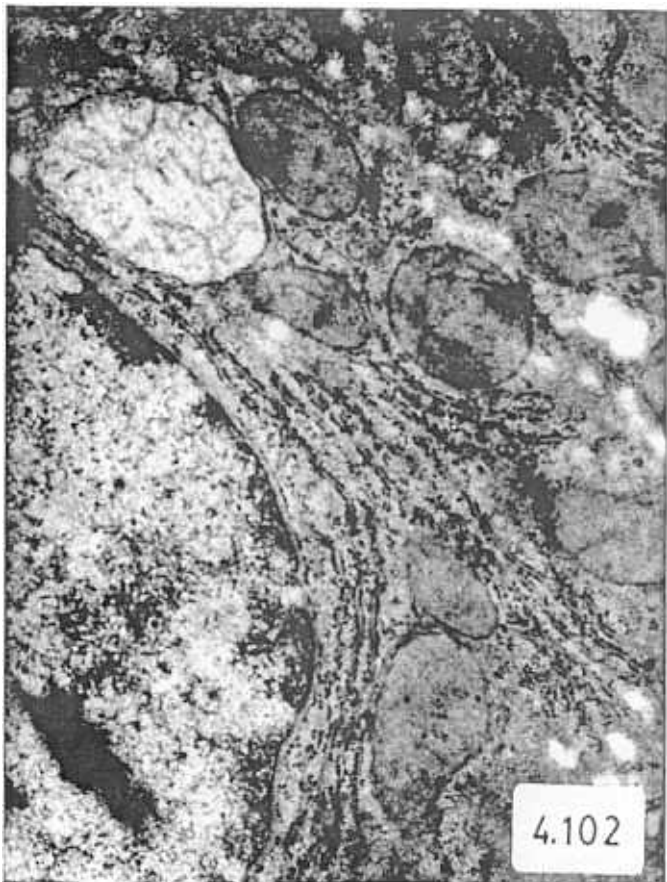
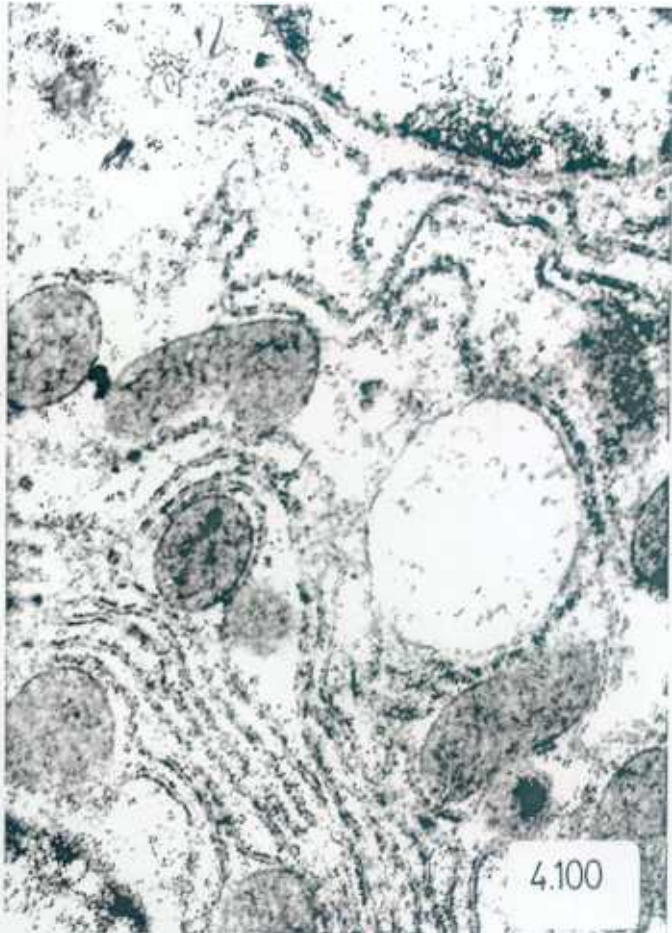
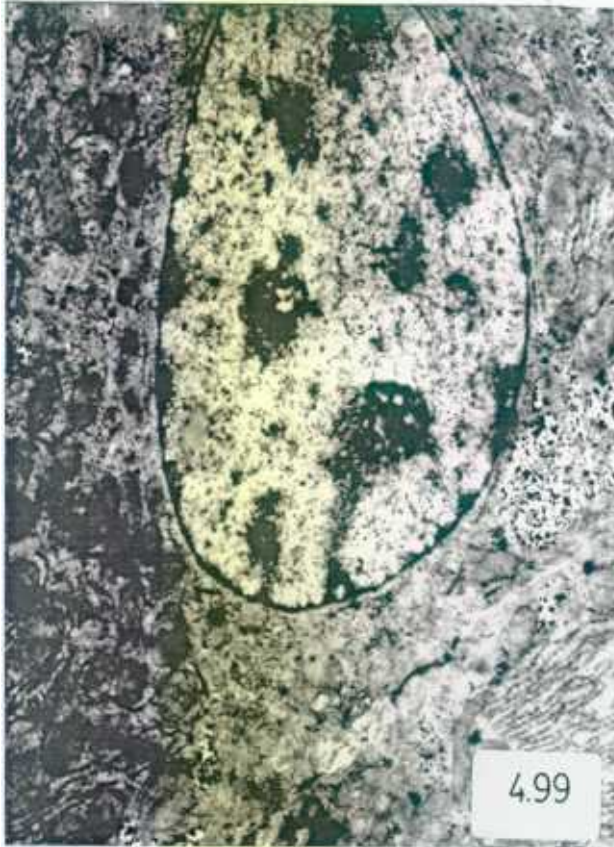
- Fig 4.90.** Aspecto de una mitocondria con matriz de baja densidad electrónica y retracción de crestas hacia la membrana externa. Retículo endoplásmico rugoso (RER) con aspecto semejante al grupo control (X 15.000).
- Fig 4.91.** Microfotografía que muestra parte de un hepatocito balonizado. En su citoplasma se ven numerosas vesículas o vacuolas de retículo endoplásmico liso, con un retículo endoplásmico rugoso (RER) de morfología intacta (X 15.000).
- Fig 4.92.** Detalle de dilatación de retículo endoplásmico liso (REL) y mitocondrias con diferentes aspectos (X 23.000).
- Fig 4.93.** Mitocondrias con alteraciones morfológicas y vacuolas autofágicas que engloban mitocondrias (X 12.000).
- Fig 4.94.** Retículo endoplásmico liso de un hepatocito perteneciente a un animal que ha ingerido 0 días AZT se observa una dilatación y vacuola autofágica que contiene una mitocondria (X 30.000).



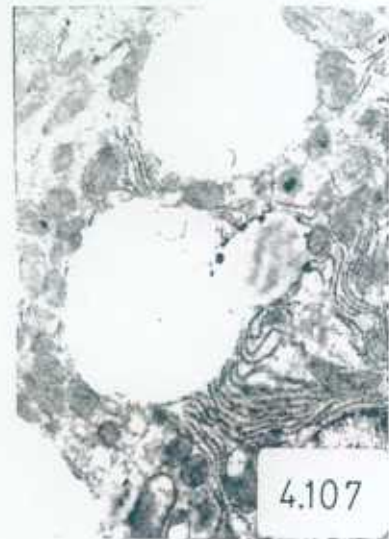
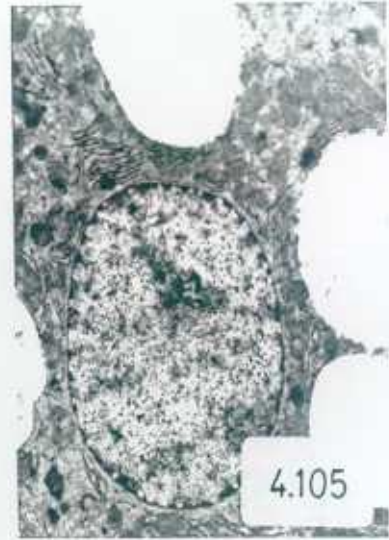
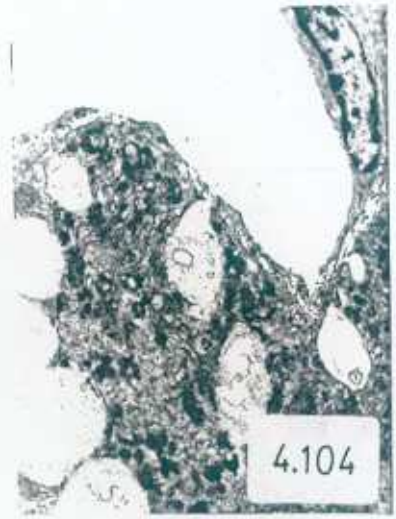
- Fig 4.95.** Microfotografía del núcleo de un hepatocito en el que se observa la doble membrana y algunos poros nucleares (1) rodeado del RER apilado y con dilatación intercisternal en comparación con los animal que forman el grupo control (X 60.000).
- Fig 4.96.** Hepatocito en el que se aprecia parte de un núcleo (N) y mitocondrias con crestas desestructuradas. Retículo endoplásmico rugoso (RER) dilatado parcialmente en algunos puntos (X 40.000).
- Fig 4.97.** Mitocondrias que poseen matriz de baja densidad electrónica y escasas crestas junto a un RER de aspecto similar al de animales del grupo control (X 24.000).
- Fig 4.98.** Dilatación del REL, junto a RER algo comprimido y mitocondrias con alteraciones morfológicas de diferentes aspectos (X 24.000).



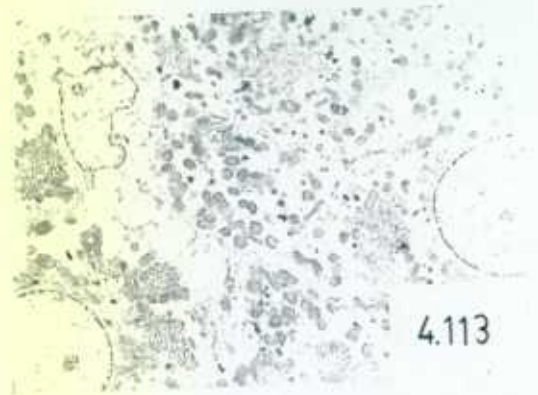
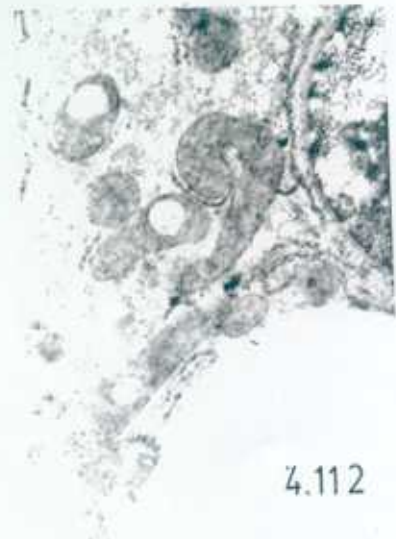
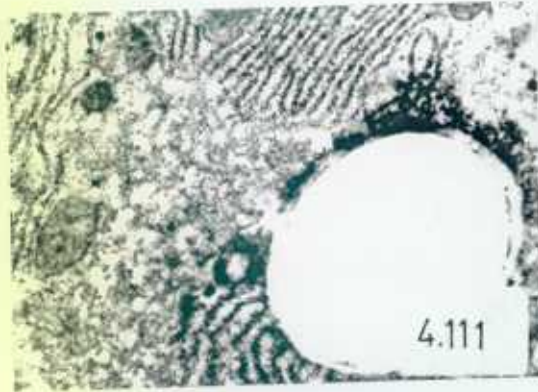
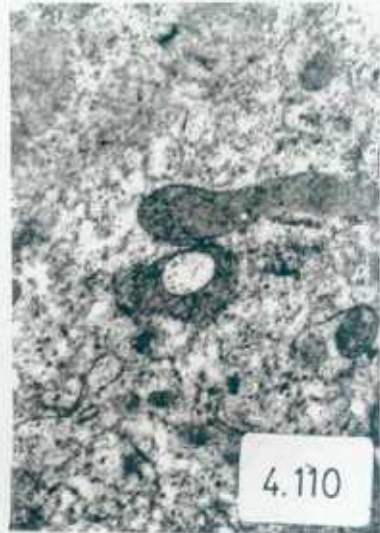
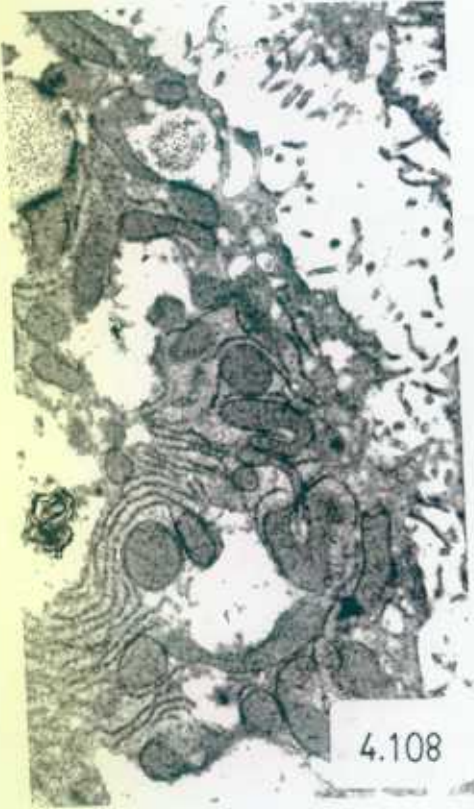
- Fig 4.99.** Microfotografía de célula hepática (60 días AZT) donde se aprecia el núcleo (N) con la cromatina dispuesta en grumos y donde se aprecian dos organizadores nucleolares. Se observan además mitocondrias (M) y retículo endoplásmico rugoso (RER) (X 12.000).
- Fig 4.100.** Detalle de hepatocito en el que destaca alguna mitocondria con matriz debaja densidad electrónica y gran tamaño junto a otras que poseen un aspecto similar a las de los animales procedentes del grupo control (X 24.000).
- Fig 4.101.** Necrosis biliar en el citoplasma de un hepatocito de animales que han ingerido 60 días consecutivos AZT (X 17.000).
- Fig 4.102.** Hepatocito que contiene alguna mitocondria alterada junto a otras con aspecto semejante a los controles (X 28.000).



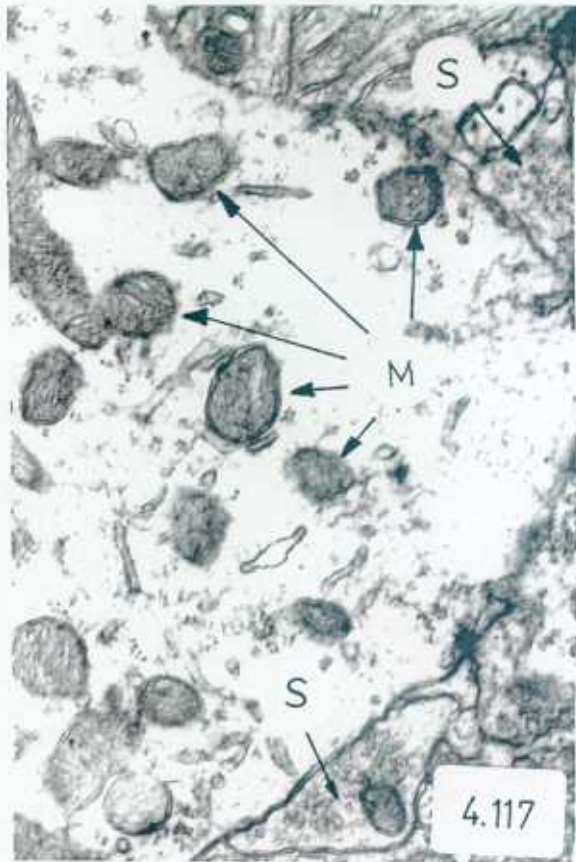
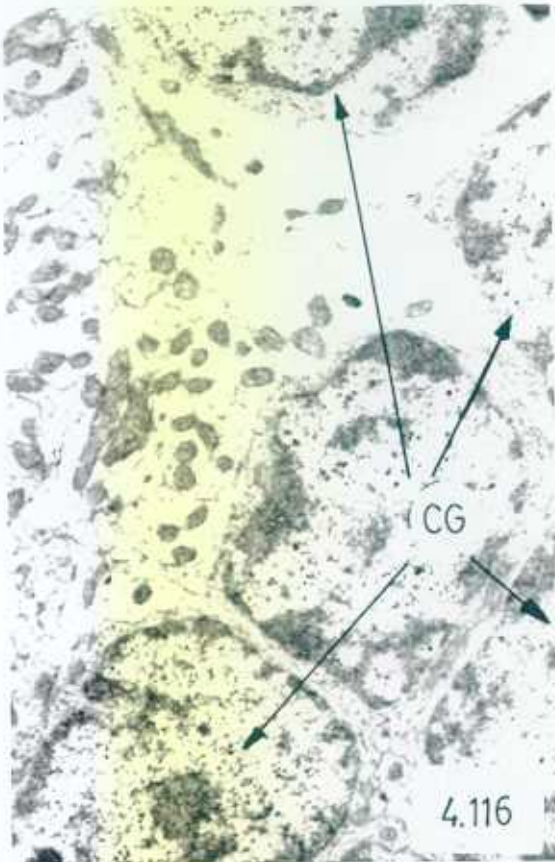
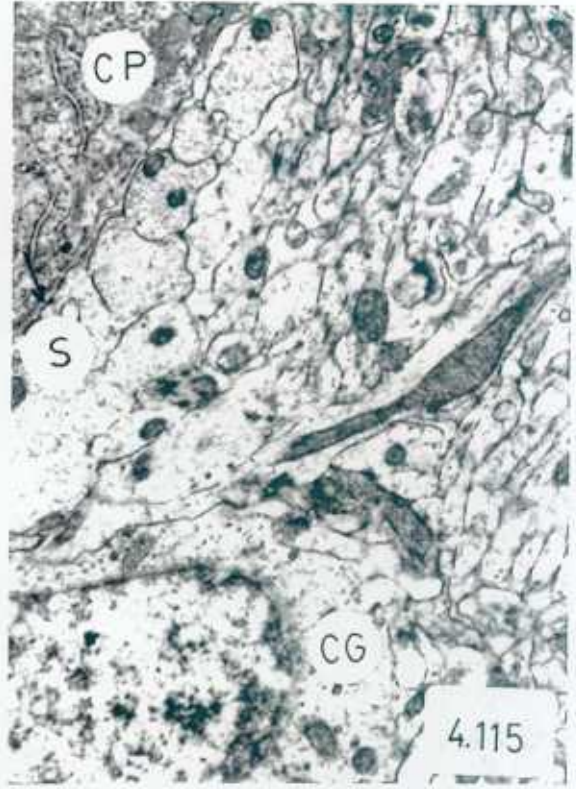
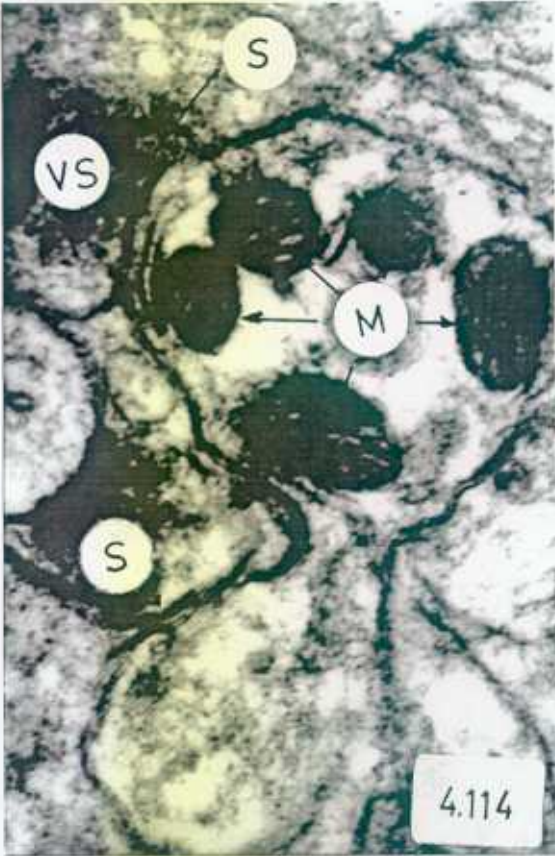
- Fig 4.103.** Hepatocitos en cuyo citoplasma se observan vacuolas que vierten su contenido al exterior (X 13.000).
- Fig 4.104.** Detalle de vacuolas (V) en hepatocitos en distinto grado (X 4.000).
- Fig 4.105.** Hepatocito con núcleo de aspecto similar al grupo control y en cuyo citoplasma se aprecian grandes vacuolas de gran tamaño (X 5.000).
- Fig 4.106.** Vacuolas citoplasmáticas (V) de un hepatocito de animal que ha ingerido 90 días AZT. Núcleo (N) y M= mitocondrias presentan aspecto semejante a los controles. En las proximidades de las vacuolas aparece una compresión del RER (X 19.000).
- Fig 4.107.** Porción de un hepatocito con vacuolas de gran tamaño una de las cuales tiene adherida una gota lipídica. Mitocondrias con aspecto morfológico similar a las de los animales del grupo control (X 7.000).



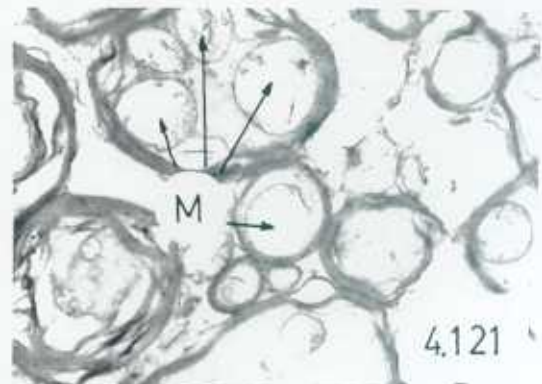
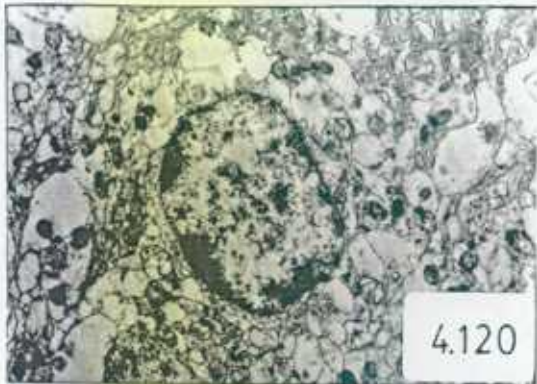
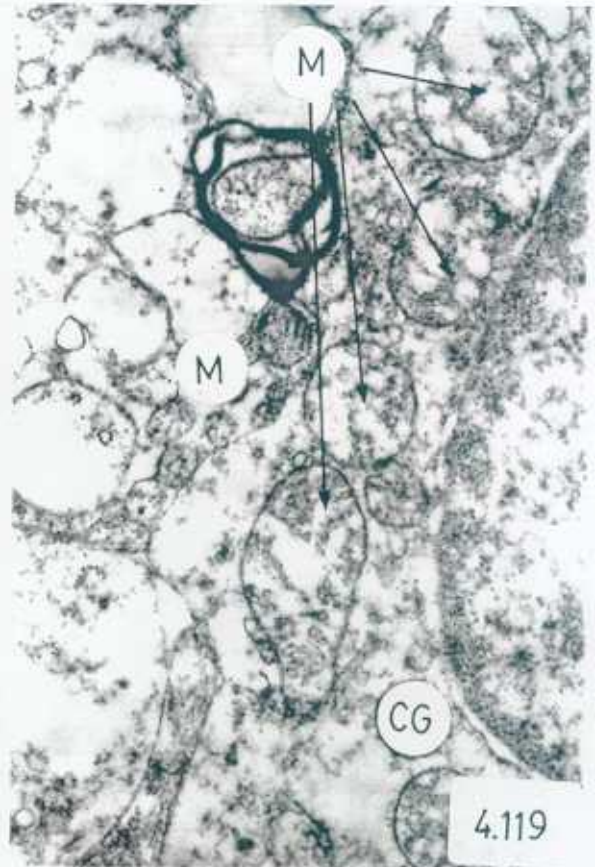
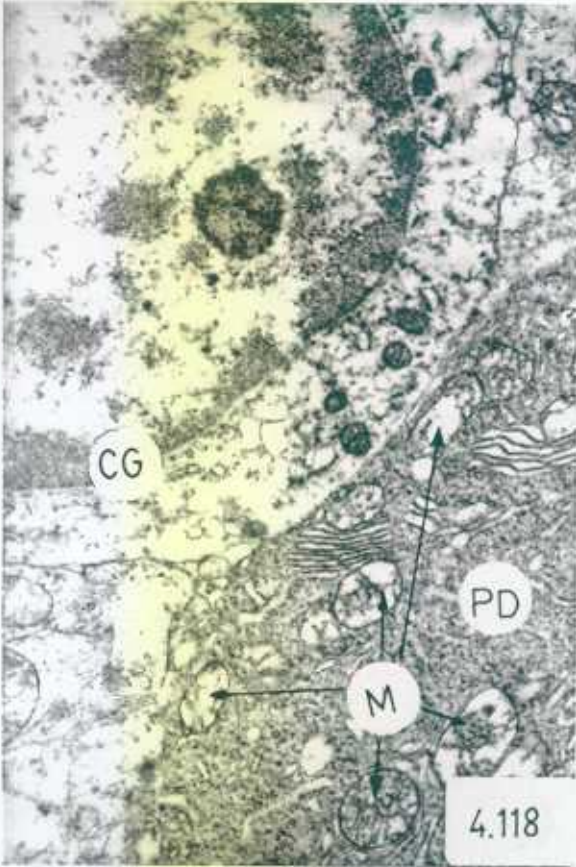
- Fig 4.108.** Detalle de mitocondrias de un hepatocito con aspecto semejante a las de los animales del grupo control y figura de tipo mielínico en las proximidades al RER (X 8.000).
- Fig 4.109.** Hepatocito binucleado con gran vacuola que comprime a uno de los nucleos (X 5.000).
- Fig 4.110.** Mitocondrias con alteración en su interior (X 12.000).
- Fig 4.111.** Vacuola en el citoplasma de un hepatocito de rata (120 días AZT) (X 12.000).
- Fig 4.112.** Célula hepática con mitocondrias con inclusiones y otras de aspecto similar a las de hepatocitos del grupo control (X 12.000).
- Fig 4.113.** Panorámica de hígado de rata (120 días de AZT) donde se aprecian gotas de lípidos (X 2.500).



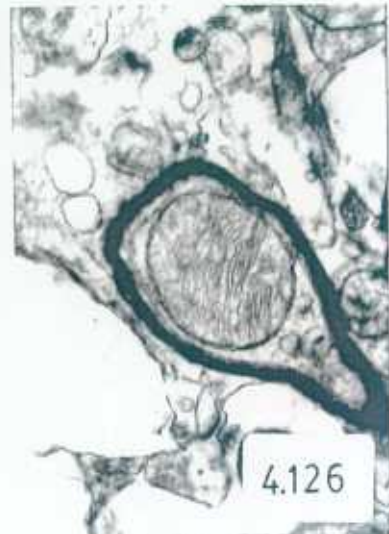
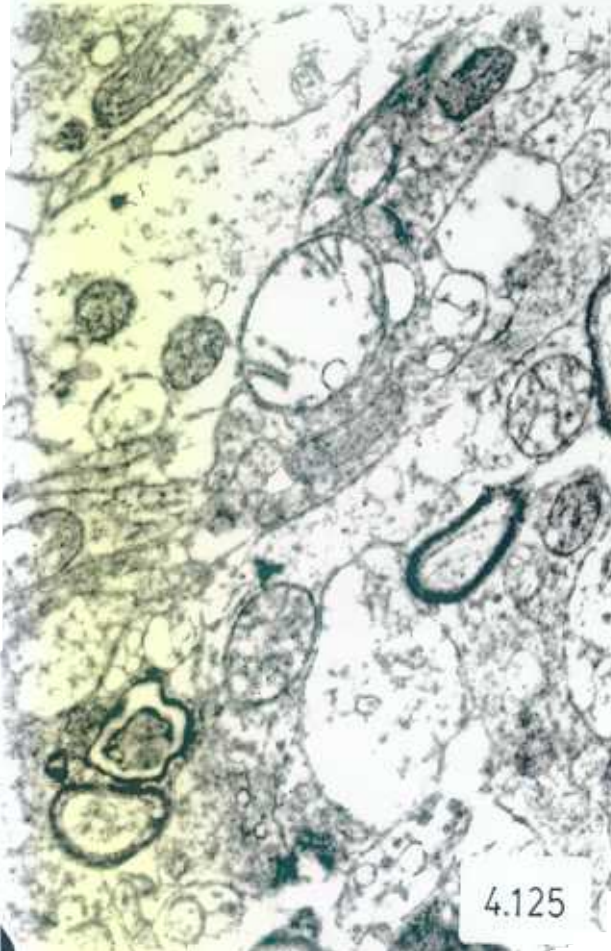
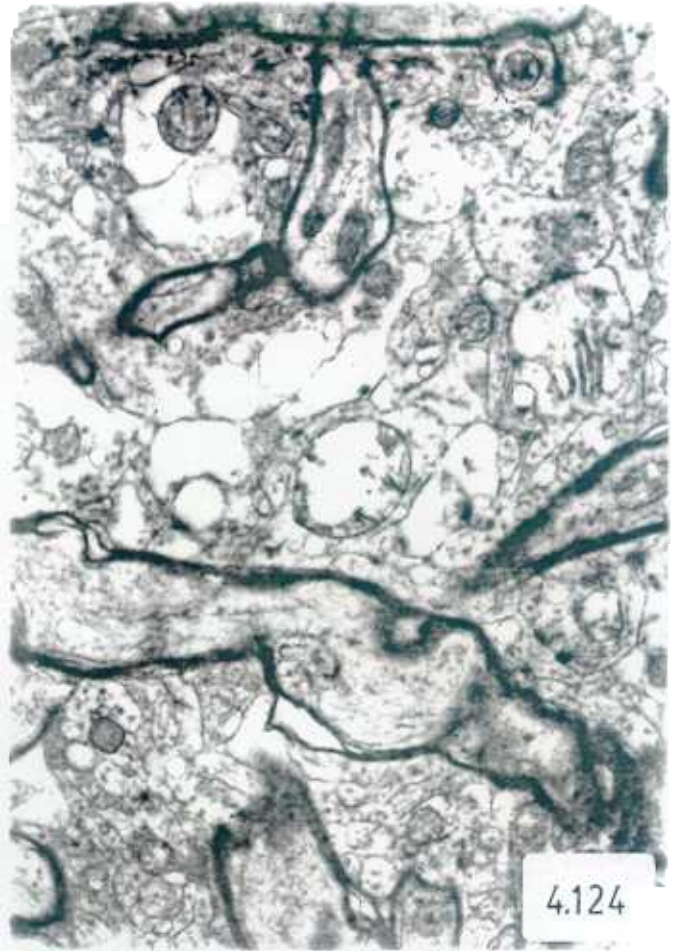
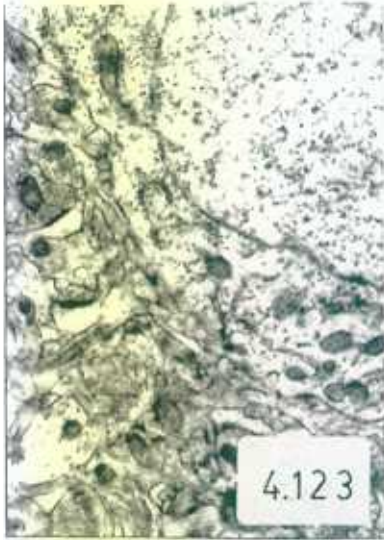
- Fig 4.114.** Sinapsis de una fibra musgosa donde las mitocondrias postsinápticas no presentan alteraciones estructurales (VS= vesículas sinápticas, M= mitocondrias) (X 60.000).
- Fig 4.115.** Se observa un citoplasma de célula de Purkinje (CP) con zonas sinápticas sobre él. Una célula grano (CG) y numerosas mitocondrias sin alteraciones morfológicas (X 18.000).
- Fig 4.116.** Grupo de células grano (CG) procedentes de cerebelo de animales del grupo control con sus núcleos y citoplasmas carentes de alteraciones y numerosas mitocondrias pertenecientes a dendritas y fibras nerviosas que no presentan alteraciones estructurales (X 12.000).
- Fig 4.117.** Microfotografía que contiene numerosas mitocondrias. Ratas procedentes del grupo control. S= sinapsis, M= mitocondrias) (X 40.000).



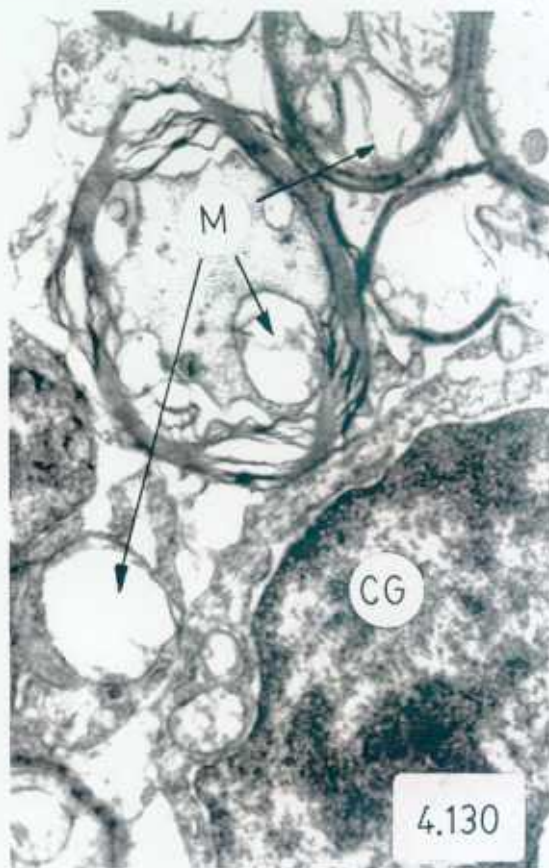
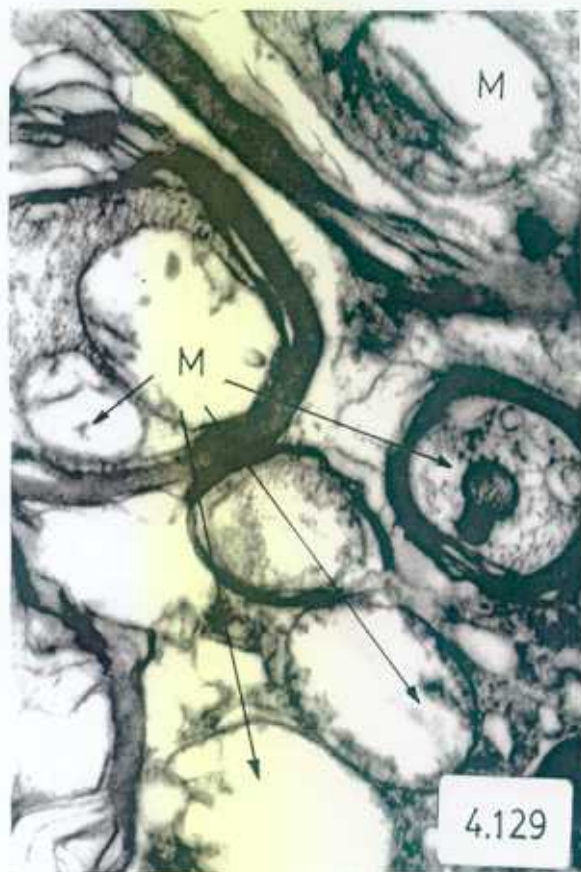
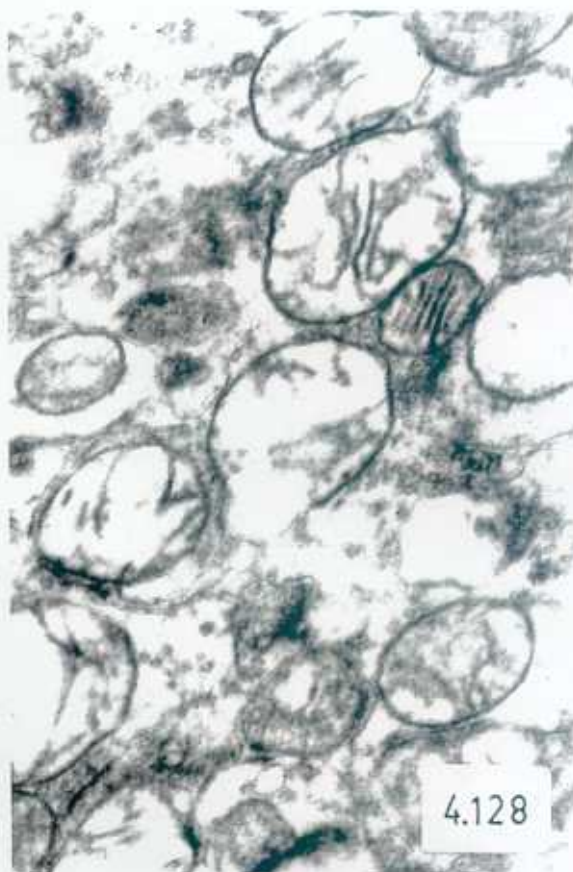
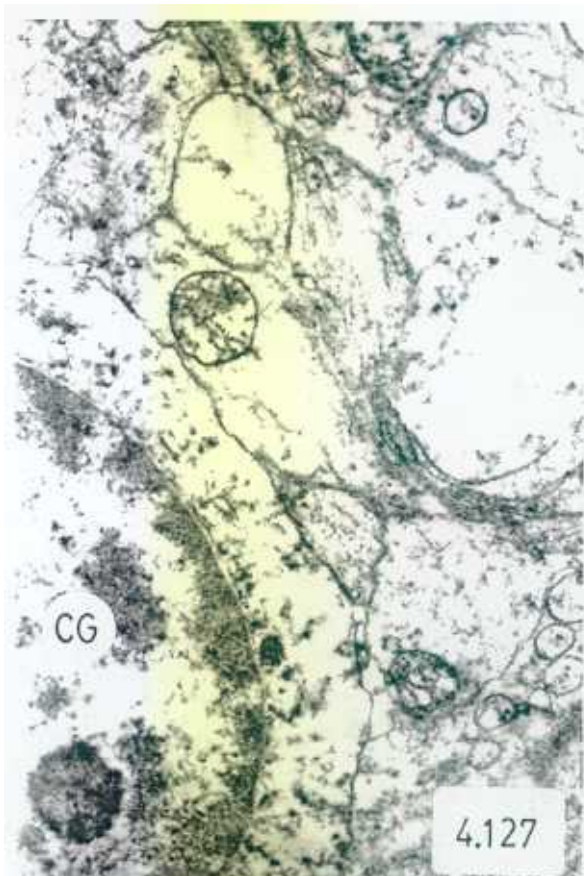
- Fig 4.118.** Microfotografía que muestra una célula grano (CG) y una célula de Purkinje. En la CG se observa un ligero edema intracitoplasmático y en la dendrita de la CP (PD) se ven numerosas mitocondrias en las que destaca una matriz de densidad electrónica menor que las que constituyen el grupo control y disminución y desestructuración de las crestas mitocondriales. (30 días AZT) (X 20.000).
- Fig 4.119.** Célula grano (CG) que contiene mitocondrias con alteraciones ultraestructurales (X 28.000).
- Fig 4.120.** Célula grano con edema intracitoplasmático (X 6.000).
- Fig 4.121.** Detalle de fibras mielínicas en cuyo interior aparecen mitocondrias con pocas crestas y matriz de baja densidad electrónica (X 9.000).
- Fig 4.122.** Microfotografía que contiene una célula grano (CG) y una célula de Purkinje (CP) con aspecto similar al grupo control (X 20.000).



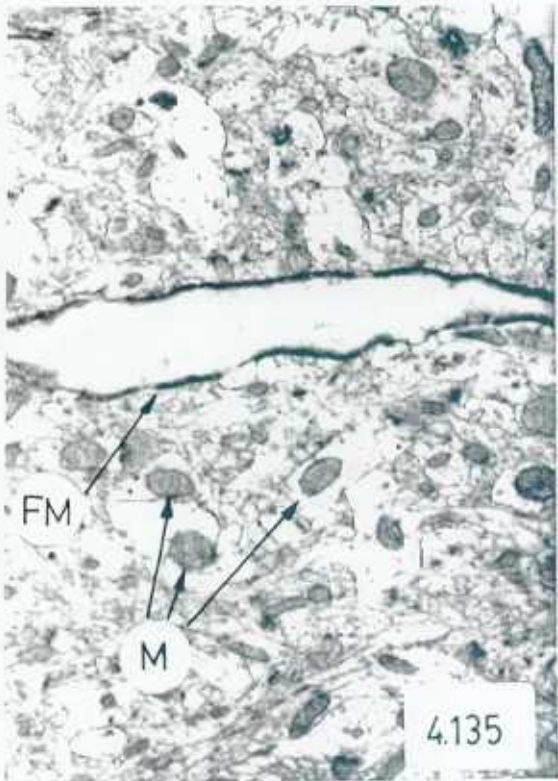
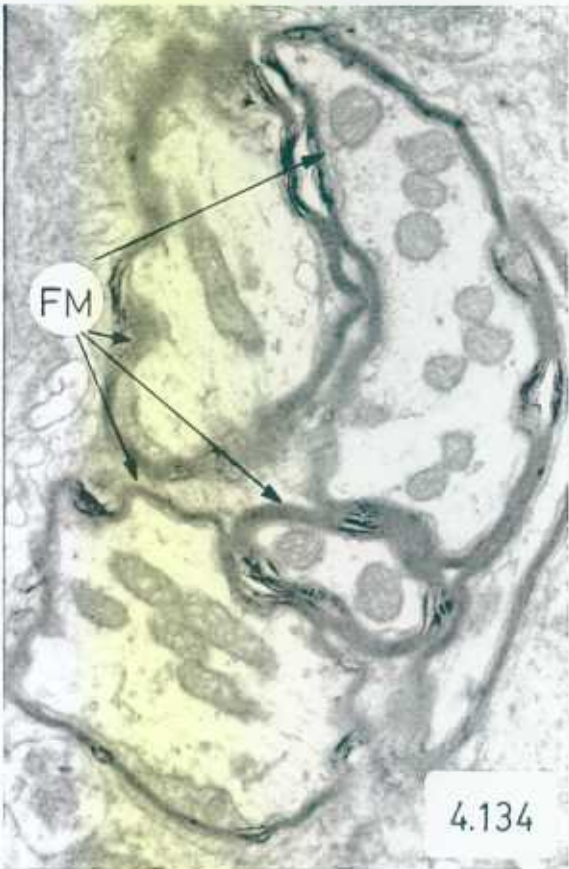
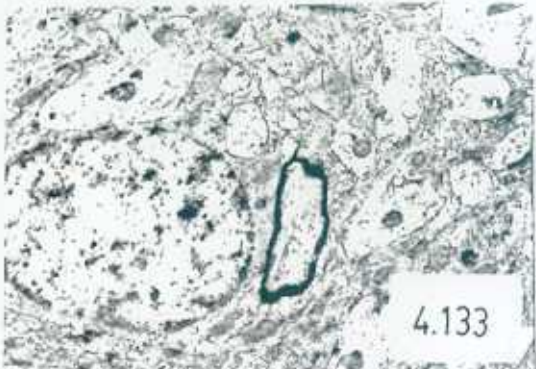
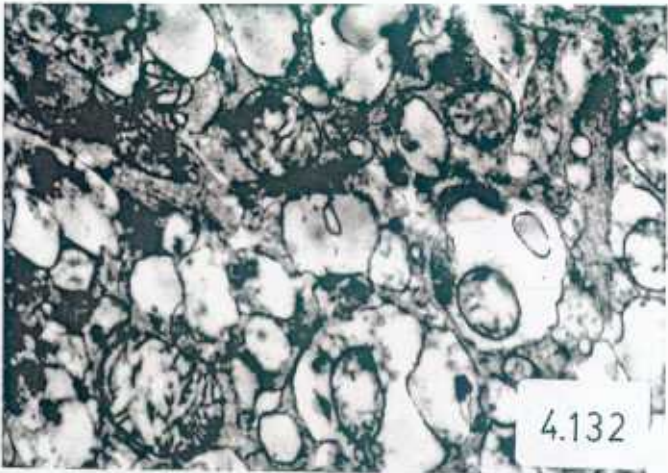
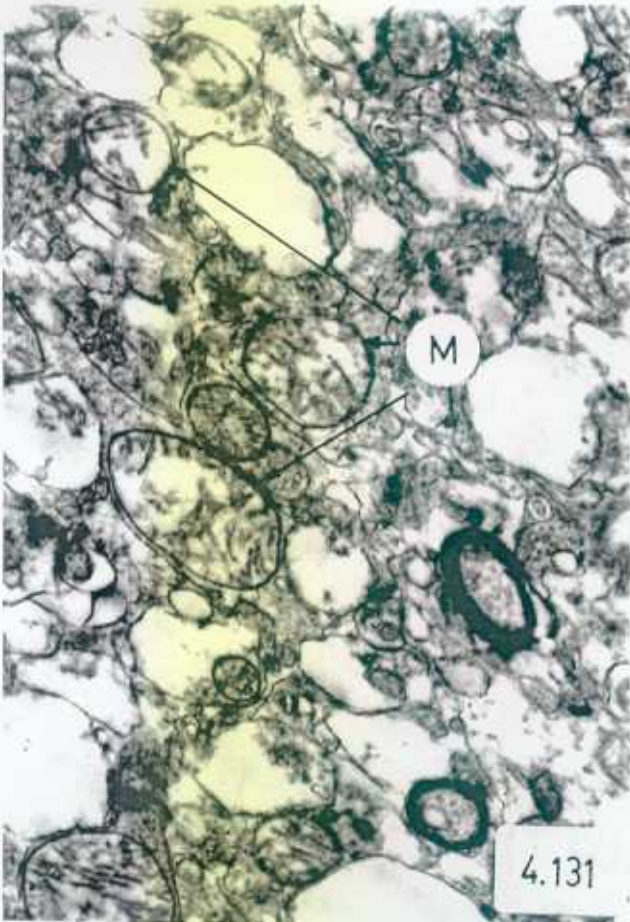
- Fig 4.123.** Microfotografía de sección de cerebro de un animal del grupo control (X 12.000).
- Fig 4.124.** Sección cerebral de animal que ha ingerido 30 días AZT donde se aprecian mitocondrias (M) con escasas crestas y retracción de las mismas hacia la membrana junto a otras con morfología semejante a los animales del grupo control. Ligero edema intracitoplasmático (X 16.000).
- Fig 4.125.** Mitocondrias (M) con distintos aspectos morfológicos y edema intracitoplasmático (X 24.000).
- Fig 4.126.** Detalle de fibra mielínica con mitocondria de morfología semejante a los animales del grupo control (X 30.000).



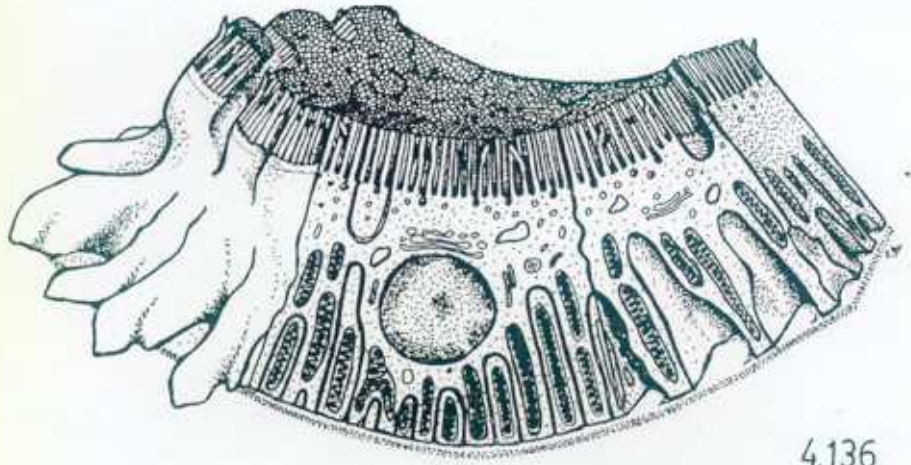
- Fig 4.127.** Célula grano (CG) estructuralmente semejante a las que constituyen el grupo control y numerosas mitocondrias con alteraciones morfológicas ultraestructurales (X 20.000).
- Fig 4.128.** Detalle de gran cantidad de mitocondrias que presentan disminución y ausencia de crestas junto a otras que se conservan indemnes cerebro (X 50.000).
- Fig 4.129.** Fibras nerviosas mielínicas en cuyo interior se aprecian mitocondrias (M) con escasas crestas y matriz de baja densidad electrónica y alguna con estructura morfológica como las de los animales del grupo control (X 30.000).
- Fig 4.130.** Microfotografía de animales que han ingerido AZT donde se distingue una célula Glial (CG) en cuyo citoplasma se observan mitocondrias alteradas (M). Se ven fibras mielínicas que contienen mitocondrias con pocas crestas (X 16.000).



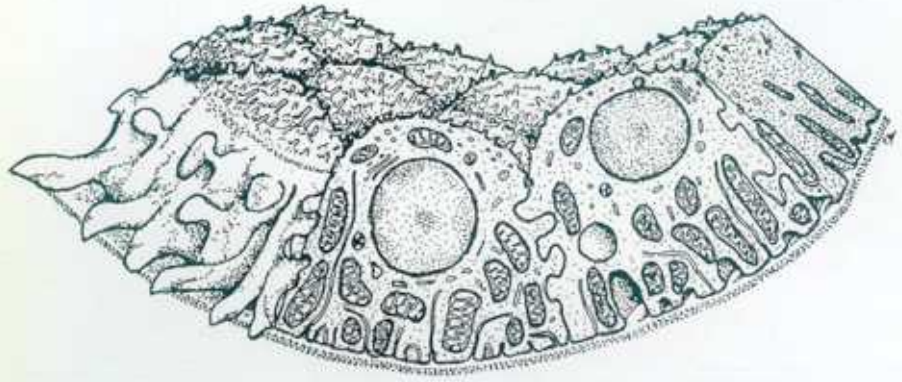
- Fig 4.131.** Se observan numerosas mitocondrias que presentan disminución y ausencia de crestas. También se ven prolongaciones neuronales con edema (X 20.000).
- Fig 4.132.** Detalle de mitondria con alteraciones similar a las anteriormente descritas (X 18.000).
- Fig 4.133.** Panorámica de cerebro de rata de neuronas de capa VI y prolongociones neuronales con edema y alteración de crestas mitocondriales (X 8.000).
- Fig 4.134.** Fibras nerviosas mielínicas donde aparecen mitocondrias con estructuras morfológicas practicamente normales (X 19.000).
- Fig 4.135.** Sección de cerebro de animal que ha ingerido 120 días AZT con fibras mielínicas (FM) y mitocondrias (M)de aspecto similar al grupo control (X 14.000).



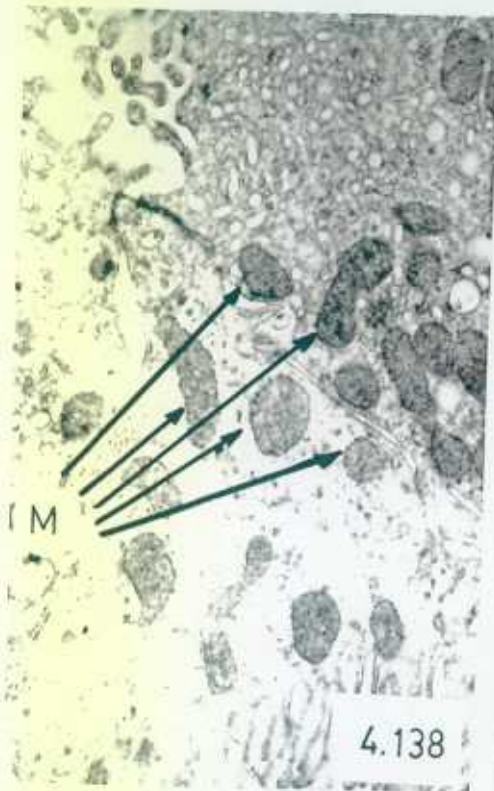
- Fig 4.136.** Esquema de tubo contorneado proximal de riñón. Sus células presentan en el borde libre algunas microvellosidades. En las caras laterales se producen interdigitaciones que se proyectan en la cara basal en la que se observan numerosas mitocondrias en forma de bastón. El núcleo es esférico y está rodeado de un pequeño aparato de Golgi. (Tomado de Carrascal, 1988).
- Fig 4.137.** Representación gráfica del túbulo contorneado distal, donde se observan células epiteliales más redondeadas y con algunas interdigitaciones. En el borde libre se aprecian microvellosidades. Las mitocondrias se localizan en mayor número en la zona basal. (Tomado de Carrascal, 1988).
- Fig 4.138.** Detalle de microfotografía electrónica de riñón de rata del grupo control donde aparecen mitocondrias en dos células contiguas (M) perfectamente estructuradas con diferente aspecto unas circulares y otras alargadas con matriz de alta densidad electrónica (X 18.000).
- Fig 4.139.** Microfotografía de células de túbulo contorneado de riñón de animales del grupo control con morfología sin alteraciones. Se aprecian ribosomas repartidos por el citoplasma. Algunos orgánulos de secreción redondeados homogéneos y osmiofílicos (X 12.000).



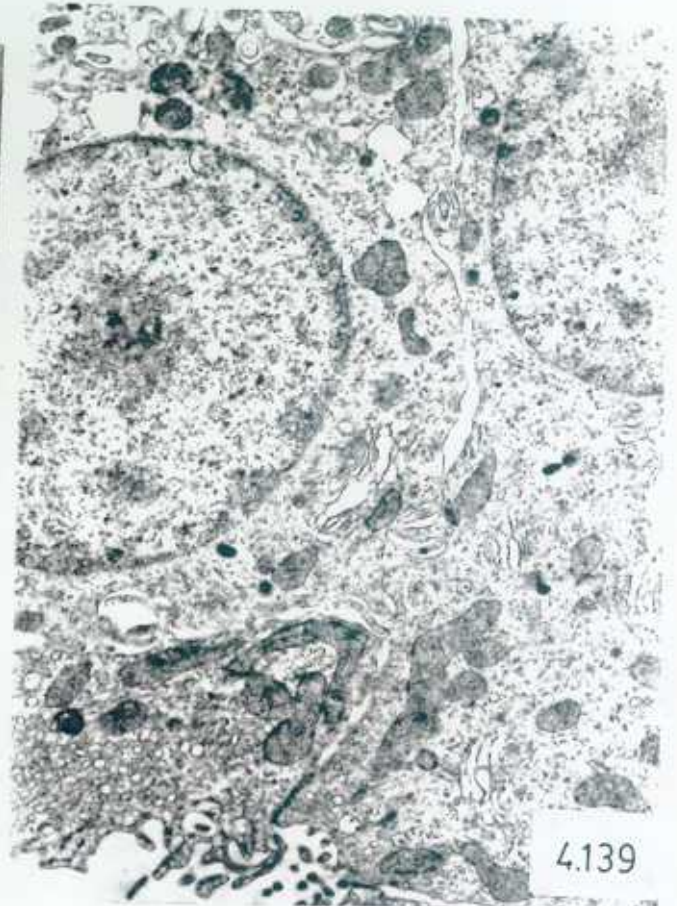
4.136



4.137

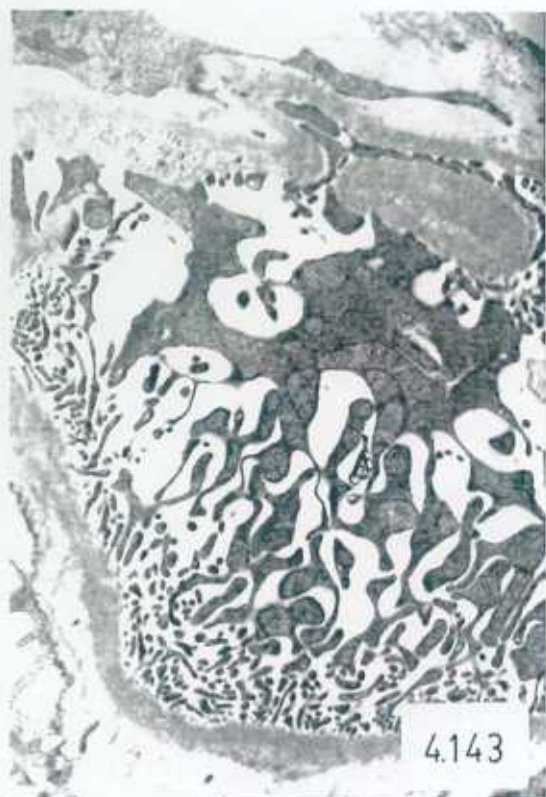
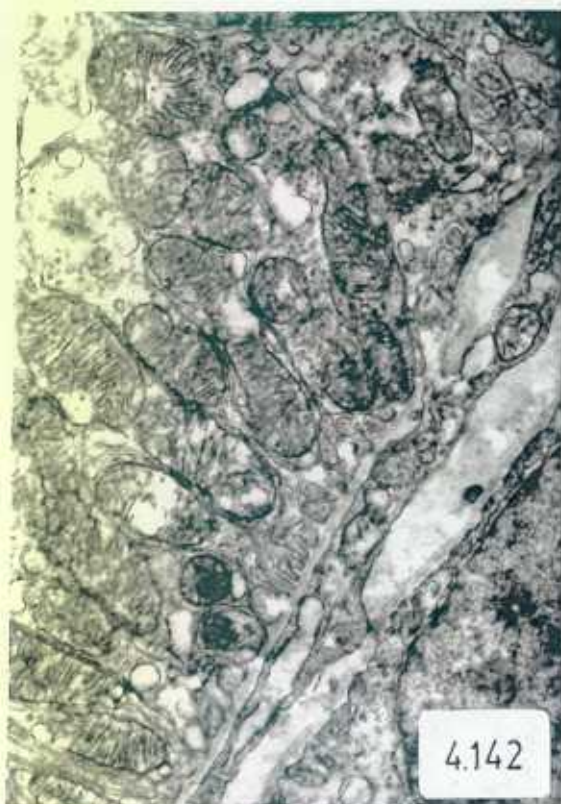
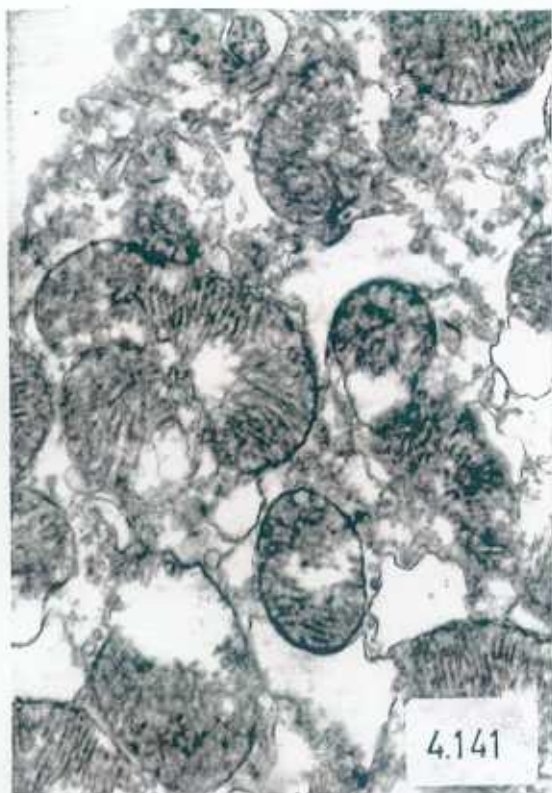
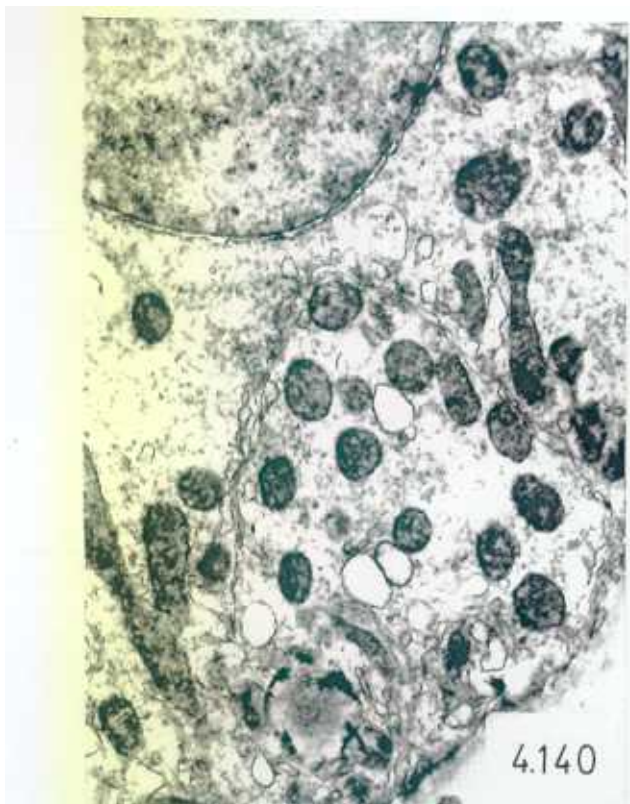


4.138

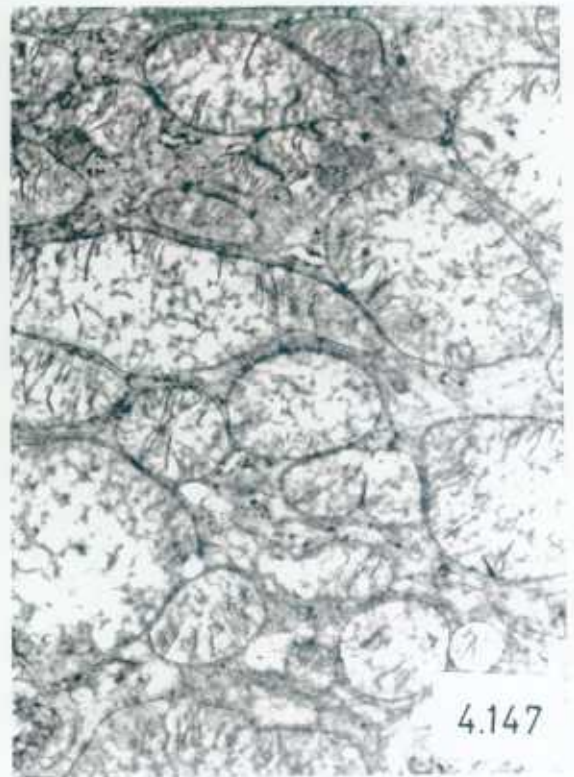
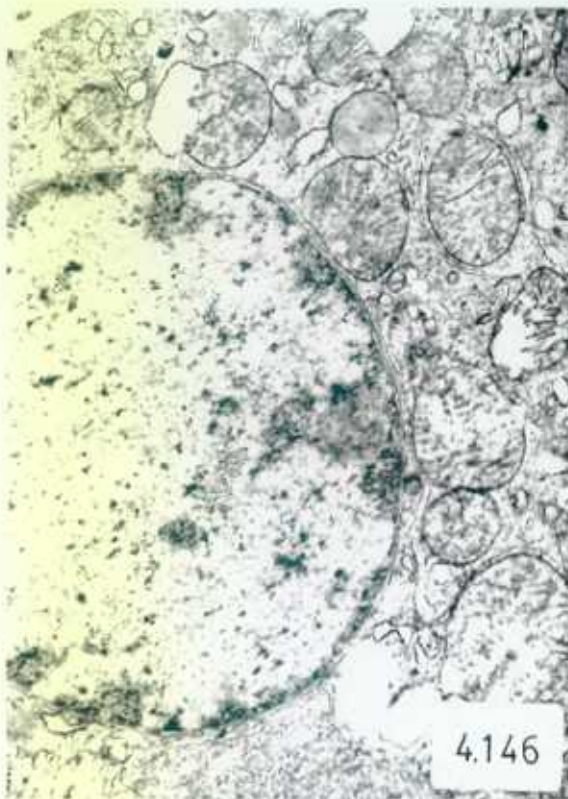
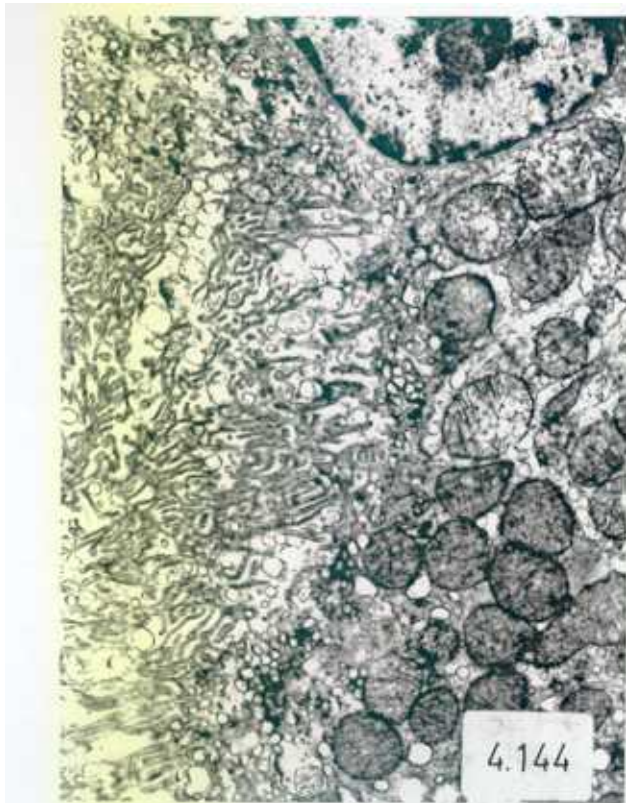


4.139

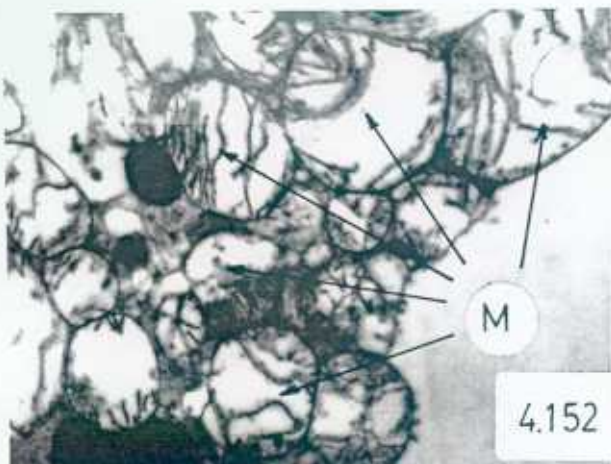
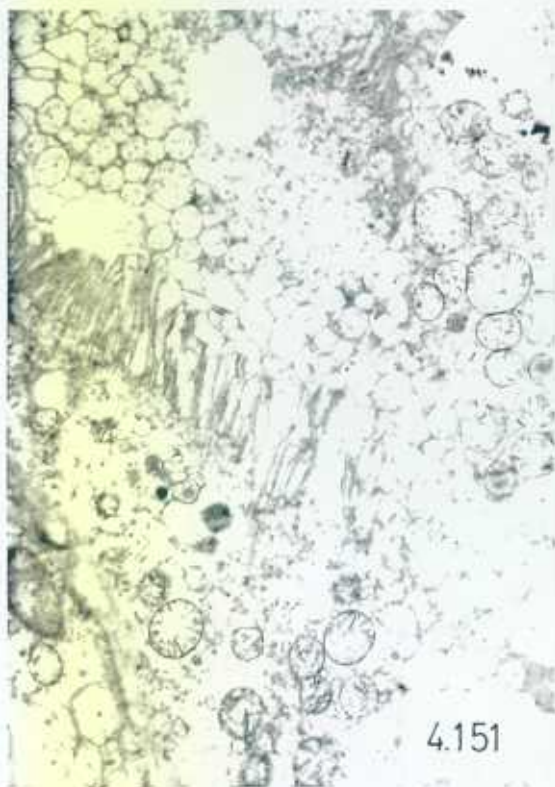
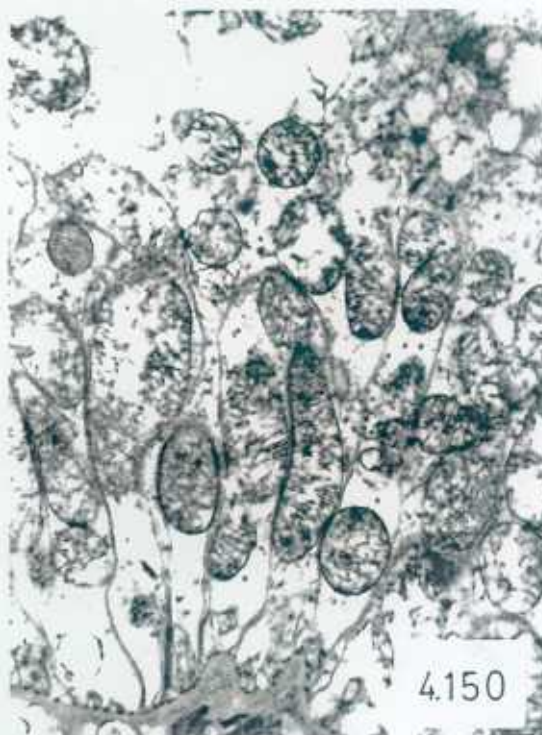
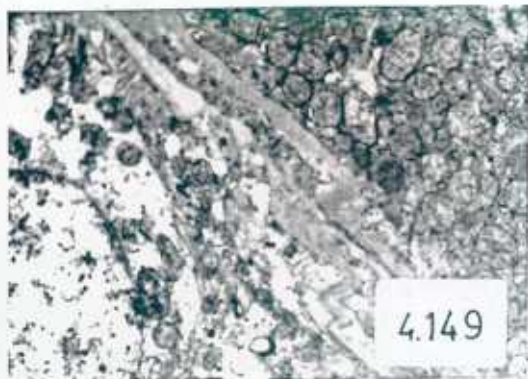
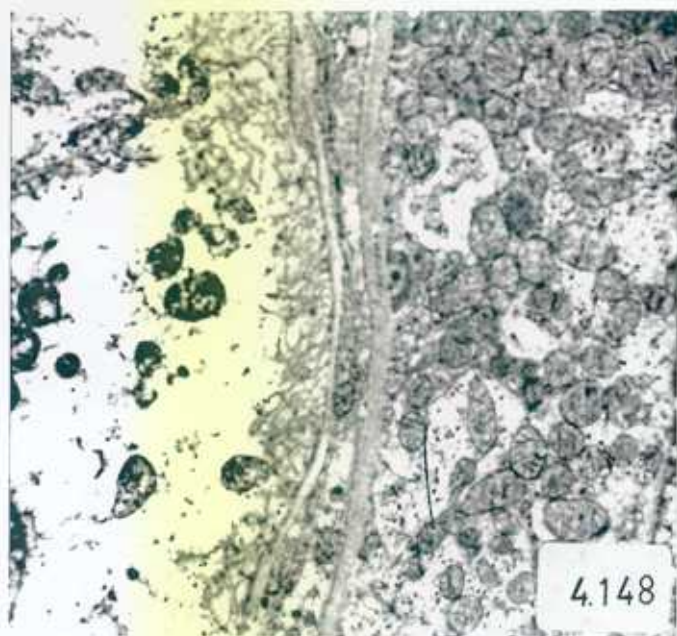
- Fig 4.140.** Microfotografía de células epiteliales de túbulo de riñón de animales que han ingerido AZT (15 días). Aspecto morfológico similar a los animales del grupo control (X 18.000).
- Fig 4.141.** Detalle de mitocondrias parcialmente desestructuradas con matrices de baja densidad electrónica (X 30.000).
- Fig 4.142.** Mitocondrias con alteraciones en las crestas y matrices de baja densidad electrónica (X 18.000).
- Fig 4.143.** Sección de riñón donde se observa desflecamiento de la membrana basal en la cara capilar con ligero edema y mitocondrias con estructura semejante a las que poseen las del grupo control (X 10.000).



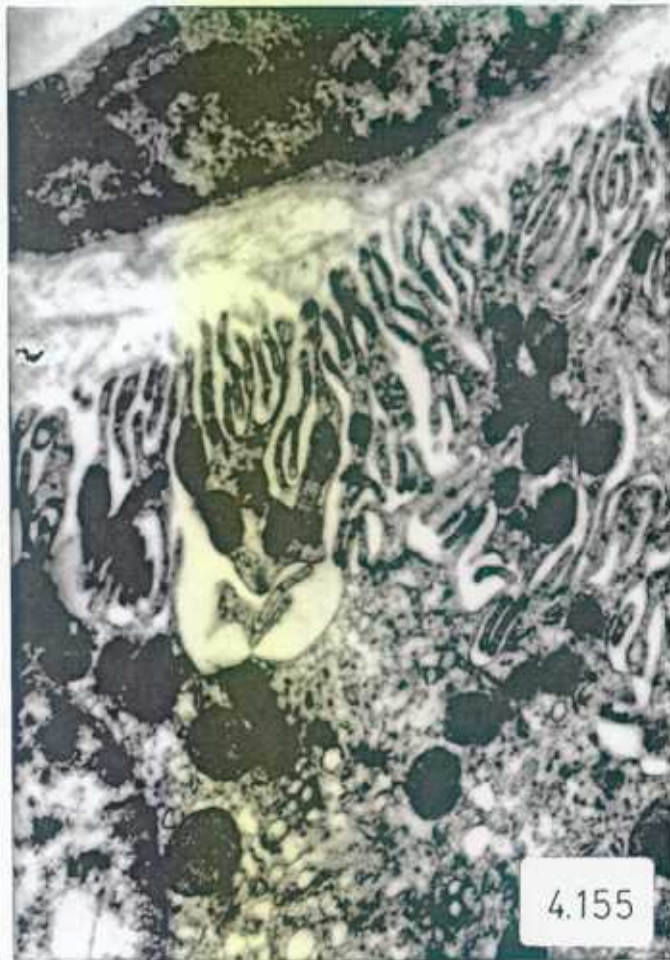
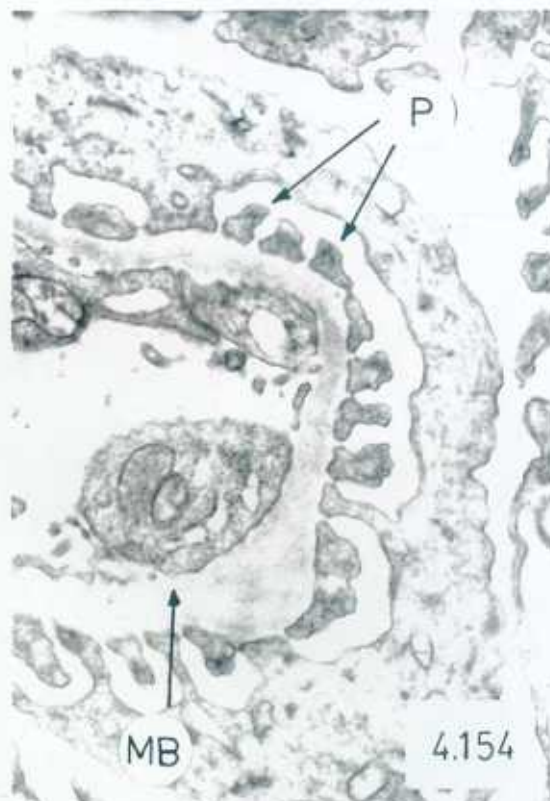
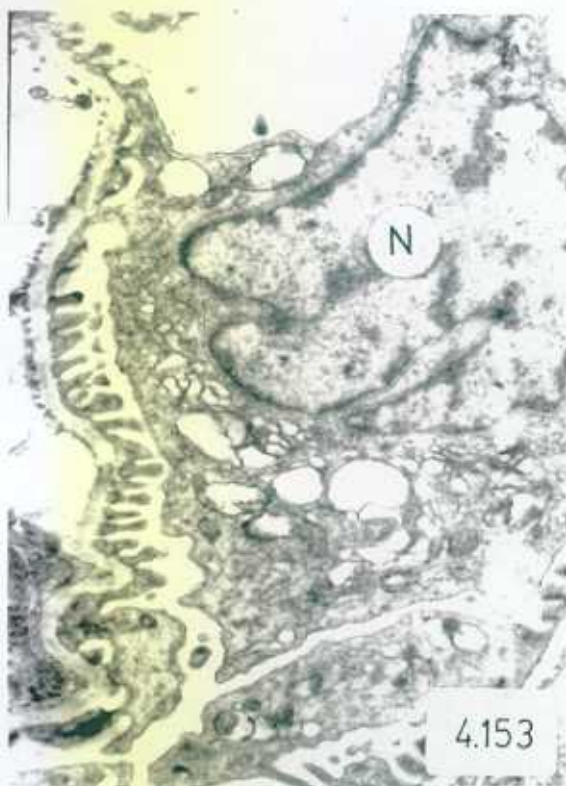
- Fig 4.144.** Células epiteliales del túbulo contorneado proximal de riñón de rata que ha ingerido 30 días AZT donde se observan mitocondrias y crestas desorganizadas junto a otras en la misma célula con aspecto similar a las del grupo control (X 9.000).
- Fig 4.145.** Detalle de aumento de REL con edema intracelular. Las mitocondrias aumentadas de volumen, presentan retracción de las crestas aunque mantienen intactas su membrana externa (X 28.000).
- Fig 4.146.** Sección de riñón de rata (30 días AZT) con un núcleo morfológicamente normal. Ligero edema intracotoplámico y mitocondrias que parecen coalescer con vesículas de REL, con crestas desorganizadas y otras mitocondrias presentan un aspecto bien estructurado (X 15.000).
- Fig 4.147.** Túbulo contorneado proximal de riñón de animal que ha ingerido 30 días AZT y posteriormente 15 días agua. Se observan mitocondrias con matriz de baja densidad electrónica (X 15.000).



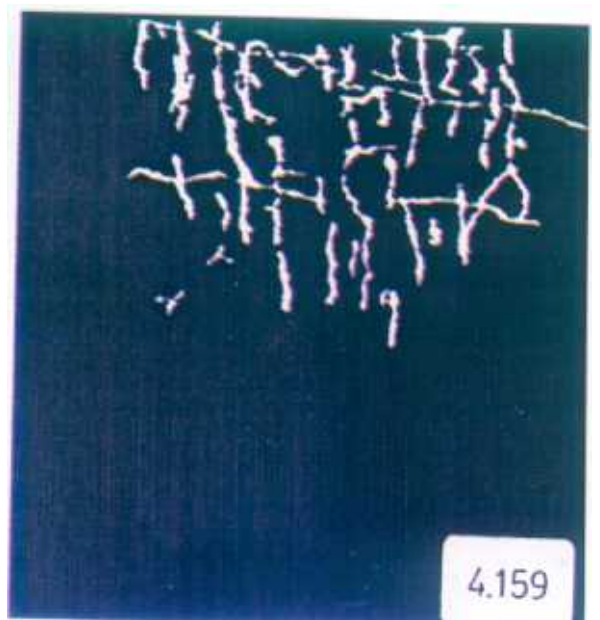
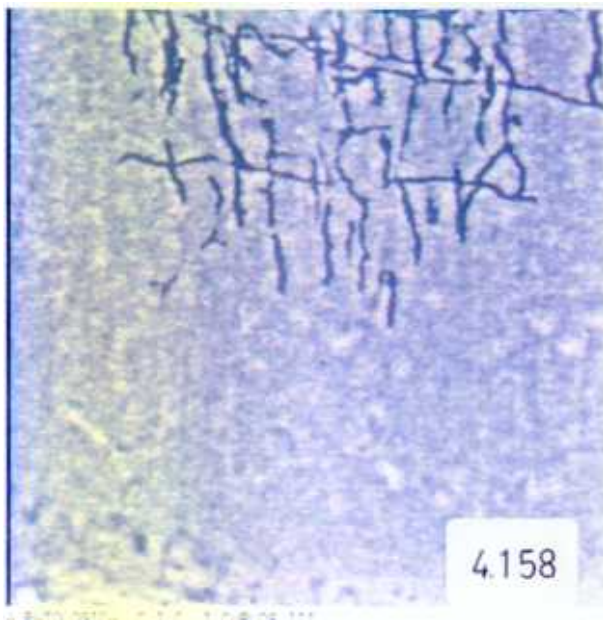
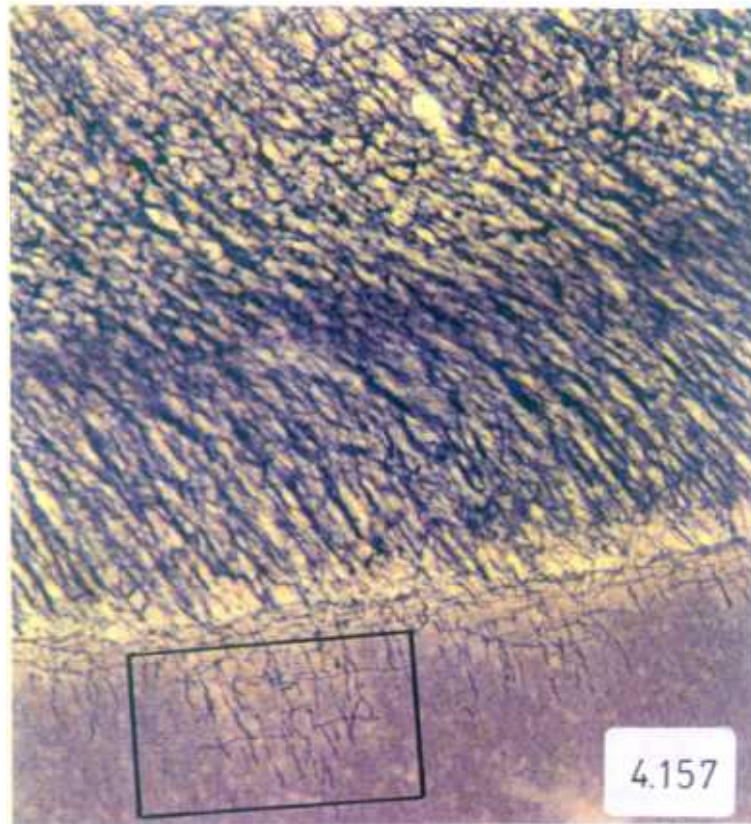
- Fig 4.148.** Microfotografía donde aparecen células con edema intracelular y mitocondrias algo desorganizadas y células con mitocondrias de morfología similar a las de los animales que componen el grupo control (X 8.000).
- Fig 4.149.** Panorámica de células renales de rata con aspecto mitocondrial alterado en la parte izquierda de la fotografía (X 6.000).
- Fig 4.150.** Detalle de mitocondrias de aspecto bastoniforme con matrices de baja densidad electrónica en algunas y crestas desorganizadas y ancladas en la membrana mitocondrial interna (X 12.000).
- Fig 4.151.** Sección de túbulo renal (animal que ha ingerido 60 días AZT) con mitocondrias que presentan crestas alteradas (X 8.000).
- Fig 4.152.** Grupo de mitocondrias donde se aprecian matrices de baja densidad electrónica y crestas desestructuradas en algunos casos como en la fotografía anterior ancladas a la membrana interna (X 15.000).



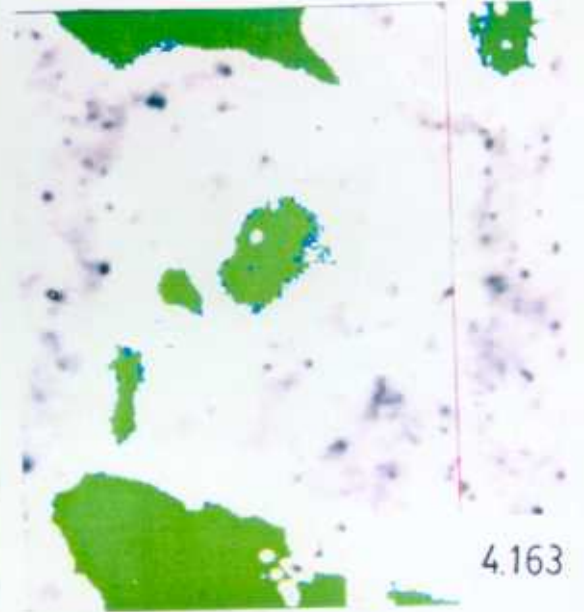
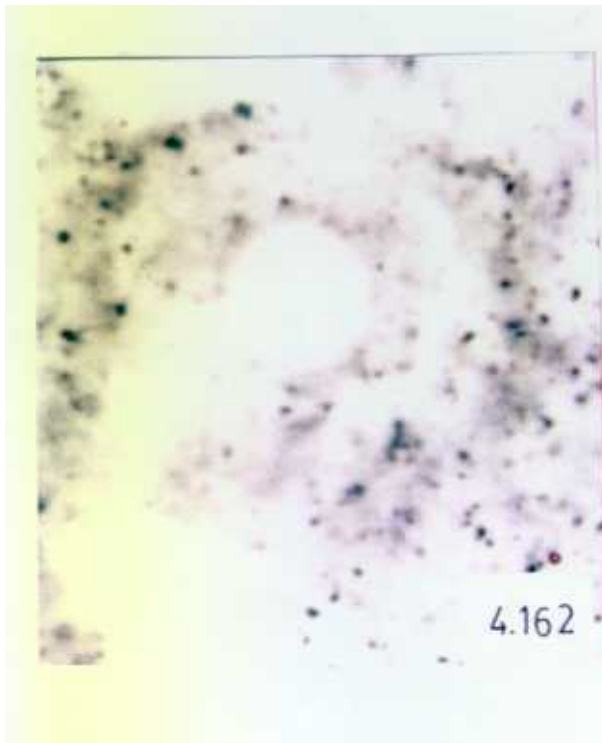
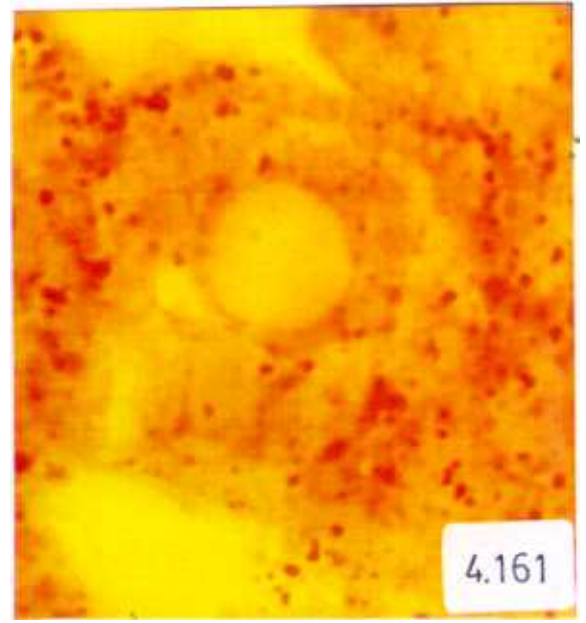
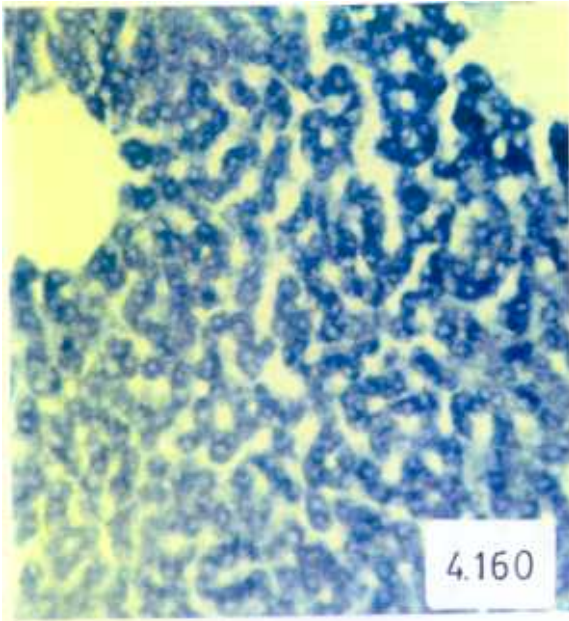
- Fig 4.153.** Microfotografía del glomérulo renal con hipertrofia y multilobulación nuclear (N) y vesiculación a expensas del RE y probablemente del aparato de Golgi (X 15.000).
- Fig 4.154.** Detalle de pedículos y membrana basal de riñón de animales que han ingerido 60 días AZT (X 21.000).
- Fig 4.155.** Sección renal de animal que ha ingerido 90 días AZT. El aspecto morfológico es similar a las secciones de riñón de animales del grupo control (X 18.000).
- Fig 4.156.** Células renales de animal (120 días de AZT). Con estructura morfológica sin alteraciones (X 8.000).



- Fig 4.157.** Actividad enzimática positiva málico-DH en sección de cerebelo.
- Fig 4.158.** Captación y transformación de imagen mediante el analizador de imagenes de la porción marcada en el recuadro de la fotografía anterior.
- Fig 4.159.** Segmentación en blanco y negro procedente de la anterior imagen, realizasdo con el analizador de imagenes.



- Fig 4.160.** Actividad enzimática málico-DH en hígado de rata que ha ingerido AZT 30 días.
- Fig 4.161.** Captación de imagen color con filtro mediante análisis de imagen (Objetivo 100X).
- Fig 4.162.** Imagen real transformada en blanco y negro con análisis de imagen.
- Fig 4.163.** Imagen en la que se procede a realizar una segmentación interactiva en blanco y negro.



5. DISCUSSION

DISCUSION.-

La utilización del AZT, a partir de 1986 en un ensayo terapéutico (Yarchoan y col, 1986), abrió una puerta a la esperanza ya que se disponía de un agente farmacológico que inhibía la transcriptasa inversa. Esta actuación molecular del AZT permitía interferir la transcripción de los retrovirus y de forma particular en los VIH (Stambuck y col, 1984; Mitsuya y col, 1985; Yarchoan y col, 1986; Fish y col, 1987; Furman y Barry, 1988; Ruprecht y col, 1990; Richman y col, 1990; Montaner y col, 1990; Abrams, 1990; González Lahoz y Najera, 1993; Gatell, 1994).

Poco tiempo después de establecerse la terapéutica con AZT se describen los primeros casos en los que los pacientes que habían sido tratados mostraban una afectación muscular (miopatía asociada a AZT) (Bessen y col, 1988; Bodel y Riegel, 1988; Mhiri y col, 1991). Al mismo tiempo ya se habían descrito lesiones del músculo estriado producidas por la propia infección, con lo que se planteó la necesidad de comprobar si estas lesiones eran debidas a la infección, dependían del AZT o eran dos alteraciones distintas. Simpson (1988) y Simpson y Bender (1988) describieron miopatías en 11 pacientes positivos al VIH de los que uno de ellos había recibido AZT; Gorard y col (1988) señalaron un caso de asociación de miopatía y tratamiento con AZT, y Helbert y col (1988) describen también este hecho. Besen y col (1988) describieron cuatro casos de polimiositis en pacientes con síntomas graves producidos por VIH a los que se les administraron AZT y otros medicamentos, y comprobaron una elevación de creatina quinasa (CK) en suero. En uno de estos pacientes, tales niveles disminuyeron al suspender el tratamiento. También Gertner y col (1989), Pezeshhpour y col (1991) y Peters y col (1993) describen miopatías asociadas a zidovudina.

Berger y col (1991) y Mhiri y col (1991) estudiaron con microscopía óptica biopsias musculares de pacientes VIH+ tratados con AZT. Partiendo de homogeneizados celulares de músculo de estos pacientes, miden actividades enzimáticas (succinato citocromo c reductasa y citrato sintetasa) y con digestión enzimática de extractos de músculo analizan, mediante electroforesis en agarosa y "Southern blot", el ADN mitocondrial y concluyen que no encuentran diferencias en las actividades enzimáticas en el grupo tratado con zidovudina respecto a pacientes que no recibieron AZT, ni anomalías en el ADN mitocondrial. Sin embargo, el AZT puede inhibir la polimerasa mitocondrial; Mc Donnell y col (1989) postularon que esa interferencia en la replicación, en la mitocondria, sería la causante de la miopatía. Daniels y col (1990) sugieren que la monitorización de los niveles de creatina quinasa en los pacientes que reciben AZT puede servir para reconocer la miotoxicidad antes de la aparición de las manifestaciones clínicas.

Estos trabajos polarizados en el estudio de la mitocondrias musculares no consideran en ningún momento otros aspectos particulares de la acción tóxica del AZT. Ya en 1986 Good y col demostraron que a nivel hepático se producía un metabolito del AZT, el 3'-azido-3' deoxy-5' β D-glucopiranosil timidina (GAZT). Años más tarde, Cretton y col (1991) comprueban la presencia de otros dos metabolitos altamente citotóxicos: la 3' deoxitimidina (AMT) y el 3' amino 3 deoxitimidina glucurónico (GAMT) y su relación con el sistema enzimático dependiente del NADPH. Como ya se indicó anteriormente Ahmed y col (1991) idearon un modelo experimental en ratones, en el cual les fue administrada, vía intraperitoneal, una dosis de AZT marcada con ^{14}C . Posteriormente, y con técnicas autorradiográficas, estudiaron la distribución y localización del AZT en diferentes tejidos con respecto al tiempo (observaciones tras 2 minutos, 4 horas y 24 horas). Tras 2 minutos el mayor nivel de radioactividad lo presentó la sangre seguido del

riñón, posteriormente y con similares concentraciones les siguen: hígado, corazón, pulmón, páncreas, bazo y glándulas. Tras 4 horas el tejido más radioactivo era el riñón con un coeficiente de distribución 50 veces superior al resto de los tejidos antes mencionados. Tras 24 horas la radioactividad había sido completamente eliminada. Estas reacciones fueron localizadas y cuantificadas mediante un analizador de imágenes.

En nuestro modelo experimental hemos comprobado la presencia uniforme de alteraciones mitocondriales en varios tejidos. Estos hallazgos sugieren que la miopatía mitocondrial, tan ampliamente estudiada no es exclusiva, sino que se produce una afectación generalizada de las mitocondrias. Así, la diana del AZT no es el músculo, ni la médula ósea, ni otros órganos en sentido general, sino las mitocondrias presentes en las células de todos ellos.

Considerando los escasos trabajos farmacológicos sobre el AZT y sus metabolitos, es imposible defender la acción tóxica exclusiva de este retroviral. Como sucede con muchísimos otros agentes terapéuticos, la acción tóxica puede depender de la droga en sí, de los metabolitos intermedios, de la interacción de estos metabolitos con otros productos etc. No hay dudas de que el hígado es el lugar más importante en el catabolismo del AZT y ahí se producen los catabolitos intermediarios que presentan una mayor citotoxicidad. La circulación sanguínea distribuye no sólo el AZT sino también estos productos del catabolismo, y podría participar de este modo en la lesión generalizada que hemos observado y cuyas diferencias dependen de los caracteres fisiológicos de cada uno de los órganos. Así la capacidad de filtrado de la barrera hematoencefálica aumenta el tiempo mínimo necesario para que se puedan observar lesiones, en el sistema nervioso central. En el riñón sin embargo, el filtrado glomerular y los fenómenos de reabsorción tubular

son fenómenos más rápidos e intensos que hacen más evidente la lesión en este órgano por aumento en la concentración. De igual manera sucede en el hepatocito en el que los catabolitos tóxicos del AZT actúan *in situ*, en el mismo lugar donde se originan, produciendo rápidamente las lesiones.

Autores como Arnaudo y col (1991) estudiaron ADN mitocondrial en biopsias musculares de pacientes VIH+ tratados con AZT, observando que el ADNm estaba disminuido en los que presentaban miopatía. Similares resultados encontraron Chen y col (1991) pero en cultivos celulares de linfoblastos humanos infectados con VIH a los que se añadieron AZT y otros análogos de nucleósidos. Hayakawa y col (1991) estudiaron ADN mitocondrial en hígado de ratones que ingirieron AZT (1 mg /kg/día) durante cuatro semanas y observaron la producción de radicales libres (RL) de oxígeno que originaron la formación de desoxiguanosina. Estos autores señalan que el daño que originan los RL de oxígeno sobre el ADN mitocondrial es la causa primaria de la miopatía mitocondrial inducida por el AZT.

En 1990, aparecen los primeros estudios experimentales *in vivo* en animales y posteriormente *in vitro* en cultivos de tejidos. Estos sistemas experimentales demostraron que tanto el tejido muscular de los animales como los cultivos de tejidos de células musculares tratados con AZT, presentaban alteraciones mitocondriales y las mismas desaparecían tras la supresión del tratamiento (Lamperth y col, 1991). Reyes y col (1991) aportaron resultados semejantes describiendo mitocondriopatías en músculo cuádriceps de hamsteres.

Diversos autores demostraron que enfermos tratados con AZT presentaban miopatía con afectación mitocondrial (Panegyres y col (1990). Dalakas y col, en 1990, describen mediante técnicas de microscopía electrónica en tejido muscular

cardiaco de pacientes VIH+ que han ingerido AZT durante un periodo largo de tiempo, mitocondrias en cuyo interior aparecen estructuras paracristalinas. A nivel de microscopía óptica encuentran degeneración en fibras musculares y cuerpos citoplasmáticos, aunque concluyen que estas alteraciones son indistinguibles de las miopatías asociadas con la propia infección VIH. Simpson y col en 1993 realizaron estudios retrospectivos y refieren la dificultad para asegurar si las miopatías encontradas son debidas al VIH o al tratamiento con zidovudina.

Otros autores, utilizando ratas como animales de experimentación tratados con AZT, y centrando su análisis en las alteraciones mitocondriales del músculo estriado cardiaco, describieron los caracteres específicos de las mismas a nivel ultraestructural (Lewis y col, 1991). Se inician en estos años 90 los primeros trabajos bioquímicos para valorar las alteraciones de enzimas de la cadena respiratoria en corazón, es decir para valorar la agresión a nivel de enzimas mitocondriales (Dalakas y col, 1990; Lewis y col, 1992).

Nuestros estudios no se han limitado exclusivamente al músculo cardiaco y específicamente a las mitocondrias, sino que con los mismos criterios planteados en el diseño experimental hemos analizado otros órganos en los que también se han demostrado alteraciones en relación con el AZT como son el sistema nervioso, el hígado, y el riñón. Algunos autores han realizado estudios en estos órganos, en pacientes VIH+ tratados con el AZT, pero no han evidenciado que el fármaco sea el causante directo de alteraciones en estos tejidos (Hagler y Frame, 1986; Melamed y Raymond, 1987; Harrer y col, 1990, Lewis y col, 1991).

Las enfermedades neurológicas relacionadas con el VIH-1 se han descrito en numerosas ocasiones (Brew, 1993), pero no se ha observado neurotoxicidad por

AZT como se refleja en el estudio de Bozzette y col (1991) en el cual se compara pacientes HIV+ tratados con AZT, durante un año en dosis de 800-1200 mg/día, con un grupo control a los que se les administró placebo. Los autores comprobaron que la funcionalidad del nervio periférico era similar en los dos grupos. Otros estudios han demostrado que la zidovudina puede mejorar cuantitativamente las pruebas neuropsicológicas en niños y adultos afectados por el VIH incluso disminuyendo la relación CD-VIH1 (Portegies y col, 1989). En otro estudio se describe la disminución de encefalopatías por VIH cuándo se trata con AZT (Gray y col, 1991). Vago y col (1993) partiendo de 200 necropsias describen que el AZT ha aminorado lesiones cerebrales existentes en pacientes VIH+ tratados con el fármaco.

VALIDACION DEL MODELO EXPERIMENTAL:

Se trata de un modelo experimental en ratas a las que se administra AZT en agua de bebida (en dos concentraciones de 1 mg AZT/ml ó 2 mg AZT/ml), basado en el modelo utilizado por Lewis y col (1991) en el cual las ratas consumían también el AZT (1 mg/ml) en su agua de bebida. Estos autores se centraron en el músculo cardiaco desde el punto vista morfológico ultraestructural y funcional. en el modelo del presente trabajo se han utilizado, al igual que en el de Lewis y col. ratas Sprague-Dawley en grupos de tres animales, como se describe en el apartado de material y métodos. El número de animales utilizado por lote o grupo es el habitual en este tipo de estudios (Bhatia, 1990; Lewis y col, 1991; Trang y col, 1993), ya que es un número suficiente para comprobar repetibilidad de resultados. El uso de más animales sería innecesario y aumentaría el coste de los experimentos, razón que en nuestro planteamiento concreto sería importante ya que el estudio se ha realizado con varios grupos y lotes como se describió en el capítulo de material y métodos.

La hipótesis nula que sirve de planteamiento en cualquier plan de investigación y que consiste en suponer de entrada que se obtendrán los mismos resultados en animales que ingieren AZT y los que forman el grupo control (agua de bebida sin AZT). Con lo que, si los resultados obtenidos son significativamente diferentes, se rechazaría la hipótesis nula, y por tanto lo hallado no sería debido al azar ni a una incorrecta manipulación del material sino al tratamiento con el fármaco. Así ha ocurrido, se observan, en nuestros resultados alteraciones en los animales que han ingerido AZT y no en los que formaron el grupo control. Consideramos pues que nuestro modelo se ha validado, en primer lugar porque los resultados respecto a la morfología ultraestructural del músculo cardíaco corroboran los resultados de Lewis y col (1991).

Una forma de operativizar y por tanto, en último término, además de validar el modelo es poder controlar variables que intervienen como la dosis de AZT administrada, el mantenimiento de los animales de forma individualizada y el seguimiento continuado de cada uno de los animales que lo componen. Así, posteriormente, se puede identificar las relaciones causales. En cuanto a la vía de administración utilizada hemos seguido la misma que Lewis y col (1991), esto es, la ingesta del AZT en agua de bebida proporcionada *ad libitum*. Respecto a este hecho, proponemos realizar estudios en un futuro próximo utilizando sondas u otros medios para administrar el AZT a los animales y así comprobar si los resultados son coincidentes o es dependiente del mantenimiento de un cierto nivel continuado de AZT. Además, es conocido que igual concentración de un fármaco produce distintos efectos, e incluso toxicidades, según la vía de administración, si se administra en una única dosis o repartida la cantidad total en varias veces, etc.

CARACTERISTICAS FISICAS DE LOS ANIMALES.-

Lamperth y col (1991) en un estudio en ratas tratadas con AZT describen que tras 30 días de tratamiento con el medicamento por vía intraperitoneal parecen más perezosas y somnolientas que las del grupo control. Sin embargo Lewis y col (1991 y 1992) no encuentran ningún hallazgo destacable en este sentido.

Nuestros animales en ningún momento presentan signos dignos de señalar. Al final de cada experimento tenían todas las características de aspecto y comportamiento similar a las del grupo control, coincidiendo con lo que ha sido descrito anteriormente por Lewis y col (1991 y 1992).

En cuanto al peso, en nuestros animales los valores del mismo, en cada uno de los tiempos de tratamiento, no reflejan diferencias significativas respecto a los diferentes grupos y a la dosis administrada.

Nuestros hallazgos, coincidentes con los del grupo de Lewis, contradicen los descritos por Lamperth y col (1991) quienes observaron, en un experimento con seis ratas de la misma especie que las nuestras, una disminución del peso original en un 10% tras 3 meses de tratamiento con AZT intraperitoneal. En este trabajo Lamperth y col no presentan una relación individualizada de los pesos, por lo que no se puede saber si era un hecho generalizado o si se trata de la media; tampoco especifica lo que ocurrió con los animales controles. Sus resultados, además, no son extrapolables a los de Lewis y a los nuestros, ya que Lamperth y col administraban el AZT intraperitonealmente. Esto implica por una parte una vía de administración que ocasiona una situación de estrés en el animal y una absorción muy diferente a la de nuestro modelo experimental. La propia situación de estrés por la inyección

podría explicar la pérdida de peso encontrada por estos investigadores.

De hecho, en un estudio llevado a cabo por Tolstzis y col (1991) en el que la administración de AZT fue también en agua de bebida, aunque en este caso se efectuó en ratonas gestantes, los resultados fueron semejantes a los nuestros.

En cuanto a la relación consumo de bebida en ml/Kg peso/día se observó que era similar en los diferentes tiempos estudiados y para los distintos grupos, no existiendo diferencia estadísticamente significativas entre los mismos. Estos resultados son coincidentes con los indicados por Lewis y col (1991 y 1992) en los animales a los que se administraba 1mg AZT/ml de agua de bebida, así como los obtenidos por Tolstzis y col (1991) en ratonas gestantes, los cuales también ingerían el AZT por la misma vía. El consumo de bebida en ml, en el modelo utilizado, está en torno a los 25 y 30 ml/día, aunque como se describe en resultados hay fluctuaciones expresadas por la desviación estandar para cada lote y grupo.

Por otra parte, hay que tener en cuenta la relación dosis de AZT/kg peso/día, ya que las propuestas de tratamiento, como las efectuadas por el Grupo Europeo y Australiano y por Cooper en 1993, se considera la necesidad de administrar una dosis más baja que la que se venía indicando, en relación al peso inicial de los individuos, proponiéndose como dosis terapéutica actualmente 500 mg AZT/día en pacientes VIH+ con un peso inferior a 60 kg y de 750 mg AZT/día a los que superan ese peso corporal. Parece ser que de este modo se obtiene la misma eficacia con el tratamiento y se disminuye en parte la toxicidad.

ESTUDIO ANALITICO:

Como se describió en el capítulo de material y métodos, realizamos un estudio analítico en un lote de animales tratados con 2 mg de AZT /ml al que comparamos con otro grupo control que ingirió agua sin AZT.

Diferentes autores han utilizado como primer índice de enfermedades miocárdicas y musculares la valoración de quinasa. Estas enzimas presentes en las células del organismo y por tanto en las del corazón, músculo esquelético y cerebro ayudan con su valoración y detección de niveles elevados al diagnóstico de enfermedades, fundamentalmente miocárdicas, aunque este dato debe ser considerado útil pero no completamente específico (Henry, 1988). En nuestro experimento el análisis de creatina quinasa (CK) en suero, tanto de animales tratados con AZT como en los no tratados, nos proporciona resultados semejantes a los obtenidos por otros investigadores que han realizado las determinaciones en pacientes humanos que fueron tratados con AZT (Bessen y col, 1988; Gertner y col, 1989; Gorard y col, 1988; Helbert y col, 1988; Panegyres y col, 1990; Dalakas y col, 1990; Chalmers y col, 1991). En estos trabajos se detectó una elevación de la enzima con relación a la ingesta del medicamento y una disminución de estos valores cuando se suspende el tratamiento. Nosotros observamos aumento de la enzima tras 15 y 30 días de tratamiento, con valores cuatro veces superiores a los normales para estos animales. Los valores que hemos obtenido de CK en el resto de los animales están dentro del rango de normalidad, tanto en los animales tratados con AZT como todos los que forman los controles.

Dos enzimas importantes para valorar un posible daño hepático son la GOT y la GPT. En este sentido nosotros hemos observado una elevación de la GOT a

los 15 días de tratamiento (característico de procesos agudos) y de la GPT a los 30 días de tratamiento (característico de procesos que tienden a la cronicidad). Como ocurría con la CK, a tiempos mayores de tratamiento (60, 90 y 120 días) los valores de ambas transaminasas vuelven a la normalidad, lo que sugiere una adaptación a la ingesta continuada del fármaco.

Casoli y col (1990) en hematíes procedentes de pacientes VIH+ tratados con AZT determinan glucosa 6-P-DH y piruvato quinasa y no observan diferencias significativas entre los valores de estos individuos y los de los controles. Por su parte, Lamperth y col (1991) encuentran aumentados los valores de glucosa y lactato en suero de ratas tratadas con AZT intraperitonealmente, sugiriendo un mecanismo compensatorio de la producción de energía por utilización de la ruta de la glucólisis anaerobia. Nosotros realizamos una determinación en suero de glucosa pero no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo control y los que habían ingerido AZT, aunque uno de los animales del grupo control presentó unos altos niveles de glucemia que aumentaron la media del grupo considerablemente, en los animales tratados con AZT a los 60 días aparecen unos valores ligeramente elevados, el resto de los animales poseen unos valores dentro de los límites normales.

Nosotros encontramos cifras de hematíes bajas solamente tras 30 días de tratamiento, no en el resto de los tiempos estudiados (15, 60, 90 y 120 días) y lo mismo ocurre con el hematocrito. sin embargo, el volumen corpuscular medio esta dentro de los límites normales, para esta especie, en todos los animales analizados. Nuestros datos son coincidentes con los de otros autores, así Thompson y col (1991) en un estudio en el que utilizaron diferentes cantidades de AZT y con distintos tiempos de tratamiento, en ratas y ratones, describen la aparición de

anemia y el incremento del volumen corpuscular medio. Este hecho se describió por primera vez en el hombre por Yarchoan y col (1986). La presentación de anemia junto con leucopenia, neutropenia y trombopenia ha sido detectada por diversos autores en pacientes VIH+ tratados con AZT sugiriendo una alteración medular (Richman y col, 1987; Gill y col, 1987; Walker y col, 1988; Gallichio y col, 1992). La anemia se ha descrito también en recién nacidos de madres VIH+ tratadas durante el embarazo con AZT (Ferrazin y col, 1993).

La anemia que hemos observado en nuestros animales durante el periodo de tratamiento con AZT está en consonancia con el efecto de este antirretroviral descrito por estos autores a nivel de la médula ósea. El hecho de que en nuestros animales la anemia se presente a lo largo de 30 días de tratamiento y que a partir de este momento los valores se normalicen, conservandose esta normalidad incluso a los tres meses después de seguir con el fármaco, podría sugerir la existencia de mecanismos compensadores. La anemia podría ser el resultado de un déficit en la multiplicación y maduración de los eritroblastos que posteriormente puede ser superado. Se podría considerar la posibilidad de que en los primeros 30 días de tratamiento los sistemas enzimáticos que intervienen en la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina podrían resultar afectados. De hecho, otros agentes terapéuticos como antibióticos y diferentes situaciones patológicas, como avitaminosis e intoxicaciones por plomo, etc, se asocian también con alteraciones en esta síntesis. Sin embargo, como quiera que los valores de hemoglobina y los caracteres morfológicos de los hematíes son de normalidad podemos asegurar que en nuestras condiciones experimentales no existe una traducción analítica de una probable lesión a nivel de estos sistemas enzimáticos. Hay que tener en cuenta que los hematíes se mantienen desde el principio como normocíticos y normocromicos, pero no se puede saber con certeza si está afectada la síntesis del grupo hemo y por lo tanto

la hemoglobina o esa alteración revierte antes de que se produzcan los mecanismos compensatorios que originan hipocromía y macrocitosis. Consideramos que hubiera sido interesante haber seguido en paralelo la evolución de los caracteres morfológicos de la médula ósea, sin embargo este no fué un objetivo en nuestro protocolo y fue *a posteriori*, tras los hallazgos hematológicos cuando se ha planteado este nuevo aspecto de estudio, el cual podría ser abordado en un futuro.

En 1992, Phillips y Tsoukas, realizaron un estudio en ratas administrando dosis de 4-10 mg AZT/Kg de peso por vía intraperitoneal y describieron disminución de neutrofilos y monocitos, así como de hematíes. Nosotros no encontramos valores alterados de neutrófilos y monocitos en nuestros animales de experimentación, por lo que sugerimos que estos fenómenos puedan tener relación con la dosis administrada.

ESTUDIO NECROPSICO.-

En ninguno de los trabajos publicados sobre el tema que nos ocupa hemos encontrado una descripción sobre los aspectos y caracteres macroscópicos de los órganos en los animales. En los diferentes lotes de animales hemos prestado una atención especial a esta importante observación. No hay duda que la perfusión a la que hemos sometido los animales enmascara muchos de los caracteres macroscópicos como pueden ser los posibles edemas, congestión, hemorragias, etc. Pero en cualquier caso otras lesiones, en caso de presentarse, se pueden mantener, como es el caso de los focos de necrosis, atrofas, hipertrofas, adherencias, fibrosis, cambios en la consistencia, depósitos de pigmentos, etc.

Como señalamos en resultados los órganos de nuestros animales no mostraron ningún tipo de patología macroscópica ni a nivel de los controles ni tras los diferentes tratamientos con AZT, con lo que puede desprenderse que las lesiones microscópicas ultraestructurales y bioquímicas solo podrían ser demostrables a estos niveles y no macroscópicamente.

ESTUDIO MORFO-FUNCIONAL DE LOS DISTINTOS ORGANOS:

MUSCULO CARDIACO.-

Dalakas y col (1990), en biopsias de pacientes HIV+ tratados con AZT encontraron alteraciones musculares, utilizando técnicas de microscopía óptica. Estos autores describen reacción inflamatoria, con infiltrados de linfocitos CD8+ y macrófagos, pero concluyen que no se puede atribuir expresamente al AZT o a la propia infección de los pacientes por el VIH. Nosotros a nivel de microscopía óptica con HE y tricrómico de Masson encontramos que a ambas concentraciones utilizadas de AZT, y tras 30 días de tratamiento aparecen células con "degeneración eosinófila". Sus características las hacen claramente diferenciables del resto. Lo mismo pero de forma menos puntual, se observa a los 60 días de tratamiento, desapareciendo a los 90 y 120 días de ingesta del medicamento. Autores como Lewis y col (1992) no describen alteraciones a nivel de microscopía óptica en músculo de ratas tratadas con AZT durante 35 días.

Nuestros resultados de microscopía electrónica, cuándo se les administra a los animales por vía oral el AZT en agua de bebida en dosis similares a la humana (1mg AZT/ml), son superponibles a los observados por Lewis y col (1991 y 1992) con animales de la misma especie, sexo y peso. Resultados semejantes han sido

también descritos en músculo esquelético de hamsteres (Reyes y col, 1991). Las observaciones efectuadas tras 30 días de tratamiento consisten, a nivel morfológico ultraestructural, en alteraciones a nivel de la matriz y de las crestas mitocondriales. Estas alteraciones morfológicas ultraestructurales disminuyen a medida que aumenta el tiempo de ingesta de AZT. Así el número de mitocondrias alteradas es máximo a los 30 días, y el número de mitocondrias alteradas a los 60 días de ingesta de AZT es estadísticamente menor, desapareciendo a los 120 días. Se puede sugerir la posible existencia de mecanismos adaptativos o compensadores que se manifiesten a lo largo del tiempo. La reversibilidad de alteraciones con tratamientos medicamentosos prolongados es un hecho contrastado con otros productos. Así Bellei y col (1992) en un experimento con ratas a las que administran "dihidroepiandrosterona" observan tras 7 días cambios morfológicos ultraestructurales en los hepatocitos y tras 100 días en las mismas condiciones experimentales revierten o desaparecen estas lesiones.

Para determinar la actividad funcional de las mitocondrias del corazón de las ratas tratadas con AZT se realizó el estudio de la actividad de enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs utilizando métodos histoquímicos, concretamente la actividad de deshidrogenasas dependientes de NAD mediante la demostración de la existencia de una efectiva transferencia de electrones desde la coenzima reducida a una sal de tetrazolio (Pearse, 1972; Altman , 1976 y 1979). Los resultados obtenidos, expresados como densidad óptica correspondiente al depósito de formazán en las secciones histológicas, demuestran que el tratamiento con AZT no altera significativamente la actividad de las enzimas mitocondriales, estudiadas a este nivel histoquímico, cuándo se comparan los grupos experimentales respecto a los controles, para los distintos tiempos. Esto nos hace plantearnos en un futuro la realización de técnicas modificadas para la determinación de algunos de estas

enzimas a nivel de microscopía electrónica. Así autores como Mizukawa y col (1988) han planteado estudios para evaluar actividades enzimáticas NADPH diaforasas en neuronas situadas en la corteza cerebral de gatos, modificando la tecnología habitual, que podría ser aplicada en el modelo experimental de esta memoria.

Nuestros resultados en relación con la valoración del estudio funcional de las mitocondrias son también compatibles con estudios bioquímicos realizados en miocardios de ratas tratadas con AZT por otros autores. En dichos estudios no se han detectado alteraciones destacables de citocromo b y de la expresión de ARNm de málico-DH (Lewis y col,1991), si bien hay que tener en cuenta que la metodología es diferente. En valoraciones realizadas sobre eritrocitos tampoco se han observado diferencias significativas en las actividades de glucosa 6-P-DH y piruvato quinasa entre pacientes tratados con AZT y controles (Casoli y col, 1990).

Lamperth y col (1991) mediante métodos bioquímicos, demostraron una reducción de NADH- citocromo c-reductasa rotenona-sensible (presente en la membrana externa de la mitocondria) y succinato-citocromo c- reductasa en mitocondrias de músculo esquelético y cardiaco de ratas tratadas experimentalmente con AZT. Nuestros resultados no son comparables con ese grupo de trabajo pues si bien se utiliza la misma metodología no se valoran las mismas actividades enzimáticas, ya que nuestro trabajo está centrado en enzimas distribuidas en la membrana interna y en la matriz mitocondrial y no en la membrana externa. Ghadially (1992) con tricrómico de Gomori modificado y azul oscuro con succinato DH observaron empaquetamiento de fibras rojas desordenadas, y sugieren que la morfología alterada de las mitocondrias va acompañada de una función anormal de la actividad enzimática de la cadena respiratoria (Complejos I y III). En el mismo año (1992) Tomelleri estudió pacientes VIH+ tratados con AZT y describe

deficiencias focales de citocromo c oxidasa en músculo, asociado con una deficiencia en succinato citocromo c reductasa y mitocondriopatías en biopsias musculares. En 1993, Chariot y col proponen utilizar como un marcador de toxicidad mitocondrial en pacientes VIH+ con síntomas musculares la determinación de citocromo c reductasa.

Nuestros resultados son similares a los de Lewis y col (1991 y 1992) en lo que respecta a las alteraciones morfológicas ultraestructurales de las mitocondrias de músculo cardíaco. Estos autores con técnicas distintas a la nuestra, llegan a la conclusión de que no hay diferencias, en cuanto a la actividad malato DH entre las ratas tratadas con el fármaco y las controles. Nosotros podemos añadir que no aparecen diferencias no solamente en esa enzima sino tampoco en la succinato-DH, isocitrato-DH, NADH-DH, y NADPH-DH, estas dos últimas investigadas para averiguar la actividad óxido-reductasa ligada a la cadena respiratoria. Esta falta de diferencias se aprecia también utilizando técnicas histoenzimáticas a nivel de microscopía óptica, entre los distintos grupos estudiados. La técnica llevada a cabo en el presente trabajo pensamos que aporta las ventajas de poder observar en el caso de la rata el tejido completo, así en el riñón se puede tallar secciones longitudinales que permite la identificación de sus distintas estructuras, y lo mismo con secciones de cerebro, cerebelo y corazón, etc. Además, es una técnica sencilla (una vez estandarizada), y no requiere un equipo sofisticado. Por el contrario requiere personal especializado para su interpretación y un control estricto en las condiciones ambientales y de la manipulación del material.

Lamperth y col (1991), con estudios en cultivos de células musculares procedentes de pacientes VIH+ tratados durante un tiempo prolongado con AZT y con un modelo experimental en ratas, indican la posible alteración de la cadena

respiratoria (Complejos I y III) por el AZT. En vista de esta hipótesis y considerando que morfológicamente, a nivel ultraestructural obtenemos alteraciones mitocondriales, sería lógico pensar en la génesis de radicales libres de oxígeno, con implicación directa sobre el daño a nivel de crestas mitocondriales, como uno de los posibles efectos tóxicos producidos por el fármaco. Se conoce que el AZT actúa a nivel de la cadena respiratoria y puede producir la generación de RL de oxígeno (Pitrak y col, 1993). Estos radicales serían capaces de actuar a nivel de la membrana mitocondrial sobre los lípidos y proteínas de éstas. En consecuencia, esa acción podría explicar, como indica Rubio (1994), el hinchamiento o edema de las mitocondrias, así como de otras estructuras y la degeneración de los mismos.

Se han comprobado alteraciones a nivel del ADN mitocondrial, en muestras de biopsias musculares procedentes de pacientes con SIDA y tratados con zidovudina en algunos casos. Arnaudo y col, (1991) describen que los valores de ADN mit se encuentran disminuidos cuando los pacientes ingieren el AZT y tras la supresión del fármaco alcanzan valores dentro de los límites normales, por lo que sugieren que la zidovudina induce la inhibición de la replicación del ADN mit por la ADN polimerasa gamma y no se trata de un efecto secundario producido por el VIH. La disminución del ADN mitocondrial ha sido estudiado por diferentes autores, en diferentes modelos fisiológicos, observándose la implicación de RL de oxígeno sobre este ADN (Walton y Packer 1980; Miquel 1989 y 1992).

Las alteraciones morfológicas estructurales de las mitocondrias observadas en el presente estudio resultan similares a las encontradas por autores como Miquel (1992) en animales viejos. Puesto que estos radicales, producidos en mayor cantidad en el envejecimiento son los responsables de las alteraciones mitocondriales que deterioran la función celular en la vejez, se podría sugerir la

existencia de tales radicales libres por la ingestión de AZT. Aunque la diferencia final es que en el envejecimiento las consecuencias fisiológicas de esas alteraciones mitocondriales no pueden ser compensadas y conduce a la muerte del individuo (Miquel y Fleming, 1986), en el caso del tratamiento con AZT si pueden ser controladas con el tiempo por los sistemas reguladores del organismo.

El análisis de imagen utilizado para el estudio de perfiles densitométricos no nos aportó nuevas informaciones y por tanto no fue ventajoso. En este caso concreto tendríamos que estudiar las secciones con la ayuda de un microscopio confocal, ya que esto permitiría valoraciones por los distintos planos de la sección con lo que se podría realizar con el analizador de imágenes un estudio estereoscópico de las muestras.

Sin embargo, la citofotometría ofrece objetividad a los resultados ya que utiliza una longitud de onda específica para el formazán, y cuantifica de forma automática en la sección de tejido la reacción histoenzimática. Tiene el inconveniente de medir también, en caso de existir, depósitos inespecíficos pero este error está paliado porque será similar al de los controles, siempre que se realicen en las mismas condiciones, con lo que la relación será proporcional y por tanto el resultado final será válido. Esta técnica ha sido y es utilizada por numerosos autores como Martínez-Rodríguez y Martínez-Murillo (1984) para cuantificaciones en otras localizaciones. Nosotros hemos observado una densidad óptica similar para las distintas reacciones histoenzimáticas, y un resultado significativamente diferente cuando las secciones se incubaron sin sustrato.

En estudios en seres humanos, Panegyres y col (1990) observaron asociación entre alteraciones mitocondriales en músculo y pacientes VIH+ que

tomaban AZT, consistentes en vacuolizaciones de las mismas y figuras mielínicas dentro de las mitocondrias, las cuales han sido también detectadas por nosotros en el hígado de los animales tratados durante 30 días con AZT. También describen estos autores en las células musculares dilatación del retículo sarcoplásmico. Queremos señalar que los tratamientos con AZT en pacientes humanos llevan administrándose como máximo 8 años. Estrapolando a la rata tres meses de tratamiento en estos animales es equiparable a 10 años en la vida media de una persona.

HIGADO.-

Es conocida la gran cantidad de fármacos que tienen capacidad para producir lesiones hepáticas ya que el metabolismo de estos productos primordialmente se lleva a cabo en este órgano, como ocurre con el AZT (Arias, 1993).

El metabolismo hepático en las ratas es diferente a los de otros mamíferos y concretamente el hombre, existiendo diferencias entre distintas cepas y con el sexo. Incluso se observan claras variaciones en el contenido celular según la hora del día en que se haya tomado la muestra (Arias, 1993).

La hepatotoxicidad observada, en los diferentes tiempos experimentales, pone de manifiesto la esteatosis microvacuolar de distribución panlobulillar observada y confirmada por otros autores (Robbins, 1990) con medicamentos clasificados como de tipo "lesión predecible" o "hepatotoxicidad directa" (Wright, 1979; Arias, 1993). En los resultados obtenidos en el presente trabajo aparece una estrecha relación entre las alteraciones morfológicas y la ingestión del fármaco. Así, se aprecia degeneración hidrópica o vacuolar a los 15, 30 y 60 días de tratamiento

y esteatosis de intensidad creciente a partir de los 60 días, hechos que no aparecen en los animales del grupo control. Es decir, al incrementarse el tiempo de ingestión se incrementan las lesiones hepatocelulares. No hemos podido realizar estudios comparativos con otros autores por no existir en la literatura estudios de hepatotoxicidad con AZT desde el punto de vista microscópico, por lo que nuestros hallazgos serán exclusivamente comparados con los grupos control y con estudios realizados con medicamentos de "lesión predecible" o "hepatotoxicidad directa".

Cretton y col (1991) estudiaron el metabolismo del AZT en hepatocitos humanos y de rata, observando efectos tóxicos de sus catabolitos (GAZT, AMT, GAMT). Para ello utilizaron cultivos celulares con AZT marcado con tritio. Los catabolitos disminuyen en presencia de NADPH, sugiriéndose que en este proceso se encuentra involucrado un sistema enzimático dependiente de dicho sustrato. El hígado juega un papel crítico en el aclaramiento del fármaco. Placidi y col (1993) estudian el AMT en relación con el citocromo p450 y cB5 en pacientes VIH+ tratados con AZT, y sus resultados les hacen poner de manifiesto la importancia de la idiosincrasia individual en cuanto a la formación de este metabolito.

Los resultados de nuestro estudio, en los animales tratados con AZT, con la utilización de técnicas de microscopía electrónica, son similares en hígado a los comentados para el corazón. Las mitocondrias tienen alteraciones tras 30 días de ingesta del medicamento, aunque el tipo de alteraciones no son idénticas, morfológicamente, en ambos tejidos. Así en hígado, aparecen vacuolas autofágicas que engloban dentro la mitocondria. Este hecho se observa dentro de la misma célula y en distintos hepatocitos sin apreciarse asociación con una localización especial o determinada. Esto ha sido descrito de forma similar en músculo humano de pacientes VIH+ tratados con AZT (Panegyres y col, 1990; Chalmers y col, 1991).

Las vacuolas autofágicas en hígado han sido descritas tras la ingesta de otros productos. Así, Gragera y col (1993) demuestran que la ingesta de esteroides anabolizantes en ratas producen este tipo de alteraciones mitocondriales en los hepatocitos.

Otras mitocondrias aparecen con unas alteraciones similares a las del músculo cardiaco, con matrices de baja densidad electrónica, desestructuración de las crestas y conservación de la membrana externa. Destaca también, al igual que ocurre con otros fármacos, que se produce dilatación del retículo endoplásmico liso y rugoso. En los hepatocitos, como ocurrió con los miocitos, a los 90 y 120 días de tratamiento con ambas concentraciones de AZT, aparecen pocas mitocondrias con alteraciones y estas consisten en tener inclusiones en si interior. El resto de las mitocondrias presentan una estructura similar a la de los controles, con matrices de alta densidad electrónica y crestas bien organizadas. La existencia de reversibilidad en la lesión producida por fármacos ha sido puesta de manifiesto en numerosas ocasiones, entre otros cabe citar a Bellei y col (1992), ya mencionados anteriormente. Grigor'ev (1989) en un estudio experimental realizado en corteza cerebral de rata, a las que inyectó ácido ascórbico, detectó lesiones ultraestructurales en los primeros días, pero estas revierten en parte, y observa tras 100 días formaciones con aspecto mielínico y vacuolas que contienen elementos de degeneración que presupone sean restos mitocondriales. En nuestro modelo tras 90 y 120 días de ingesta de AZT, con las dos concentraciones utilizadas, se aprecian grandes vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas, que vienen a confirmar los resultados obtenidos por microscopía óptica; esto es, las posiciones periféricas de tales vacuolas en el citoplasma que son observadas en numerosos hepatocitos por todo el tejido. Alteraciones que han sido descritas tras la ingesta de diversos medicamentos como las tetraciclinas (Robbins, 1990).

Los pacientes con infección avanzada por VIH que han sido tratados con AZT presentan, en los estudios histopatológicos de biopsias y en las necrópsias, múltiples lesiones que con frecuencia son semejantes a las que hemos venido observando en nuestro modelo experimental. Hacer una extrapolación sería fácil, pero hay que considerar la existencia de otros factores asociados. Debe tenerse en cuenta no sólo los múltiples tratamientos farmacológicos a los que tales personas son sometidos, sino también las lesiones derivadas de los hábitos particulares (alcohol, drogas) o de una enfermedad anterior (hemofilia), así como la continua agresividad hepática de los agentes oportunistas (parásitos, hongos, bacterias, etc), todo ello da lugar a lesiones morfológicas que se asocian a las tóxicas. Freiman y col (1993) detectan hepatomegalia con esteatosis severas en pacientes VIH+, sugiriendo profundizar en estos estudios ya que puede estar asociado a diversos tratamientos farmacológicos entre los que se incluye el AZT. Esteatosis en cualquiera de sus variedades, degeneración hidrópica y otros cambios propios del hepatocito son comunes a muchos de éstos factores y por lo tanto sería muy arriesgado señalar que estas lesiones al ser semejantes a las observadas en la rata pueden depender en el hombre de la acción tóxica del AZT o de sus catabolitos tóxicos.

En base al estudio densitométrico de la actividad isocitrato DH realizado en el presente trabajo podría ser conveniente utilizar técnicas de análisis de imagen para la cuantificación de reacciones histoenzimáticas en este tejido, pues resulta un método sencillo y aporta la ventaja de poder objetivar los resultados. Queremos destacar que permite de forma directa proceder a posteriores estudios estadísticos aunque, como en casos anteriores pero en estas determinaciones con mayor motivo, se debe extremar el cuidado de mantener las mismas condiciones de luminosidad y contraste para las muestras.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (cerebro y cerebelo).-

Cuando se administró AZT a ratas por vía oral en agua de bebida con las técnicas de rutina para microscopía óptica no observamos alteraciones en ninguno de los experimentos programados. Sin embargo el microscopio electrónico puso de manifiesto la presencia de lesiones casi exclusivamente centralizadas en las mitocondrias. Como se señala en los resultados, las organelas afectadas tenían una distribución muy irregular, dispersa y no respetaba ninguno de los componentes celulares (neuronas, glia, etc). Las mitocondrias afectadas no tenían uniformidad topográfica, observándose lesiones de localización somática en prolongaciones y sinapsis. No hemos encontrado en la literatura ninguna descripción de este tipo de alteraciones en modelos experimentales, sin embargo si han sido descritas otras alteraciones probablemente relacionadas a nivel humano como la presencia de glóbulos hialinos (Artigas y col, 1991). Las alteraciones mitocondriales de cerebelo y cerebro, consisten en desorganización de las crestas, vacuolización de la matriz con conservación de las membranas externas, hechos que hasta el momento no habían sido descritos. Estos resultados concuerdan con los observados en el músculo cardíaco tanto en nuestro experimento como en los llevados a cabo por otros investigadores (Lewis y col, 1991 y 1992).

Las lesiones mitocondriales que son muy semejantes a las que hemos observado en el resto de los órganos difieren única y exclusivamente en el tiempo requerido para su aparición. En el sistema nervioso se evidencian con facilidad al cabo de 60 días, y sin embargo en el resto de los órganos esto sucede mucho antes, este retraso en la aparición de la lesión puede explicarse por las características particulares de la barrera hematoencefálica (Pardridge, 1988) que en el caso del AZT establece una dificultad específica al paso del agente terapéutico,

permitiendo que tan sólo un 35-55% alcance los elementos celulares del sistema nervioso (Gray y col, 1992). En otros órganos en los que no existe una barrera como la hematoencefálica, la concentración es entre dos y tres veces mayor. Por lo tanto, en esos otros órganos la concentración mínima o acumulada que sería necesaria para lesionar las mitocondrias se obtendría mucho antes que en el sistema nervioso central.

La evolución posterior en este sistema nervioso es en todo semejante a lo que ocurre en el músculo cardíaco ya comentado y riñón que se comentará seguidamente; de tal manera que a los 120 días estas alteraciones han desaparecido. Es decir, existe una evolución paralela en cuanto a las lesiones con un desplazamiento en el tiempo de inicio de las mismas motivado por la reducción en la dosis celular que provoca el filtro de la barrera hematoencefálica.

Estos hallazgos nos inducen a sugerir que para que se produzcan las lesiones mitocondriales es preciso una dosis acumulativa, o bien, un tiempo mínimo de agresión continuada, inclinándonos por la primera suposición en tanto en cuanto la barrera hematoencefálica no limita tiempo de actuación del fármaco sino dosis.

Las lesiones mitocondriales son reversibles y esta característica es independiente de la continuidad en la administración del AZT o de su eliminación puesto que en ambas situaciones, a pesar de seguir administrando AZT o procediendo a su retirada, estos orgánulos citoplasmáticos recuperan no solo su aspecto morfológico ultraestructural de normalidad (exceptuando el hígado), sino los caracteres histoenzimáticos analizados. De todo ello se desprende que el AZT induce una alteración "aguda" o "subaguda" que pone en marcha mecanismos compensadores mitocondriales como por ejemplo un aumento de la síntesis del

sistema NADPH-DH o apertura de nuevas rutas metabólicas que disminuyan con el tiempo la actuación de los productos tóxicos intermediarios. Posiblemente pueda llevarse a cabo este hecho por su transformación en otros no tóxicos o bien por una aceleración en los mecanismos citoplásmicos del aclaramiento tanto del AZT como de los metabolitos tóxicos, lo cual permite la vuelta a la una situación de normalidad.

En resumen, el AZT da lugar a una "enfermedad mitocondrial" que es superada por la propia mitocondria o por otros orgánulos celulares comprometidos en el aclaramiento de los productos del metabolismo.

El inicio de las alteraciones, como hemos indicado antes, depende bien del tiempo de actuación del fármaco, cualquiera que sea la dosis que hemos administrado, o bien de haber alcanzado una concentración o dosis inicial por acumulación. Esto puede apoyarse en los hallazgos encontrados en diferentes órganos estudiados: músculo cardíaco, cerebro y cerebelo, hígado y riñón. Como ya se ha indicado a pesar de presentar las alteraciones mitocondriales una evolución idéntica existe un desfase temporal, con alargamiento del periodo de aparición a nivel del sistema nervioso inducido sin lugar a dudas por el retardo en el filtro de la barrera hematoencefálica.

La observación de ausencia de diferencias de las actividades de enzimas mitocondriales entre ratas tratadas y no tratadas con AZT, sugiere que las alteraciones morfológicas ultraestructurales de las mitocondrias no ocasionan disturbios metabólicos importantes dependientes de la actividad de esas enzimas mitocondriales. Quizás las mitocondrias no afectadas en las células de animales tratados tengan unas actividades enzimáticas que compensen las pérdidas de las mismas en las mitocondrias parcialmente desorganizadas. También es posible que

las que están con alteraciones tengan una hiperactividad enzimática compensatoria.

Las técnicas histoquímicas para la determinación de actividades enzimáticas por microscopía óptica se pueden complementar con análisis de imagen, permitiendo cuantificar objetivamente diferencias de área ocupada por fibras nerviosas con actividad isocitrato-DH, malato-DH, succinato-DH, NADH-DH y NADPH-DH entre ratas tratadas y grupo de control, imposible de valorar por otros métodos. De este modo se gana en objetividad y cuantificación de los resultados eliminándose uno de los importantes inconvenientes de esas técnicas, ya que utilizando una imagen real, como es una reacción de tejido incubado con la enzima correspondiente, la transformamos en blanco y negro y pasa de analógica a digital. Además desde el primer momento realizamos una calibración que permite la equivalencia de pixel o punto a micras, con lo que al final obtenemos una medida numérica y real que corresponde a una medida en área con respecto a cada campo. En este trabajo se tomaron 30 al azar y con ellas se hizo un fichero que pudo ser tratado estadísticamente. Así se pudo comprobar si el área ocupada por estas fibras nerviosas situadas en el tercio inferior de la capa molecular de cerebelos en los distintos tiempos y grupos presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí, pudiéndose comparar respecto a los controles, y por tanto detectar si el tratamiento con AZT es el causante de estas alteraciones. Al hacer este estudio comprobamos que existen diferencias estadísticamente significativas tras 15 y 30 días de tratamiento en las distintas actividades enzimáticas, siendo estas diferencias semejantes para las diferentes actividades enzimáticas estudiadas. Estamos de acuerdo con las sugerencias dadas por otros autores, en cuanto a que con técnicas de análisis de imagen resulta fundamental trabajar con las condiciones más homogéneas posibles, respecto al grosor de los cortes histológicos, los planos de tallado de las piezas que deben ser similares, así como con idéntica luminosidad y

contraste (Carbajo y col, 1990, Wells y col, 1992a y 1992b).

RIÑÓN.-

La zidovudina se elimina en un 14% por orina mediante filtración glomerular y secreción tubular activa. El 74% del metabolito principal, GAZT, se excreta por orina (Klecker y col, 1987). En consecuencia la nefrona es sin lugar a dudas el sistema histológico sometido a mayor dosis tóxica por el AZT y sus catabolitos.

El microscopio óptico no demuestra ningún tipo de alteración en este órgano, sin embargo, la microscopía electrónica permite caracterizar las alteraciones. Al igual que en los órganos comentados la mitocondria es, en el riñón, el orgánulo diana del tratamiento con AZT. A los 15 días de administración del fármaco también aparece una disminución discreta de la densidad electrónica de la matriz y una mínima desorganización de crestas, en suma, los primeros signos de hinchazón y alteración mitocondrial. Un componente fundamental de la nefrona y especialmente del glomérulo es la membrana basal y esta estructura participa en los mecanismos de aclaramiento sanguíneo, lo que no ocurre con el resto de los órganos estudiados. En estos primeros 15 días pueden apreciarse cambios evidentes en la densidad electrónica de dicha membrana, con desflecamiento en la cara capilar y edema supraendotelial. Esta pequeña lesión submicroscópica sugiere que existe un aumento de volumen en la filtración glomerular posiblemente por un efecto directo del AZT y/o de los catabolitos tóxicos en el proceso de filtración, actuando sobre los componentes estructurales de la membrana basal.

Tras 30 días de ingesta de AZT se mantiene el mismo tipo de lesión antes indicado en las mitocondrias tubulares, aunque a nivel del asa de Henle destaca

el edema intracelular, el aumento de retículo endoplásmico liso y la vesiculación y desorganización de las crestas mitocondriales. Esta lesión no es uniforme, es focal e incluso variable según el campo estudiado dentro de la misma célula. Probablemente el asa de Henle al ser una localización de importantes y complejos sistemas de transporte tenga en sus células una mayor sensibilidad a la agresión tóxica. No obstante, el aumento del REL, la dilatación del mismo y la tumefacción mitocondrial, en conjunto, sugieren la existencia de fenómenos de hipoxia celular ya que estos cambios están directamente relacionados con este mecanismo de muerte celular (Díaz-Flores, 1979). La causa de la posible hipoxia está por esclarecer y nos limitamos única y exclusivamente a sugerir este mecanismo sin descartar en ningún momento a nivel del asa de Henle que la citotoxicidad del AZT y sus catabolitos motiven alteraciones en la bomba de sodio y potasio en la membrana celular. Estos cambios podrían asociarse a modificaciones en los sistemas enzimáticos responsables del aprovechamiento energético por la mitocondria. El estudio histoquímico de algunas enzimas implicadas directamente en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria no nos ha dado resultados que sugieran esta última posibilidad, pero nuestros métodos son morfológicos y como tales incapaces de demostrar unos niveles pequeños de alteraciones bioquímicas.

A los 60 días las alteraciones mitocondriales son más intensas cualquiera que sea su localización en la estructura de la nefrona. En el glomérulo aparecen por primera vez signos de respuesta celular inespecífica, tanto a nivel del endotelio fenestrado como de los podocitos destacando la hipertrofia nuclear, vesiculación y sobre todo la fusión focal de pedicelos. Sorprende que en este momento del tratamiento la membrana basal haya superado las pequeñas alteraciones que observamos en el grupo de los 15 días. Las alteraciones son cambios de tipo reactivo e inespecífico sobre todo los relacionados con la forma y tamaño celular.

Sin embargo tanto las alteraciones mitocondriales como la vesiculación intracelular son muy semejantes a las que hemos venido describiendo en otros tejidos. Hay que señalar que la vesiculación citoplásmica y alteraciones mitocondriales también pueden observarse en el epelio de la cápsula de Bowman.

Consideramos que estos cambios tan similares a los ya descritos hasta ahora son en suma la manifestación morfológica de que todos los tejidos son diana en tanto en cuánto lo son las mitocondrias cualquiera que sea su localización.

Al cabo de 60 días las estructuras citoplásmicas en general, con excepción de las mitocondrias, han vuelto casi a la normalidad. Sin embargo, en el riñón y en el sistema nervioso central las alteraciones se mantienen con este tiempo de tratamiento. Las células de otros tejidos desarrollan mecanismos compensatorios, no dilucidados por el momento, frente a la acción del AZT y/o sus catabolitos, pero en riñón y concretamente en la nefrona puede que por estar inmersa en un baño tóxico continuado en tanto en cuánto dure la administración y por lo tanto el catabolismo del AZT mantenga las alteraciones. En el sistema nervioso central el fenómeno sería distinto, lo que probablemente ocurra como ya indicamos es que la barrera hematoencefálica limita la dosis mínima necesaria para desarrollar efectos citotóxicos evidenciables morfológicamente. De ahí que las lesiones tarden más en presentarse en estos dos órganos y este retraso también da lugar a un "falso" mantenimiento de las lesiones. Si el efecto es más tardío los mecanismos de compensación alcanzan su grado máximo también más tarde. No obstante, considerado este fenómeno en tiempo celular, es idéntico a lo que ocurre en el resto de los órganos estudiados, excepto en el riñón que no deja de ser agredido a través del aclaramiento activo de los tóxicos. Si aceptamos de forma absoluta estas consideraciones deberíamos esperar que en los lotes de 90 y 120 días siguieran

manteniéndose las alteraciones. Sin embargo, con sorpresa encontramos que en estos periodos de tiempo las alteraciones ultraestructurales son mínimas o no existen en estos órganos: riñón y sistema nervioso. Podemos deducir, por tanto, que los mecanismos compensatorios actúan desde el comienzo y consiguen neutralizar el efecto tóxico tras un periodo de tiempo, que en el presente modelo experimental es de 90 días. Este tiempo, excepto en hígado presenta una morfología similar a los animales del grupo control.

CONSIDERACIONES GLOBALES:

Podemos pues concluir de nuestros resultados que en el diseño experimental aquí utilizado el AZT produce alteraciones que se manifiestan a nivel ultraestructural fundamentalmente en las mitocondrias de los órganos estudiados. Estas alteraciones aparecen ya a los 15 días de tratamiento con máximos a los 30 o 60 días dependiendo de las peculiaridades fisiológicas del órgano considerado. Sin embargo, en todos los órganos dichas alteraciones desaparecen a los 90 días de tratamiento, excepto en hígado (que presenta vacuolas con contenido mitocondrial y grandes gotas de lípidos), lo que parece indicar una recuperación de la homeostasis funcional por acción efectiva de los mecanismos compensadores del organismo.

Lógicamente a la vista de los resultados de este estudio parece interesante ampliarlos, utilizando un modelo con animales inmunodeprimidos que asemejen, en mayor medida, el entorno fisiológico en el que actúa normalmente el AZT (fármaco utilizado para pacientes VIH+ que presentan pronto una inmunodepresión tras la infección por este agente).

Por otra parte, sería interesante, y un posible objeto de futuras investigaciones, analizar en mayor profundidad las alteraciones mitocondriales, valorando en diferentes tejidos el daño en el ADN mitocondrial y la producción de radicales libres, así como los niveles de defensas antioxidantes que en estos animales podrían aumentar para participar en el proceso de compensación del daño por AZT que hemos detectado.

Por todo lo recogido en la presente memoria podemos indicar que sopesando los efectos tóxicos que el tratamiento con AZT produce en relación con el beneficio demostrado en pacientes HIV+, pensamos sigue siendo en el momento actual, de enorme utilidad su empleo con objeto de retrasar la sintomatología y por tanto, el fallecimiento de las personas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

6. CONCLUSIONES

Del estudio realizado sobre el efecto que produce el AZT, en ratas que lo ingieren en diferentes dosis (2 mg AZT/ml de agua, 1 mg AZT/ml de agua y 0 mg AZT/ml de agua) a lo largo de 15, 30, 60, 90 y 120 días se deducen las siguientes conclusiones:

1. El modelo experimental de tratamiento con AZT en ratas planteado en el presente trabajo, resulta válido para abordar los objetivos propuestos.

2. Las características macroscópicas (peso, tamaño, coloración, y consistencia) de los órganos de todos los animales se encuentran dentro de la normalidad.

3. El estudio analítico indica una afección multisistémica en tratamientos a 15 y 30 días con AZT, como lo demuestra la alteración de varios parámetros, tanto hematológicos (anemia y leucopenia a los 30 días) como bioquímicos (elevación de GOT y CK a los 15 días, y GPT y CK tras 30 días con AZT). Esta situación se normaliza en tratamientos más prolongados.

4. Con la metodología y condiciones experimentales utilizados comprobamos que el AZT induce lesiones detectables a nivel de microscopía óptica en músculo cardíaco e hígado no apreciándose alteraciones a este nivel en el resto de los órganos estudiados (sistema nervioso central y riñón).

5. Las alteraciones observadas en músculo cardíaco e hígado son confirmadas por microscopía electrónica y técnicas histoenzimáticas.

6. Las lesiones inducidas por el AZT son fundamentalmente a nivel mitocondrial, cualquiera que sea el tejido estudiado. Todos los tejidos son diana, en tanto en cuanto lo son las mitocondrias cualquiera que sea su localización.

7. Las alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias se caracterizan por matrices de baja densidad electrónica y desestructuración de las crestas. Las mitocondrias de los hepatocitos de los grupos que ingieren AZT además de presentar las lesiones antes descritas, aparecen incluidas en vacuolas autofágicas.

8. Ultraestructuralmente las alteraciones mitocondriales varían en su patocronia con relación a la estructura histológica del órgano. Así, es más temprana en el tiempo en hígado y músculo cardíaco y más tardías en riñón y sistema nervioso central, perdurando durante todo el tiempo del experimento en el hígado.

9. La alteración mitocondrial inducida por el AZT es reversible y este hecho es independiente del mantenimiento de la administración o de la retirada del fármaco.

10. Las técnicas citofotométricas y de análisis de imagen contribuyen decisivamente en la valoración de posibles diferencias de las actividades histoenzimáticas en los tejidos estudiados.

En resumen, se observa una alteración multisistémica inducida por el tratamiento con AZT que se detecta con todas las metodologías utilizadas, tanto a nivel analítico, morfológico, ultraestructural como histoenzimático, siendo las lesiones fundamentalmente detectables a nivel mitocondrial. Con

el tiempo tales alteraciones revierten, lo que sugiere la existencia de mecanismos compensatorios o de adaptación en estos animales.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABRAMS DI.** Alternative therapies in HIV Infection. AIDS 1990; 4: 1179- 1187.
- ABRAMS DI,** Goldman AI, Lanner C et al. A comparative trial of didanosine or zalcitabine after treatment with zidovudine in patients with human immunodeficiency virus infected. N Engl J Med 1994; 330: 657-662.
- AGUILAR J** and Uriel J. VIH y sistema inmune. Mecanismos inmunopatogénicos. Rev Esp Microb Clin 1990; 5 (7): 371-385.
- ABOULKER JP** and Swart AM. Preliminary analysis of the Concorde Coordinatting Committee. Lancet 1993; 341 (8849):889-90.
- AHMED AE,** Jacob S, Loh JP, Samra SK, Nokta M, Pollard RB. Comparative disposition and whole- body autoradiographic distribution of (2-14C) Azidothymidine and (2-14C) thymidine in mice. J Pharmacol Exp Ther 1991; 257 (1): 479-486.
- ALTMAN FP.** Tetrazolium salt and formazans. Prog Histchem Cytochem 1976; 9: 1-56.
- ALTMAN FP.** The use of phenazine methosulphate in dehydrogenase histochemistry-the concept of type I and type II hydrogen. Proc Microsc Soc 1979; 14:1 (Abstr).
- ANDERSON RM,** Gupta S, May RM. Potential of community-wide chemotherapy or immunotherapy to control the spread of HIV-1. Nature 1991; 350: 356-359.
- ANDERSON SF** and Coleman JE. Conformational changes of HIV reverse transcriptase subunits on formation of heterodimer: correlation with Kcat and Km. Biochemistry 1992; 31 (35): 8221-8228.
- AREZO JC,** Schaumburg HM, Schroeder C et al. Dideoxycytidine (ddc) neuropathy: An animal model in the Cinomolgus monkey. Neurology 1990; 40 (suppl 1): 1134P.
- ARIAS J,** Lorente L, Aller MA et al. Cirugia hepática experimental. Ed Kronos. "Fármacos e hígado" 1993; pg: 161-172.
- ARNAUDO E,** Dalakas M, Shauske S et al. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine- induced myopathy. Lancet 1991; 337: 508-510.
- ARTIGAS J,** Arasteh K, Averdunk R et al. Hyaline globules reacting positively with zidovudine antibody in brain and spinal cord of AIDS patients. Lancet 1991; 337: 1127-1128.
- AVRAMIS VI,** Kwock R, Solozano MM; Gomperts E. Evidence of in vitro development of drug resistance to Azidothymidine in T-Lymphocytic leukemia cells lines (Jurkat E6-1/azt-100) and pediatrics patients with HIV-1 infection. J Acq Imm Def Synd 1993; 6:1287-1296.

- BABA M**, De Clercq E, Schols D et al. Novel sulfated polysaccharides: dissociation of anti-human immunodeficiency virus activity from antithrombin activity. *J Infec Dis* 1990,61:208-213.
- BACCHETTI P**, Moss AR, Andrews JC, Jacobson MA. Early predictors of survival in symptomatic HIV- infected persons treated with high - dose zidovudine. *J Acq Imm Def Synd* 1992; 5:732-736.
- BALARINI J**, Hao Z, Herdewun P et al. Intracellular metabolism and mechanism of antiretrovirus action of 9- (2-phosphonyl methoxyethyl) adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1499-1503.
- BALIS FM**, Pizzo PA, Eddy J et al. Pharmacokinetics of zidovudine administered intravenously and orally in children with HIV infection. *J Pediatr* 1989; 114:880-884.
- BALL LM**. Zidovudine experience at the hospitals for sick children Great Ormond Street, London. *J Infec* 1989; 18 (Suppl I): 83.
- BALLEI M**, Battelli D, Fornieri C et al. Changes in liver structure and function after short-term and long-term treatment of rats with dehydroepiandrosterone. *J Nut* 1992; 122 (4):967-976.
- BALLEM PJ**, Belzberg A, Devine DV et al. Kinetics studies of the mechanism of thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327:1779-1784.
- BALTIMORE D**. Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 1970; 226: 1211-13.
- BARNES JM**. Toxic hazards from drugs. *J Pharmacol* 1963; 15 sup 75T-91T.
- BARRE-SINOUSI F**, German JC, Rey F et al. Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 225: 63-66.
- BARTLETT JG**. New drugs for patients with human immunodeficiency virus infection. *Infec Dis Clin Pract* 1992; 1:91-96.
- BARTLETT JG**. Zidovudine now or later ?. *N Engl J Med* 1993; 329(5):351-352.
- BHATIA A**. Morphological changes in the liver on chronic administration of small doses of paracetamol in albino rats. *Indian J Pathol Microbiol* 1990; 33 (3): 221-223.
- BERGER AR**, Arezzo JC, Schaumburg HH et al. 2',3'-dideoxycytidine (ddc) toxic neuropathy: a study of 52 patients. *Neurology*, 1993; 43(2):358-362.
- BERGER EA**, Clouse KA, Chanhary VK et al. CD4- pseudomonas

- exotoxin hybrid protein blocks the spread of human immunodeficiency virus infection in vitro and is active against cells expressing. The envelope glycoproteins from diverse primate immunodeficiency retroviruses. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:9539-9543.
- BERGER JR**, Shebert R, Gregorios JB. Exacerbation of HIV-associated myopathy by zidovudine. AIDS 1991; 5 (2): 229-230.
- BETTAIEB A**, Oksenhendler E, Fromont P, Duedan N, Bierling P. Immunochemical analysis of platelet autoantibodies in HIV-related thrombocytopenic purpura: a study of 68 patients. Br J Haematol 1989; 73:241-247.
- BESSEN LJ**, Greene JB, Louie E, Seitzman P, Weinberg H. Severe polymyositis-like syndrome associated with zidovudine therapy or AIDS and ARC. N Engl J Med 1988; 318:708.
- BLANCHE S**, Caniglia M, Fischer A, et al. Zidovudine therapy in children with acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med 1988; 85:203-207.
- BLUM MR**, Liao HT, Good SS, Miranda P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. Am J Med 1988; 85:189-194.
- BODEL L** and Riegel S. Zidovudine-associated myopathy. Lancet 1988; 2: 689-690.
- BOLOGNESI D**. Immunobiology of the HIV envelope. Viral oncogenesis and cell differentiation (Diamond L, Wolman SR eds). The NY Academy of Sciences, New York 1989; pag: 69-81.
- BOZZETTE SA**, Santangelo J, Villasana D et al. Peripheral nerve function in persons with asymptomatic or minimally symptomatic HIV disease: Absence of zidovudine neurotoxicity. J Acq Imm Def Synd 1991; 4: 506-512.
- BOUCHER CA**, Tersmette M, Lange JMA et al. Zidovudine sensitivity of human immunodeficiency viruses from high-risk, symptom free individuals during therapy. Lancet 1990; 336: 585-590.
- BOUCHER CA**, O'Sullivan E, Mulder JW et al. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 Human Immunodeficiency Virus-Positive subjects. J Infect Dis 1992; 165 (1): 105-110.
- BOUDINOT FD**, Schinazi RF, Gallo JM et al. 3'-Azido-2',3'-Dideoxyuridine (AZDDU): Comparative pharmacokinetics with AZT in monkeys. AIDS 1990; 6 (2): 219-228.
- BOYAR A** and Beall G. HIV-seropositive thrombocytopenia: the action of zidovudine. AIDS 1991; 5 (11): 1351-1356.
- BREW BJ**. HIV-1 related neurological disease. J Acq Imm Def Synd 1993; 6 (suppl 1): 510-515.

- BRODER S**, Mitsuya H, Yarchoan R, Pavlakis GN. Antiretroviral therapy in AIDS. *Ann Intern Med* 1990; 115: 604-618.
- BUCK HM**, Koole LH, Van Genderen MHP et al. Phosphate- methylated DNA aimed at HIV- 1 RNA loops and integrated DNA inhibits viral infectivity . *Science* 1990; 248:208-212.
- BUTLER KM**, Husson RN, Balis FM et al. Dideoxyinosine in children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 137-144.
- BYRN RA**, Mordenti J, Lucas C et al. Biological properties of a CD4 immunoadhesin. *Nature* 1990; 334:667-670.
- CARBAJO S**, López-Bravo A, Carvajal JC. Análisis de imagen en medicina. *Inf Med Bio* 1990; 4: 26-37.
- CARRASCAL E**. Láminas de histología. Univ Salamanca y E. Carrascal. 1982
- CARRASCO JL**. El método estadístico en la investigación medica. Ed. Ciencia 3. S.A. 1987; pag: 520-521.
- CARTER WA**, Strayer DR, Brodsky Y et al. Clinical immunological and virological effects of amplitgen a mismatched double-stranded RNA, in patients with AIDS of AIDS- related complex. *Lancet* 1987; 1:1286-1292.
- CASOLI C**, Magnani G, Schianchi C, Barchi E, Bertazzoni U. Enhancement of erythrocytic adenosine deaminase following treatment of AIDS- related complex/ AIDS patients with zidovudine. *AIDS* 1990; 4: 799-802.
- CDC**. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). United States. *N M W R* 1982; 31:507-508.
- CDC**. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *M M W R* 1986; 36(Sup11):3-15.
- CHALMERS AC**, Greco CM, Miller RG. Prognosis in AZT myopathy. *Neurol* 1991; 41 (8): 1181-1184.
- CHARIOT P**, Monnet I, Gherardi R. Cytochrome c oxidase reaction improves histopatological assesement of zidovudine myopathy. *Ann Neurol* 1993; 34 (4): 561-565.
- CHEN-CH**, Vazquez- Padua M, Cheng-YC. Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleosides analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity . *Mol Pharmacol* 1991; 39(5): 625-628.
- CHEN-MAYER C**, Shioda T, Levy JA. Host range , replicative and cytopatic properties of human immunodeficiency virus tipe 1 are determined by very few amino acid changes in tat and gp120. *J Virol* 1991; 65(12):6931-6941.

- CHOW FP**, Sutton PA, Hamburger AW. Sensitivity of erythroid progenitor colonies to erythropoietin in azidothymidine treated immunodeficient mice. *Br J Hematol* 1991; 77 (2): 139-144.
- CLASIFICACION OF NOMENCLATURE OF VIRUSES**. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Ed RB Francki, CM Fauquet, Di Knudson, F Brown. *Arch Virol* 1991; (supl 2):290-299.
- CILLERUELO MJ**, Mellado MJ, Villota J et al. Tratamiento con zidovudina en niños. *Pub of SEISIDA* 1991; 2(3): 141-142.
- CLAVEL F**, Guetard D, Brun-Bezinet F et al. Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. *Science* 1986; 223: 343-346.
- COFFIN JM**. RETROVIRIDAE. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of International Committee on Taxonomy of viruses. (RIB Francki, CM Fauquet, DL Knudson and F Brown, Eds). *Archives of Virology*, 1991, Supplementum 2. Springer-Verlag.
- COFFIN JM**. Structure and classification of retroviruses. En the viruses. Vol 1. Ed. Levy JA. The retroviridae. Plenum USA 1993.
- COHEN E**, Terwillinger E, Sodroski J et al. A novel HIV-1 transactivator that specifies rapid growth (vpr). The laboratory of tumor cell biology, NCI, Annual meeting 1989; 20-26 agosto.
- COHEN J**. Early AZT takes a pounding in French-British Concorde trial. *Science* 1993; 260 (5105): 157.
- COLLIER AC**, Coombs RW, Fisch MA et al. Combination therapy with zidovudine and didanosine compared with zidovudine alone in HIV-1-infection. *Ann Intern Med* 1993; 119 (8): 786-793.
- COLLIERS AC**, Bozzette S, Coombs RW et al. A pilot study of low-dose zidovudine in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1990; 323: 1015-1021.
- COLLINS JM**, Klecker RW, Kelley JA, et al. Pyrimidine dideoxynucleosides: selective penetration into cerebrospinal fluid. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 24: 466-470.
- CONWAY B**, Halliday WC, Bunham RC. Human immunodeficiency virus-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: apparent response to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (3): 479-482.
- COOLEY TP**, Kunches LM, Saundreys CA et al. Once-daily administration of 2'3'-dideoxyinosine (ddI) in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *N Engl J Med* 1990, 322:1340-1345.

- COOPER DA**, Gatell JM, Kroon S et al. Zidovudine in persons with asymptomatic HIV infection and CD4+ cells counts greater than 400 per cubic millimeter. *New Engl J Med* 1993; 329(5):297-303.
- CORDONNIER A**, Montagnier L, Emerman M. Single aminoacid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 1989; 340: 571-574.
- COSTA JR**, Damiano A, Rubio R. La infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana. Patogenia, diagnóstico, y tratamiento. Ed Wellcome. España 1991; pg:22.
- COTTON P**. AIDS giving rise to cardiac problems. *J A M A* 1990; 263 (16): 2149.
- COWAN FM**, Jones G, Bingham J et al. Use of zidovudine for drugs misusers infected with human immunodeficiency virus. *J Infec* 1989; 18 (suppl I): 59-66.
- CRETTON EM**, Xie MY, Bevan RJ, Gondgaon NM, Scinazi RF; Sommadoss JP. Catabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine in hepatocytes and liver microsomes, with evidence of formation of 3'-amino-3'-deoxythymidine, a highly toxic catabolite for human bone marrow cells. *Mol Pharmacol* 1991; 39 (2): 258-266.
- CREAGH-KIRK T**, Doi P, Andrews E. Survival experience among patients with AIDS receiving zidovudine. *J A M A* 1988; 260: 3009-3015.
- CRUMPAKER C**, Bublely G, Lucey D, Hussey S, Connor J. Ribavirin enters cerebrospinal fluid. *Lancet* 1986; 2:45-46.
- CRUZ- SANCHEZ FF**. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y alteraciones neurológicas. *Med Clin (Barc)* 1992; 98:53-54.
- DALAKAS MC**, Gravell M, London WT et al. Morphological changes of an inflammatory myopathy in Rhesus monkeys with simian Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 185: 368-376.
- DALAKAS MC**, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1098-1105.
- DAHLBERG JE**. An overview of retrovirus replication and classification, en Kalman Perk. *Immunodeficiency disorders and retroviruses*. Londres. Academic Press. 1988.
- DANIELS D**, McCormack S, McLea K, Davies P, Lane R. Zidovudine-related myopathy. *Lancet* 1990; 336:1256.
- DARNELL-LODISH-BALTIMORE**. *Biología celular y molecular*. Ed Labor 1988; pg: 859-895.

- DHIVER C**, Oliver D, Rousseau S et al. Pilot phase 1 study using zidovudine in association with a 10 day course of anti-CD4 monoclonal antibody in seven AIDS patients. *AIDS* 1989; 3: 835-842.
- DIAZ FLORES L**, Sánchez G, Aneiros J et al. Anatomía patológica general. I; 1979. Cap 1 " patología celular " pg: 53-109.
- DOLEI A**, Fattorossi A, D' Amelio R, Ainti F, Dianzoni F. Direct and cells -mediated effects of interferon and on cells chronically infected with HTLV-III. *J Inter Res* 1986; 6: 543- 549.
- DORNSIFE RE**, St Clair MH, Huang AT et al. Anti-Human immunodeficiency virus synergism by zidovudine (3'-azidothymidine) and didanosine (dideoxyinosine) contrast with their additive inhibition of normal human marrow progenitor cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (2): 322-328.
- EUROPEAN**, Australian, Collaborative group. The efficacy and safety of zidovudine therapy in early asymptomatic infection. Amsterdam 1992; VIII International Conference on AIDS. Abstract poB3718.
- EUROPEAN Collaborative STUDY**. Children born to women with HIV-1 infection : natural history and risk of transmission. *Lancet*; 337. 253-260.
- FARTHING Ch F**, Dalgleish AG, Clark A, Mc Clure M, Chanas A, Gazzard BG. Phosphonoformate (Foscarnet): A pilot study in AIDS and AIDS- related complex. *AIDS* 1987; 1:21-25.
- FAZELY F**, Sharma PL, Fratazzi C, et al. Simian Immunodeficiency virus infection via amniotic fluid: a model to study fetal immunopathogenesis and prophylaxis. *J Acq Imm Def Synd* 1993, 6:107-114.
- FERNANDEZ-CRUZ E**. Tomado del Curso de formación médica continuada sobre la infección por el Virus de la inmunodeficiencia humana. R. Najera y J González laHoz. Ed Bristol Myers, 1992; pg: 61-89.
- FERRAZIN A**, De María A, Gotta C, et al. Zidovudine therapy of HIV-1 infection during pregnancy: Assessment of the effect on the newborns. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6: 376-379.
- FIALA M**, Cone LA, Cohen N et al. Responses of neurologic complications of AIDS to 3'- azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, I. Clinical features. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (2): 250-256.
- FIDDIAN AP** et Collaborative European/ Australian Study Group. Preliminary report of a multicentre study of zidovudine plus or minus acyclovir in patients with acquired immune deficiency syndrome or acquired immune deficiency syndrome-

- related complex. *J Infect* 1989; 18 (Suppl I): 79-80.
- FISCHL MA**, Richman DD, Grieco MH. The efficacy of AZT in the treatment of patients with AIDS and AIDS -related complex. *N Engl J Med* 1987; 317 (4): 185-191.
- FISCHL MA**, Richman DD, Cansey DM et al. Prolonged zidovudine therapy in patients with AIDS and advanced AIDS-related complex. *J A M A* 1989; 262 (17): 2405-2410.
- FISCHL MA**, Parker CB, Pettinelli C et al. A randomized controlled trial of a reduced daily dose of zidovudine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1990a; 323: 1009-1014.
- FISHL MA**, Richman DD, Halsen N et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type I (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1990b; 112:727-737.
- FREIMAN JP**, Helfert KE, Hamrell MP, Stein DS. Hepatomegaly with severe steatosis in HIV-seropositive patients. *AIDS* 1993; 7 (3): 379-385.
- FURMAN PA** and Barry DW. Spectrum of antiviral activity and mechanisms of action of zidovudine. *Am J Med* 1988; 85: 176-181 (Suppl 2A).
- FURTH PA** and Kazakis AM. Nail pigmentation changes associated with zidovudine. *Ann Intern Med* 1987; 107:350.
- GALLICANO K**, Sahai J, Ormsby E, Cameron DW et al. Pharmacokinetics of zidovudine after initial single dose and during chronic-dose therapy in HIV-infected patients. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 36 (2): 128-131.
- GALLICHO VS** and Huges NK. Suppression of murine hematopoiesis in vivo after chronic administration of zidovudine: evidence that zidovudine-induced anemia is the result of decreased bone marrow-derived, erythropoietin-responsive progenitor cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 199 (4): 459-465.
- GALLICHO VS**, Hughes NK, Tse KF. In vivo effect of interleukin 3 and erythropoietin, either alone or in combination on the hematopoietic toxicity associated with zidovudine. *Cytokine* 1993; 5 (1): 62-71.
- GALLO RC**, Sarin P, Gelman E. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 862-865.
- GALLO RC**, Salahuddin SZ, Popovic M et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224: 500-503.

- GALLO RC.** HIV the cause of AIDS. An over view of its Biology. Mechanism of disease induction and our attempts to control it. *J Acq Imm Def Synd* 1988; 1: 521-535.
- GANB J,** Pedersen C, Poulsen AG, et al. The effect of Foscarnet (phosphonoformate) on human immunodeficiency virus isolation, T- cell subsets and lymphocyte function in patients. *AIDS* 1987; 1:27-33.
- GARBARCH C,** Andersen H, Hoyer PE. Succinate dehydrogenase activity in the wall of rabbit aorta. *Histochemistry* 1978; 57: 297-304.
- GATELL JM.** Zidovudina en la terapia precoz de la infección por VIH y situaciones especiales. *Publ Of SEISIDA* 1994; 5 (3): 147-148.
- GHADIALLY FN.** Butter worths . Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 3 Ed. Vol I 1992; "Mitochondria" pag: 191-350.
- GELDERBLOM HR.** Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; 5 (6): 617-638.
- GERTNER E,** Thurn JR, Williams DN et al. Zidovudine-associated myopathy . *Am J Med* 1989; 86: 814-818.
- GILL P,** Rarick M, Brynes RK, Caysey D, Loureiro C, Levine AM. Azidothymidine associated with bone marrow failure in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1987; 107: 502-505.
- GILL S,** Tang A, Cordery M et al. The effects of twice and four times daily zidovudine on p24 antigenaemia in CDC stage II/III patients. *Genitourin Med* 1991; 67: 15-17.
- GLAUERT AM.** Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical methods in electron microscopy.* Ed. A.M. Glauert, 1987.
- GOGU SR,** Beckman BS, Agrawal KC. Amelioration of zidovudine-induced fetal toxicity in pregnant mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (11): 2370-2374.
- GOOD SS,** Durak DT, De Miranda P. Biotransformation in various species and the human of 3'-azido-3'-deoxy-thymidine, a potential agent for the treatment of AIDS. *Fed Proc* 1986; 45: 444 (Abst N° 1690).
- GONZALEZ LAHOZ JM.** SIDA . Guías diagnóstico-terapéuticas. Idepsa (Eds), 1991.
- GONZALEZ LAHOZ JM,** García Aguado C, Martínez R, Laguna F. pigmentación azulada en las uñas de los pacientes con SIDA. ¿ Efecto colateral de la zidovudina?. *Rev Clin Esp* 1988; 183:278-279.

- GONALEZ LAHOZ JM**, Martinez R, Garcia A et al. Respuesta clínica de los pacientes infectados por VIH a diferentes fármacos antiretrovirales. Experiencia propia con zidovudina. Bol Fund Jimenez Diaz 1988; 12:113-118.
- GONZALEZ LAHOZ JM** and Najera R. Estado actual y perspectivas futuras de la terapia antiretroviral antiVIH. Public. Oficial de la Sociedad Española Interdisciplinaria de SIDA 1993; 4(8): 443-446.
- GONZALEZ LAHOZ J** and Soriano V. Clínica del SIDA. Curso de formación médica continuada sobre la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Ed. Soc. Esp. Interdisciplinaria del SIDA. Najera R, Gonzalez- Lahoz J. 1992.
- GORARD DA**, Henry K, Guilloff RJ. Necrotising myopathy and zidovudine. Lancet 1988; 1: 1050.
- GOUDSMIT J.** I Congreso Nacional sobre el SIDA. Madrid . 5-8 marzo, 1991. Abstract en Pub of SEISIDA, 1991; 2(3):99.
- GOTZSCHE P.** Zidovudine dosage. Nordic Medical Research Councils' HIV therapy Group. B M J 1993; 307 (6905): 682-683.
- GRAGERA R**, Saborido A, Molano F et al. Ultrastructural changes induced by anabolic steroids in liver of trained rats. Histol Histopath 1993; 8:449-455.
- GRAHAM NMH**, Piantadosi S, Park LP et al. CD4+ lymphocyte response to zidovudine as a predictor of AIDS-free time and survival time. J Acq Imm Def Synd 1993; 6: 1258-1266.
- GRAY F**, Geny C, Dournon E, Fenelon G, Lionnet F, Gherardi R. Neuropathological evidence that zidovudine reduces incidence of HIV infection of grain. Lancet 1991; 337 (8745): 852-853.
- GREENE WC.** The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. N Eng J Med 1991; 324(5):308-317.
- GRIECO MH**, Reddy MM, Manvar D, Ahuja KK, Moriarty M. In vivo immunomodulation by isopirinosine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and related acquired. Ann Intern Med 1984;101:206-207.
- GRIFFIN DE.** Therapy of viral infections of the Central Nervous System. Antiv Res 1991; 15: 1-10.
- GRIFFITHS DA**, Hall SD, Sokol PP. Interaction of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine with organic ion transport in rat renal basolateral membrane vesicles. J Pharmacol Exp Ther 1991; 251 (1): 149-155.
- GRIFFITHS DA**, Hall SD , Sokol PP. Effect of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) on organic ion transport in rat renal brush border membrane vesicles. J Pharmacol Exp Ther 1992;

260: 128-133.

GRINNA L. Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech Ageing Develop* 1977; 6: 197-205.

GRIGOR'EV IP. Ultrastructural reorganization the rat cerebral cortex after injection of ascorbic acid into the ventricular fluid. *Neurosci Behav Physiol* 1989; 19 (6): 529-534.

GRISCELLI C. The Frech zidovudine open study. International seminar series. Rome. June, 1989.

GULEVICH ST; McLutchan A, Thal LJ et al. Effect of antiretroviral therapy on the cerebrospinal fluid of patients seropositive for the Human Immunodeficiency Virus. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6:1002-1007.

HAGLER D and Frame PT. Azidothymidine neurotoxicity. *Lancet* 1986; 2: 1392-1393.

HALL DO and Palmer JM. Mitochondrial research today. *Nature* 1969; 211: 717-723.

HAMBURGER AW, Zsebo K, Chow FP. Failure of stem cell factor to ameliorate AZT-induced anemia in immunodeficient mice. *Eur J Haematol* 1993; 50 (3): 172-178.

HAMILTON JD, Hartigan PM, Simberkoff MS. A controlled trial of early versus late treatment with zidovudine in symptomatic human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992; 326: 437-443.

HARAWIS S and O'Hara CI. Pathology and pathophysiology of AIDS and HIV-related diseases. 1989. The C.V. Mosby company. St Louis, Washington DC; Toronto. pg:224-226.

HARRER T, Hunzelmann N, Stoll R, Baur A, Kalden JR. Therapy for HIV- 1- related nephritis with zidovudine. *AIDS* 1990; 4: 815-824.

HASELTINE W and Wrong- Staal F. Biología molecular del virus del SIDA. *Invest y Ciencia.* "Lo que la Ciencia sabe sobre el SIDA". Prensa Científica, Barcelona 1988;1: 20-29.

HAYAKAWA M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176 (1): 87-93.

HEAGY W, Crumpaker C, Lopez PA, Finberg R. Inhibition of Immune functions by antiviral drugs. *J Clin Invest* 1991; 87: 1916-1924.

HELBERT M, Fletcher T, Peddle B, Harris JR, Pinching AJ. Zidovudine- associated myopathy. *Lancet* 1988; 2: 689-690.

- HENDERSON DK** and Gerberding JL. Prophylactic zidovudine after occupational exposure to the human immunodeficiency virus: An interim Analysis. *J Infec Dis* 1989; 160 (2): 321-327.
- HENRY JB**. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Todd-Sanford- David Söhn. Tomo I (8 ED), Salvat 1988; pg: 338-350.
- HENRY K**, Chinnock BJ, Quinn RP, et al. Concurrent zidovudine nevels in semen and serum determined by radioimmunoassay in patients with AIDS or AIDS-related complex. *J Am Med Ass* 1988; 259: 3023-3026.
- HEYWOOD L** and Backshaw A. Lactate dehydrogenase activity in the rat testis: A comparison between fluorimetric assay of freeze-dried sections and histochemical localization with phenazine methosulphate. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 967-972.
- HERMANS P**. Antiviral treatment. *Acta Urol Bel* 1993; 61 (1-2): 593-598.
- HEWITT RG**, Morse GD, Lawrence WD et al. Pharcacokinetics and pharmacodinamics of granulocyte-macrophage colony-stimulateing factor and zidovudine in patients with AIDS and severe AIDS-related complex. *Antimicrob Agent Chemother* 1993; 37 (3): 512-522.
- HIRSCH MS** and Kaplan JC. Treatment of human immunodeficiency virus infections. *Antimicrob Agents Chemoter* 1987, 31:839-843.
- HORWITZ JP**, Chua J, Met N et al. Nucleosides V. The monomersylates of 1-(2'-deoxides b-D-Lyxofuranoxyl) thimine. *J Org Chem* 1964; 29: 2076-2078.
- HOTH DF Jr** and Myers MW. Estado actual del tratamiento contra el VIH.I. Agentes antiretrovíricos. *Hosp Practice (Ed. Esp)* 1991; 6: 56-66.
- HOWELL RM**, Fitzgibbon JE, Noe M et al. In vivo sequence variation of the human immunodeficiency virus type 1 env gene: evidence for recombination among variants found in a single individual. *AIDS Resand Human Retrov* 1991; 7:869-876.
- INFORMACION DE MEDICAMENTOS**. Ed Ministerio de Sanidad y Consumo, 1992. Traducción de la 11 edición de la USP.DI. Zidovudina (acción sistémica).
- JACOB-MOLINA A** and Arnold E. Reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* 1991; 30: 6351-6361.
- JACOBSON MA**, Abrams DI, Volberding PA et al. Serum B - Microglobulin decreases in patients with AIDS or ARC treated with azidothymidine. *J Infec Dis* 1989; 159(6): 1029-1036.

- JACOBSON MA**, Vander Horst C, Causey DM, Dehlinger M, Hafner F, Mills J. In vivo antiretroviral effect of combined zidovudine and foscarnet therapy for human immunodeficiency virus infection (ACTG Protocol 053). *J Infect Dis* 1991; 163:1219-1222.
- JOHNSON VA**, Barlow MA, Merrill DP et al. Three-drug synergistic inhibition of HIV-1. Replication in vitro by zidovudine, recombinant soluble CD4, and recombinant interferon-alpha A *J Infect Dis* 1990; 161: 1059-1067.
- JOHNSON VA**, Merrill DP, Videler JA et al. Two-drug combinations of zidovudine, didanosine, and recombinant interferon- L inhibit replication of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 synergistically in vitro. *J Infect Dis* 1991; 164:646-655.
- JONES P**. Zidovudine: experience at the Newcastle haemophilia Centre. *J Infect* 1989; 18 (Suppl I): 53-58.
- KAPLAN LD**, Wofsy CB, Volberding PA. treatment of patients with acquired immunodeficiency syndrome and associated manifestations. *J A M A* 1987; 257: 1367-1374.
- KARPAS A**. Origin and spread of AIDS . *Nature* 1990; 348:578.
- KASHANCHI F**, Piras G, Radopovich MF et al. Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator tat. *Nature* 1994; 336:295-299.
- KAWCZYNSKI W**, Czochralska B, Shugar D. Electrochemical reduction products of azido nucleosides including zidovudine (AZT): mechanisms and relevance to their intracellular metabolism. *Acta Biochim Pol* 1993; 40 (2): 213-223.
- KIMELBERG HK**. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on Na⁺ K⁺ stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1974; 249:1071-1080.
- KIRKPATRICK P** and Marshall RJ. Technical advances in histopathology. 15 Recent advances in histopathology. Eds Anthony PP, MacSween RNM. Ed Churchill Livingstone, 1993;241-252.
- KLECKER RW**, Collins JM, Yarchoan R et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3' deoxythymidine: a novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41:407-412.
- KOHLSTAEDT LA**, Wang J, Friedman JM et al. Crystal structure at 3.5A resolution of HIV- 1 reverse transcriptase complex with a inhibitor. *Science* 1992; 256 (1): 1783- 1790.
- KORNHAUSER DM**, Petty BG, Hendrix CW, et al. Probenecid and zidovudine metabolism. *Lancet* 1989; 2 (8661): 473-475.

- KRASNY HC** and Good SS. Pharmacokinetics and metabolism of azidothymidine in the dog. *Fed Proc* 1986; 45:207.
- KUGLER P** and Wrobel KH. Meldola blue: a new electron carrier for the histochemical demonstration of dehydrogenases (SDH, LDH, G-6-PDH). *Histochemistry* 1978; 59: 97-107.
- LAMBERT JS**, Seidlin M, Reichman RC et al. 2', 3'-dideoxinosine (ddI) in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *N Engl J Med* 1990; 322:1333- 1340.
- LAMPERTH L**, Dalakas MC, Dagani F, Anderson J, Ferrari R. Abnormal skeletal and cardiac muscle mitochondria induced by (AZT) in Human muscle in vitro and in an animal model. *Lab Invest* 1991; 65 (6): 742-751.
- LANE HC**, Davey V, Kovacs JA, et al. Interferon- in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1990; 112:805-811.
- LANGE JMA**, Wolf, Mulder JW, Countinho RA, van der Noordaa J, Goudsmit J. Markers for progression to acquired immunodeficiency syndrome and zidovudine treatment of asymptomatic patients. *J Infec*, 1989; 18 (Supl I): 85-91.
- LANGTRY HD** and Campoli DM. Zidovudine a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 1989; 37: 408-450.
- LANGTRY HD**, Palmer KJ, Benfield P. Zidovudine. A review of pharmacoeconomic and quality-of life consideration for its use in patients with human immunodeficiency virus. *Pharma Economics* 1993; 3(4): 309-337.
- LANSKIN OL**, Longostreth JA, Hart CC et al. Ribavirin disposition in high-risk patients for acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41:546-555.
- LARDER BA** and Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high - level resistance zidovudine (AZT). *Science* 1989; 24: 1157-1158.
- LARDER BA**. 3'-Azido-3'-Deoxythymidine resistance suppressed by a mutation conferring Human Immunodeficiency Virus Type 1 resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrobiol Ag Chem* 1992; 36 (12): 2664- 2669.
- LEE H**, Swanson P, Shorty VS et al. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. *Science* 1989; 244: 471-475.
- LEGIDO A**. Neurología del síndrome de inmunodeficiencia adquirida en la infancia. *An Esp Pediat* 1989; 31 (3): 274-279.
- LEVINE AM**, Wernz JC, Kaplan L et al. Low-dose chemotherapy with central nervous system prophylaxis and zidovudine

- maintenance in AIDS- related lymphoma. J A M A 1991; 266 (17): 284-288.
- LEWIS PR** and Knight DP. Staining method sectioned material. Practical methods in electron microscopy. Ed. A.M. Glauret, 1988.
- LEWIS W**, Papoian T, González B et al. Mitochondrial ultrastructural and molecular changes induced by zidovudine in rat hearts. Lab Invest 1991; 65 (2): 228-236.
- LEWIS W**, Gonzalez B, Chomyn A, Papoian T. Zidovudine induces molecular, biochemical, and ultrastructural changes in rat skeletal muscle mitochondria. J Clin Invest 1992; 89: 1354-1360.
- LIEBES L**, Mendoza S, Wilson D, Dancis J. Transfer of zidovudine (AZT) by human placenta. J Infec Dis 1990; 161: 203-207.
- LITTLE RJ**, Brewster ME, Bodor MS. Brain-targeting of azidothymidine (AZT). 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New York, October 4-7, 1987. Abstract Nº 380, pg 163.
- LYMAN WD**, Tanaka KE, Kress y et al. Zidovudine concentrations in human fetal tissue: implications for perinatal AIDS. Lancet 1990; 335:1280-1281.
- LOPEZ-ANAYA A**. Pharmacokinetics of AZT.I. Transplacental transfer. J Acq Imm Def Synd 1990; 3: 959-964.
- LOPEZ-ANAYA A**, Unadkat JP, Schumann LA, Smith AL. Pharmacokinetics of zidovudine (Azidothymidine). II Development of metabolic and renal cleavage pathways in the neonate. J Acq Imm Def Synd 1990; 3: 1052-1058.
- LOPEZ BRAVO A**. Patología de las mitocondrias. Programa de Anatomía patológica. Fac. Med. Univ. Salamanca, 1993.
- LOUAGNE F**, Bettaieb A, Henry A et al. Infection of megakaryocytes by human immunodeficiency virus in seropositive patients with human immune thrombocytopenic purpura. Blood 1991; 78: 1697-1705.
- LUSSO P**, de María A, Mainati M et al. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8* T lymphocytes by human herpes virus 6. Nature 1991; 349: 553-555.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ R** and Martínez-Murillo R. In vitro d-amphetamine action on oxido-reductase activity of several rat nervous centres. Acta Histochem 1984; 74:85-90.
- MARX PA**, Miller CH J, Alexander NJ et al. An animal model for sexual transmission of HIV. Alexander NJ, Gabelnick HL, Spieler JM eds. Heterosexual transmission of AIDS. New York: Wiley- Liss, 1990; 123-135.

- MAYX DC**, Dixon KF, Balboa a et al. A nonprimate animal model applicable to zidovudine pharmacokinetics in humans: inhibition of glucoronidation and renal excretion of zidovudine by probenecid in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259 (3): 1261-1270.
- McCLOSKEY SE**, Rege AB, Bertora JL et al. Zidovudine pharmacokinetics and plasma levels in patients with HIV infection. *Clinical Research* 1988; 36: 21A.
- MCDONELL D**, Mupphy R, Sahgl V et al. Myopathy associated with infection and zidovudine therapy. *CDC AIDS Weekly*. January 16, 1989, 23 A.
- McKINNEY RE**, Maha MA, Connor EM et al. A multicenter trial of oral zidovudine in children with advanced human immunodeficiency virus disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1018-1025.
- McLEAN AR**, Emery VC, Webster A, Griffiths PD. Population dynamics of HIV within and individual after treatment with zidovudine. *AIDS* 1991; 5 (5): 485-489.
- McLEAN AR** and Nowack MA. Competition between zidovudine-sensitive and zidovudine-resistant strains of HIV. *AIDS* 1992; 6: 71-79.
- McMAHON DK**, Winkelstein A, Armstrong JA et al. Zidovudine therapy is associated with and increased capacity of phytohemagglutinin-stimulated cells to express interleukin-2-receptors. *AIDS* 1991; 5 (5): 491-496.
- McQUADE TJ**, Tomaselli AC, Lin B et al. A synthetic HIV-1 protease inhibitor with antiviral activity arrest. HIV- like particle maturation. *Science* 1990; 247: 454-456.
- MEEK TD**, Lambert DM, Dreyer CB et al. Inhibition of HIV-1 protease in infected T- lymphocytes by syntetic peptide analogs. *Nature* 1990; 343: 90-92.
- MEIJER AE**. Adaptations of method in enzyme histochemistry to the different metabolic conditions in cells and tissues. *Cell Mol Biol* 1978; 23: 157-170.
- MELAMED AJ** and Raymond PD. Possible zidovudine-induced hepatotoxicity. *J A M A* 1987; 258: 2063.
- MENG TC**, Fischl MA, Richman DD. AIDS clinical trials group: Phase I/II study of combination 2',3'-dideoxycytidine and zidovudine in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and advanced AIDS-related complex. *Am J Med* 1990; 88 (Supl 5B): 28S-30s.
- MENG TC**, Fischl MA, Boota AM et al. Combination therapy with zidovudine and Dideoxycytidine in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. A phase I/II study.

- Ann Inter Med 1992; 116: 13-20.
- MEYER PR** and Klatt EC. AIDS and the heart. Progress in AIDS pathology. Vol I 1989. Ed Herdrun Rotterdam Schelondon. Sommerfield & Wood Medical Publishers. Inc.
- MYERS G**, Rabson AB, Josephs SF et al. Human retroviruses and AIDS. Los Alamos. Nuevo Mexico, 1989.
- MHIRI C**, Bauchimont M, Bonne G et al. Zidovudine myopathy: A distinctive disorder associated with mitochondrial dysfunction. Ann Neurol 1991; 29 (6): 606-614.
- MILDVAN D** and Machado SG. Concentraciones de interferón endógeno y triglicéridos para evaluar la respuesta de zidovudina en el SIDA y el complejo relacionado con el SIDA en fase avanzada. Lancet (Ed. Española) 1992; 21 (2): 71-74.
- MIQUEL J**. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. Miquel J Quintanilha AT, Weber H. eds. CRC Hand book of free radicals and antioxidants in biomedicine. Boca Ratón, Florida. CRC Press 1989; 1:3-13.
- MIQUEL J**. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. Mutation Research 1992; 275: 209-216.
- MIQUEL J** and Fleming JE. Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of aging, in: Free radicals, aging and degenerative diseases, Johnson JE Jr, Walford R, Harman D, Miquel J, Eds, Alan R Liss, New York, 57, 1986.
- MIRANDA de P**, Good SS, Yarchoan R et al. Alteration of zidovudine pharmacokinetics by probenecid in patients with AIDS-related complex. Clin Pharmacol Ther 1989; 46:494-500.
- MITSUYA H**, Weinhold KJ, Furman PA et al. 3' azido-3' deoxythymidine (BWA509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-Lymphotropic virus type III/ lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc Natl Sci USA 1985; 82: 7096-7100.
- MIZUKAWA K**, McGeer Pl, Vicent SR, McGeer Eg. Ultrastructure of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase-positive neurons in the cat cerebral cortex, amygdala and caudate nucleus. Brain Res 1988; 452 (1-2): 286-292.
- MOLLERING H**, Wahlefeld AW, Michal G. Visualization of NAD(P)-dependent reactions. In Bergmeyer HU(ed). Method of enzymatic analysis. Vol 1. Academic Press. New York 1974; pp 136-144.
- MONTAGNIER L**, Gruest J, Chamaret S et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. Science 1984;

225: 63-66.

MONTAGNIER L, Gougeon ML, Olivier R et al. Factors and mechanisms of AIDS pathogenesis. Science Challenging AIDS (Rossi GB, Beth-Giaraldo E, Chieco-Bianchi L et al, eds) Basel, Karger 1992, pgs: 51-70.

MONTANER JS, Gelmon JS, Tsoukas C. The effect of zidovudine on platelet count in HIV-infected individuals. J Acq Imm Def Synd 1990; 3: 565-570.

MOORE RD, Kevuly J, Richman DD et al. Natural history of advanced HIV disease in patients treated with zidovudine. AIDS 1992; 6: 671-677.

MORREY JD, Okleberry KM, Sidwell RW. Early-initiated zidovudine therapy prevent disease but not low levels of persistent retrovirus in mice. J Acq Imm Def Synd 1991; 4:506 -512.

MULDER JW, Cooper DA, Mathiesen L and Collaborative Group Study 017. Zidovudine twice daily in asymptomatic subjects with HIV infection and high risk of progression to AIDS: a randomized, double-blind-placebo-controlled study. AIDS 1994; 8(3):313-323.

MUÑIZ-DIAZ E, Domingo P, López M, Pujol-Moix N, Furter M, Madoz P. Trombocitopenia asociada a la infección por el VIH. Estudio inmunológico de 60 pacientes adictos a drogas por vía parenteral. Med Clin 1993; 101:761-765.

NAJERA I and Najera R. Transcriptasa inversa en el VIH. SIDA 1992; 3 (10): 11-16.

NAJERA R. SIDA de la biomedicina a la sociedad. Ed Eudema. 1990.

NAJERA R. Curso de formación médica continuada sobre la infección por el VIH (Najera R, González laHoz J). Ed. Bristol Myers, 1992. Capítulo 1, pg:1-59.

NAJERA R and González Lahoz J. Monografía de la Reunión de consenso sobre la infección por VIH. Terapéutica específica sobre VIH. Soc Esp Interd del SIDA, 1994.

NACHLAS MM, Tsoukas KC, Sousa E, Cheng CS, Seligman AML. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J Histochem Cyt 1957; 5: 40.

NIELSEN C, Gotzsche PC, Nielsen CM et al. Development of resistance to zidovudine in HIV strains isolated from CD4+ lymphocytes and plasma during therapy. Antivir Research 1992; 18: 303-316.

ORTIZ M. Estudios fenotípicos y de sensibilidad a AZT y ddI del VIH-1. Tesis Doctoral presentada en C. Biológicas. Madrid, febrero 1994.

- OSTERTAG W**, Roesler G, Krieg CJ, Kind J et al. Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friends virus. Proc Natl Acad Sci. USA 1974; 71: 4980-4985.
- PANEGYRES PK**, Tan N, Kakulas BA, Armstrong JA, Hollingsworth P. Necrotizing myopathy and zidovudine. Lancet 1988; 1:1050.
- PANEGYRES PK**, Papadimitriou JM, Hollingsworth PN et al. Vesicular changes in the myopathies of AIDS. Ultrastructural observations and their relationship to zidovudine treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1990; 53(8): 649-655.
- PARDRIDGE WM**. Recent advances in blood-brain barrier transport. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1988; 28: 25-39.
- PAUL A**, Volberding MD, Stephen W et al. Zidovudine in asymptomatic Human Immunodeficiency Virus infection. N Engl J Med 1990; 322: 941-949.
- PAUWELS R**, Andries K, Desmyter J, et al. Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. Nature 1990; 343: 470-474.
- PEARSE AGE**. Histochemistry theoretical and applied, 3rd edn, vol 2. Churchill Livingstone, Edimburg London 1972, pp:880-961.
- PEDIATRIC ZIDOVUDINE STUDY GROUP**. Safety and tolerance of zidovudine during a Phase I study in children. Pediatric Res 1988; 23:379.
- PERRUCA E** and Richens A. Drug-induced pathology. Currents topics in pathology. Ed. E. Grundmann, Germany 1980.
- PETERS BS**, Winer J, Landon DN, Stotter A, Pinching AJ. Mitochondrial myopathy associated with chronic zidovudine therapy in AIDS. Q J Med 1993; 86 (1): 5-15.
- PETTY KH**, Harding AL, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. Brain 1986; 109:915-938.
- PEZESHKPOUR G**, Illa I, Dalakas MC et al. Ultrastructural characteristics and DNA immunochemistry in Human Immunodeficiency Virus and zidovudine-associated myopathies. Hum Pathol 1991; 22 (12): 1281-1288.
- PHILLIPS NC** and Tsoukas C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. Blood 1992; 79 (5):1137-1143.
- PIZZO PA**, Eddy J, Fallon J et al. Effect of continuous intravenous infusion of AZT in children with symptomatic HIV infection. N Engl J Med 1988; 319 (19): 889-896.
- PITRAK DL**, Bak PM, de Marais P, Novak RM, Andersen BR. Depressed

- neutrophil superoxi de production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167 (6): 1406-1410.
- PLACIDI L**, Cretton EM, Placidi M, Sommadosi JP. Reduction of 3'-azido 3'-deoxythymidine to 3'-amino-3'-deoxythymidine in human liver microsomes and its relation ship to cytochrome p450. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54 (2): 168-176.
- POIESZ B**, Ruscetti F, Gazdar A et al. Detection and isolation of type c retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a poatient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980; 77: 7415.
- POLIS MA**, Mark MD, Baird RN et al. Increased survival of a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and citomegalovirus retinitis who received sodium phosphonoformate (foscarnet). *Am J Med* 1993; 94:175-180.
- POPOVIC M**, Sarngadharan MG, Read E et al. Detection, isolation and continous production of cytophatic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre- AIDS. *Science* 1984; 225: 497-500.
- POTTAGE JC**, Benson CA, Speor JB et al. Treatment of immunodeficiency virus related thrombocytopenia with zidovudine. *J A M A* 1988; 260:3045-3048.
- PORTEGIES P**. Demencia asociada a SIDA: Influencia de la terapia con antirretróviricos. *Pub of SEISIDA* 1994; 5 (3):68.
- PORTEGIES P**, Gans J, Lange JMA, et al. Declining incidence of AIDS Dementia complex after introduction of zidovudine treatment. *B M J* 1989; 299: 819-821.
- PORTEGIES P**. Demencia asociada a SIDA. Influencia de la terapia con antirretrovíricos. *Pub Of. SEISIDA* 1994; 5(3):68.
- PROCEEDINGS** of the four international workshop in human leucocyte differentiation antigens in knapp. W. Ed. *Leucocyte typing. IV.* Oxford University Press, 1990.
- RAAP AK** and Van Duijn P. Studies on the phenazine methosulphate-tetrazolium capture reaction in NAD (P)- dependent dehydrogenase cytochemistry.II. A novel hypothesis for the mode of action of PMS. *Histochem J* 1983; 15: 881-893.
- RACHLIS A** and Fanning MM. Zidovudine toxicity. Clinical featutres and management. *Drug Saft* 1993, 8 (4): 312-320.
- RAHIM C**, Jaccqz-Argrain E, Broyard A, Brun-Vezinet F, Vilmer E. Contimous infusion of zidovudine in HIV related thrombocytopenia. *Arch Dis Child* 1993; 68 (4): 525-526.
- RAMON JR**. Radicales libres y antioxidantes en la clínica humana. Ed IDEPSA 1993 pag: 60-65.

- RATNER L.** Human immunodeficiency virus-associated autoimmune thrombocytopenic purpura: a review. *Am J Med* 1989; 86:194-198.
- REYES MG, Casanova J, Varrichio F et al.** Zidovudine mitochondriopathy of hamster quadriceps muscle. *Lab Invest* 1991; 64: 89A.
- RICHMAN DD.** Expanded results of a double-blind placebo-controlled trial in severe HIV infection. *Proceedings International Antiviral Symposium. Montecarlo, 2-4 diciembre, 1987a.*
- RICHMAN DD, Fischl MA, Grieco MH, et al.** The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS - related complex. *N Engl J Med* 1987b; 317: 192-197.
- RICHMAN DD, Grimes JM, Lagacoko SS.** Effect of stage of disease and drug dose on zidovudine susceptibilities of isolates of Human Immunodeficiency virus. *J Acq Imm Def Synd* 1990; 3: 743-746.
- ROBBINS CK.** Patología estructural y funcional. 4ª Ed Vol II. Ed Interamericana. "Hígado y las vias biliares" 1990, pg: 959-1015.
- ROBERTIS and Robertis.** Biología celular y molecular. Ed. Ateneo, 1986; cap 11: 253-281.
- ROBINSON HL and Zinkus DM.** Accumulation of human immunodeficiency virus type 1 DNA in T cells: results of multiple infection events. *J Virol*, 1990; 64:4836-4841.
- ROOKE R.** Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy. *AIDS* 1989; 3:411-415.
- ROWE PM, Tremblay M, Soudenys H et al.** Resistencia a la infección por VIH. *Lancet (Ed esp)* 1993; 23(!):48.
- ROYALIII W, Updike M, Selnes OA.** HIV-1 infection and nervous system abnormalities among a cohort of intravenous drug users. *Neurol* 1991; 41: 1905-1910.
- RUBIO S.** Estudio electrocardiológico en corazón aislado de ratas de las acciones del cobre: papel de los radicales libres de oxígeno. Tesis presentada en Fac. Veterinaria. Madrid, 1994.
- RUPPRECHT RM, Chou TC, Chipty F et al.** Interferon -L-and 3'-Azido-3'-dooxythymidine are highly synergistic in mice and prevent viremia after acute retrovirus exposure. *J Acq Imm Def Synd* 1990; 3: 594-601.
- RUTH M, Ruprecht RM, Chou TC et al.** Interferon -L-and AZT are highly synergistic in mice and prevent viremia after acute retrovirus exposure. *J Acq Imm Def Synd* 1990; 3: 591-600.

- SAFRIN S**, Kemmerly S, Plotkin B et al. Foscarnet- resistant Herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 169 (19): 193-196.
- SAKUTA R** and Nonaka I. Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989; 25 (6): 594-601.
- SANDSTRÖM EG and Kaplan JC**. Antiviral therapy in AIDS. Clinical pharmacological properties and therapeutic experience to date. *Drugs* 1987; 34: 372-390.
- SANSTRÖM E**. Antiviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drugs* 38 (3): 417-450, 1989.
- SARACCHINI S**, Vacher E, Covezzi E, Tortorici G, Carbone A, Tirelli U. Lethal neurotoxicity associated to azidothymidine therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52(4):544-545.
- SHOOLEY RT**, Merigan TC, Gant P, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS -related complex: a phase I-II escalating dosage trial. *Ann Intern Med* 1990; 112: 247- 257.
- SARVER N**, Cantin EM, Chang PS et al. Ribozymes as potential anti HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990; 247: 1222-1225.
- SCHWARTZ D**. Métodos estadísticos para médicos y biólogos. Ed Herder. Barcelona 1988; pag: 171-226.
- SHARPE AH**, Jaenisch R, Ruprecht RM. Retroviruses and mouse embryos: a rapid model for neurovirulence and transplacental antiviral therapy. *Science*; 1987 236:1671-1674.
- SHAUNAK S** and Bartlett JA. Zidovudine- induced neutropenia. Are we too cautious?. *Lancet* 1989; 2 (8654): 91-92.
- SIMPSON DM**. Myopathy associated with Human Immunodeficiency Virus (HIV) but not with zidovudine. *Ann Intern Med* 1988; 15: 842.
- SIMPSON DM** and Wolfe DE. Neuromuscular complications of HIV infection and its treatment . *AIDS* 1989; 5(8):917-926.
- SIMPSON DM** and Bender AN. Human Immunodeficiency Virus-associated myopathy: Analysis of 11 patients. *Ann Neurol* 1988; 24: 79-84.
- SIMPSON DM**, Citak KA, Gofrey E, Godbold J, Wolfe DE. Myopathies associated with human immunodeficiency virus and zidovudine: can their effects be distinguished?. *Neurology* 1993; 43 (59): 971-976.
- SINET M**, Harconet L, Desforges B et al. Efficacy of continuous zidovudine infusion at early stages of retroviral infection in mice. *J Acq Im Defc Syn* 1992; 5: 577-582.
- SKOWRON G**, Bozzette SA, Lim L et al. Alternating and intermittent

- regimens of zidovudine and dideoxycytidine in patients with AIDS or AIDS-related complex. *Ann Intern Med* 1993; 118(5):321-330.
- SMILE L** and the AZT Collaborative Group. Zidovudine treatment of patients with acquired immune deficiency syndrome and acquired immune deficiency syndrome-related complex: long-term experience. *J Infec* 1989; 18 (supl I): 77.
- SMITH MS**, Koerber KL, Pagano JS. Long-term persistence of zidovudine resistance mutations in plasma isolates of Human immunodeficiency virus type 1 of didenoxynosine-treated patients removed from zidovudine therapy. *J Infec Dis* 1994; 169 (1): 180-185.
- SOKAL P**, Rohl DL. *Biometry 2ª Ed.* Ed Freeman WH. San Francisco, 1981.
- SPANISH RIBAVIRIN TRIAL GROUP.** Comparison of ribavirin and placebo in CDC group III human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1991; 338:6-9.
- ST CLAIR MH**, Martin JL, Tudor-Williams G et al. Resistance to ddI and sensitive to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1991; 253: 1557-1559.
- ST CLAIR MH**, Hartigan PM, Andrews JC, et al. Zidovudine resistance, syncytium-inducing phenotype, and HIV disease progression in a case-control study. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6:891-897.
- SPECTOR SA**, Kennedy C, Mc Cutchan JA et al. The antiviral effect of zidovudine and ribavirin in clinical trials and the use of p24 antigen levels as virologic marker. *J Infec Dis* 1989; 159 (5): 822-828.
- STAHL E**, Guzenda E, Lijundahl-Stahle E. Pharmacokinetics and extracellular distribution to blood, brain, and muscle of zidovudine (3' fluorothymidine) and zidovudine in the rat studied by microdialysis. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6:435-439.
- STAMBUCK D**, Youle M, Hawkinns D et al. The efficacy and toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex (ARC): and open uncontrolled treatment study. *Q J Med* 1984; 70: 161-174.
- STAMBUCK D**, Hawkins D, Gazard BG. Zidovudine treatment with acquired immune deficiency syndrome and acquired immune deficiency syndrome-related complex: St Stephen's Hospital experience. *J Infec* 1989; 18 (Suppl I): 41-51.
- STEFFE EM**, King JH, Inciardi JF et al. The effect of acetaminophen on zidovudine metabolism in HIV-infected patients. *J Acq Imm Def Synd* 1990; 3: 691-694.

- STEPHEN F**, Coleman A, Coleman JE. Conformational changes of HIV reverse transcriptase subunit on formation of the heterodimer: correlation with K_{cat} and K_m . *Biochemistry* 1992; 31(35):8221-8228.
- STEINBERG JP**, Spear JB, Murphy RL et al. Predictors of outcome in AIDS patients receiving zidovudine. *J Acq Imm Def Synd* 1989; 2: 229-234.
- SURBONE A**, Yarchoan R, McAtee N et al. Treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex with a regimen of 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine or zidovudine and acyclovir. *Annals of Internal Med* 1988; 108: 534-540.
- SWANSON ChE**, Cooper DA and Australian zidovudine study group. Factors influencing outcome of treatment with zidovudine of patients with AIDS in Australia. *AIDS* 1990; 4: 749-757.
- TADEPALLI SM** and Quinn RT. Determination of zidovudine concentration in serum by enzyme-linked Immunosorbent Assay and by time-resolved fluoroimmunoassay. *J Acq Imm Def Synd* 1990; 3: 19-27.
- TAUCHI H** and Sato T. Cellular change in senescence: possible factors influencing the process of cellular aging. In: thresholds in aging Bergener M, Ermini M, Stahelin HB (eds). Academic Press. London, New York 1985; 91.
- TEMIN HM** and Mitzutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226: 1211-1213.
- TEMIN HM**. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6900-6903.
- THOMPSON MB**, Dunnick JK, Sutphin ME, Giles HD, Irwin RD, Prejean JD. Hematologic toxicity of AZT and ddC administered as single agents and in combination to rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* 1991; 17 (1): 159-176.
- TILL M** and Mc Dornell K. Myopathy with HIV-1 infection: HIV-1 or zidovudine? *Ann Intern Med* 1990; 113:492-493.
- TINDALL B**, Gaines H, Imrie A, et al. Zidovudine in the management of primary HIV-1 infection. *AIDS* 1991; 5 (59): 477-484.
- TIRELLI U**, Errante D, Okensenhendler E et al. The treatment of AIDS-related lymphoma. *J A M A* 1992; 267 (4): 509-510.
- TOLTZIS P**, Marx CM, Kleinman N, Levine EM, Schmidt EV. Zidovudine-associated embryonic toxicity in mice. *J Infect Dis* 1991; 163 (6): 1112-1128.
- TOLTZIS P**, Mourton T, Magnuson T. Effect of zidovudine on preimplantation murine embryos. *Antimicrob Agents Chemother*

- 1993; 37 (8): 1610-1613.
- TOMELLERI G**, Tnin P, Spadaro M et al. AZT- induced mitochondrial myopathy. *Ital J Neurol Sci* 1992; 13 (9): 723-728.
- TOMONAGE M**. Histochemical and ultrastructural changes in senile human skeletal muscle. *J Am Pediat Soc* 1977; 24: 125-131.
- TÖRNEVICK Y**, Jacobsson B, Britton S, Eriksson S. Intracellular metabolism of AZT in isolated human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retrov* 1991; 7 (9): 751-759.
- TRANG JM**, Prejean JD, James RH et al. Zidovudine bioavailability and linear pharmacokinetics in female B6C3F1 mice. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 1993; 21 (1): 189-193.
- TSAI C**, Follis KE, Grant RF et al. Effect of dosing frequency on ZDV prophylaxis in Macaques infected with Simian Immunodeficiency Virus. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6:1086-1092.
- UNADKAT JD**, Collier AC, Crosby SS et al. Pharmacokinetics of oral AZT in patients with AIDS when administered with and without a high-fat meal. *AIDS* 1990; 4 (3): 229-232.
- VALENCIANO L**. Tratamiento específico de las manifestaciones neurológicas de la infección por HIV. *Arch Neurobiol* 1990; 52 (supl. 1):135-140.
- VAGO L**, Castagna A, Lazzarin A, et al. Reduced frequency of HIV-induced brain lesions in AIDS patients treated with zidovudine. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6: 42-45.
- VARNIER OE**, Cao Y, Lazzarin A et al. HTLV-I seropositivity in italian intravenous drug addicts (IVDA) is primarily due to HTLV-II infection. *Frontiers in Human retrovirology and related topics. Laboratory of tumor cell biology. National Cancer Institute. Bethesda, august 11-17, 1990.*
- VAZEUX R**, Cumont M, Girard PM et al. Severe encephalitis resulting from coinfections with HIV and JC virus. *Neurol* 1990; 40 (6): 944-948.
- VELLA S**, Guiliano M, Dally LG et al. Long-term follow-up of zidovudine therapy in asymptomatic HIV infection: results of a multicenter cohort study. *J Acq Imm Def Synd* 1994; 7: 31-38.
- VENTURA AM**, Arens MQ, Srinivisan A et al. Silencing of human immuno deficiency virus long terminal repeat expression by and adenovirus long terminal repeat expression by an adenovirus Ela mutant. *Proc Nat Acad Sci. USA* 1990; 87: 1310-1314.
- VOGT M** and Hirsch MS. Prospects for the prevention and therapy of infections with human immunodeficiency virus. *Rev. Infect*

- Dis 1986; 8: 991-1000.
- VOLVERDING PA**, Lagakos SW, Koch MA et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1990; 322: 941-949.
- VOSS G** and Hunsmann G. Cellular immune response to SIV mac and HIV-2 in macaques: model for the human HIV-1 infection. *J Acq Imm Def Synd* 1993; 6 (9): 969-976.
- WALKER R**, Parker R, Kovacs J et al. Anemia and erythropoiesis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and Kaposi sarcoma treated with zidovudine. *Ann intern Med* 1988; 108: 372-376.
- WALTON JR** and Packer L. Free radical damage and protection: relationship to cellular aging and cancer. En: Mach-Lin TJ, ed Vitamin E. A comprehensive treatise in basic and clinical nutrition. Vol 1. New York: Pergamon Press 1980; pgs 495-517.
- WATTS DH**, Brown ZA, Tartaglione SK et al. Pharmacokinetic disposition of zidovudine during pregnancy. *J Infec Dis* 1991; 163:226-232.
- WELLS WA**, Rainer RO, Memoli VA. Basic principles of image processing. *Am J Clin Pathol* 1992a; 98 (5): 494- 501.
- WELLS WA**, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standarization, and applications of image processing. *A J C P* 1992b; 99 (1): 47-56.
- WERNER T**, Ferroni S, Saemark T et al. HIV -1 Nef protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K⁺ channels. *AIDS* 1991; 5:1301- 1308.
- WHO**. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): WHO/CDC case definition for AIDS. *Wkly Epidem Rec* 1986; 61: 61-76.
- WILFERT CM** and Mckinney R. Treatment of children sytmomatic with human immunoideficiency virus infection. *J Infec* 1989; 18 (Suppl I): 81-82.
- WRIGHT R**, Alberti KGM, Karran S, Milward-Sadler GH. Liver and biliary disease. Pathophysiology. Diagnosis. Management. W.B. Saunders Company Ltd. London. Philadelphia. Toronto 1979."The liver and drugs". Read AE, pg 822-847.
- YAMOTO JK**, Barre-Sinoussi F, Bolton V, et al. Human and interferon , but not, suppress the in vitro replication of LAV, HTLV-III and ARB.2. *J Interf Res* 1986; 6:143-152.
- YARCHOAN R**, Klecker R, Weinhold KJ, Markaham PD et al. Administration of 3'- azido- 3'- deoxy thymidine , an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS- related complex. *Lancet* 1986, march 15: 575-580.

- YARCHOAN R**, Broder S, Klecker R et al. Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. *N Engl J Med* 1987; 316 (9): 557-564.
- YARCHOAN R**, Brouwers P, Berg G et al. Response of human-immunodeficiency- virus- associated neurological disease to 3'- azido- 3'-deoxythymidine. *Lancet* 1987; 17 juin :132-135.
- YARCHOAN R**, Mitsuya H, Myers CE, Broder S. Clinical pharmacology of 3'- azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dedeoynucleosides. *N Engl J Med* 1989, 321: 726-738.
- YARCHOAN R**, Mitsuya H, Broder S et al. Immunologic issues in anti-retroviral therapy. *Imm Today* 1990; 11 (9) : 327-333.
- YARCHOAN R**. Combination therapy for HIV. *HIV advance in research and therapy* 1991; 1:13-20.
- YARCHOAN R**, Lietzan JA, Nguyen BY et al. A randomized pilot study of alternating or simultaneous zidovudine and didanosine therapy in patients with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1994; 169: 9-17.
- ZHANG R**, Lu Z, Diasio CR, Lin T, Soong SJ. The time of administration of 3'-Azido-3'-deoxythimidine (AZT) determines its host toxicity with possible relevance to AZT chemotherapy. *Ant Ag Chem* 1993; 37 (9): 1771-1776.