



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Universitat de València

Tesis Doctoral

*Estudio de los mecanismos responsables del efecto
protrombótico de Abacavir*

Doctoranda

Itziar Ainhoa Sánchez López

Directores

Ángeles Álvarez Ribelles y Juan Vicente Esplugues Mota

Valencia, noviembre de 2021

Esta Tesis Doctoral se distribuye bajo la licencia *creative commons* de tipo Reconocimiento-No Comercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0).



Dña. Ángeles Álvarez Ribelles, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

D. Juan Vicente Esplugues Mota, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "*Estudio de los mecanismos responsables del efecto protrombótico de Abacavir*", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección y asesoramiento en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València por Dña. Itziar Ainhoa Sánchez López, graduada en Biotecnología, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia de la Universitat de València, regulado por el RD 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente. Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Valencia, 18 de noviembre de 2021.

Fdo. Dra. Ángeles Álvarez Ribelles

Fdo. Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la financiación de los siguientes proyectos y becas:

PROYECTOS

SAF-2015-67678-R. Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de Abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito-endotelio-plaqueta. Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigadores principales: Juan V. Esplugues Mota y Ángeles Álvarez Ribelles.

PROMETEOII/2014/035. Programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia. Farmacología experimental del tracto digestivo. Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana. Investigador principal: Juan V. Esplugues Mota.

PLATELETS: *"Effects of antiretroviral therapy on platelet accumulation"*. GILEAD SCIENCE. Investigadores principales: Ángeles Álvarez Ribelles y Juan V. Esplugues Mota.

BECAS

ACIF/2016/419. Subvenciones para la contratación de personal Investigador de carácter predoctoral. Conselleria de educación, investigación, cultura y deporte de la Generalitat Valenciana.

BEFPI/2018/066. Subvenciones para estancias predoctorales fuera de la Comunitat Valenciana. Conselleria de educación, investigación, cultura y deporte de la Generalitat Valenciana.

*A mi madre, **Aura**, mi tierra.
A mi otra madre, **Blanca**, mi mar.
A mi gran madre, **Carmen**, mi cielo.*

*En memoria de **Joui** y de todos sus coterráneos.*



ABREVIACIONES

GRÁFICAS



3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
acLDL	Lipoproteína de baja densidad acetilada
ADA	Desaminasa de adenosina
ADH	Alcohol deshidrogenasa citosólica
ADK	Adenosina fosfotransferasa
ADM	Adrenomedulina
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbc	ADN bicatenario
ADNc	ADN complementario
AI	Angiotensina i
AII	Angiotensina ii
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Apo E	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNmc	ARN monocatenario
ARV	Antirretroviral
ATP	Adenosín trifosfato
ATV	Atazanavir
AUC	Área bajo la curva
bET-1	Proendotelina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CA	Cápside
CBV	Carbovir
CBV-DP	Carbovir difosfato
CBV-MP	Carbovir monofosfato
CBV-TP	Carbovir trifosfato
CCR5	Co-receptores de quimiocina tipo 5
CD	Diferenciación de grupo

CD4	"Cluster of differentiation 4"
CDA	Desaminasa de citidina
CE	Células endoteliales
CEBA	Comité de experimentación y bienestar animal
CEIH	Comité de ética de investigación en humanos
CIE	Clasificación internacional de enfermedades
CITV	Comité internacional de taxonomía de virus
CK	Creatín quinasa
CMH-1	Complejo mayor de histocompatibilidad 1
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Isoforma 1 de la ciclooxigenasa
COX-2	Isoforma 2 de la ciclooxigenasa
CPM	Ciclofosfamida
CRP	Proteína c reactiva
Csk	Proteína tirosina quinasa csk
CV	Cardiovascular
CXCR4	Co-receptores de quimiocina tipo 4
D:A:D	"Data collection on adverse events of anti-HIV drugs study group"
DAMP	Patrón molecular asociado al daño
d4T	Estavudina
ddl	Didanosina
de	Disfunción endotelial
DG	Dieta grasa
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Dieta normal
DPBS-	Dulbecco's pbs sin Ca_2^+ y Mg_2^+
DPBS+	Dulbecco's pbs con Ca_2^+ y Mg_2^+
DRV	Darunavir
ECA	Enzima de conversión de la angiotensina
ECE	Enzima de conversión de la endotelina
ECV	Enfermedad cardiovascular

EDHF	Factor de hiperpolarización derivado del endotelio
EFV	Efavirenz
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGM-2	"Endothelial cell growth medium-2"
EMA	Agencia europea de medicamentos
EMB-2	"Endothelial medium basal-2"
ENF	Enfuvirtida
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
EO	Estrés oxidativo
ESL-1	Ligando de e-selectina
ET-1	Endotelina-1
EVG	Elvitegravir
FBS	Suero fetal bovino
FDA	"Food and drug administration"
FeCl₃	Cloruro férrico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	"Forward scatter"
FTC	Emtricitabina
FTR	Fostemsavir
GA-1000	Anfotericina b sulfato de gentamicina
GAG	Glucosaminoglicanos
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
gp120	Glicoproteína de superficie
gp41	Glicoproteína de membrana
GTPc	Guanosín trifosfato cíclico
GUK1	Guanilato quinasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
hbFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico humano
HBSS	"Hank's balanced salt solution"
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico humano

HLA-B	Antígeno leucocitario humano b
HO2	Hidroperoxilo
HS	Heparán sulfato
HSA	Albúmina sérica humana
HSP	Proteínas de choque térmico
HSPG	Proteoglicano heparán sulfato
HSR	Reacción de hipersensibilidad
HUVEC	Células endoteliales de venas umbilicales humanas
ICAM	Moléculas de adhesión celular intercelular
IE/F	Inhibidores de entrada o de fusión
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleuquinas
IN o p32	Integrasa
INE	Instituto nacional de estadística
INI	Inhibidor de integrasa
INP	Inosina fosfotransferasa
IP	Inhibidor de proteasa
ITIAN	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos/nucleótidos
ITINN	Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos
JAM	Moléculas de adhesión de unión
Kb	Kilobases
KO	"Knockout"
L-Arg	L-arginina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria
LOX-1	Receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacáridos
LPV	Lopinavir
LTR	"Long terminal repeat"
MA	Matriz
Mac-1	Antígeno 1 macrofágico
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MetS	Síndrome metabólico
MI	Infarto de miocardio
MLEM	"Maximun likehood expectation maximitation"
MRV	Maraviroc
NC	Nucleocápside
NET	Trampa extracelular de neutrófilo
NME	Nucleósido difosfato quinasa
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NO₂⁻	Ion nitrito
NO₂Cl	Cloruro de nitrilo
NVP	Nevirapina
NVP	Nevirapina
O₂⁻	Superóxido
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO⁻	Peroxinitrito
ONUSIDA	Programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/SIDA
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
p14	Proteína transactivadora
p15	Proteína r vírica
p16	Proteína única vírica
p17	Proteína de la matriz
p19	Regulador del "splicing" del ARN
p23	Factor de infectividad viral
p24	Proteína de la cápside
p27	Factor regulador negativo
p7	Nucleoproteína
PAF	Factor activador de plaquetas
PAF-R	Receptor del factor activador de plaqueta
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAMP	Patrón molecular asociado al patógeno
PBS	"Phosphate buffered saline"

PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGI2	Prostaciclina
PGK1	Fosfoglicerato quinasa
PK	Piruvato quinasa
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PR o p10	Proteasa
PRP	Plasma rico en plaquetas
PSGL-1	Ligando de p-selectina
R3-IGF-1	"Recombinant long R3 insulin-like growth factor-1"
RAL	Raltegravir
ROI	Regiones de interés
ROS	Especie reactiva de oxígeno
RPV	Rilpivirina
s-Le^x	Sialil lewis x
SCARF-1	Receptor scavenger de clase f
SI	Sistema inmunológico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SQV	Saquinavir
SR	Receptor scavenger
SR-PSOX	Receptor de fosfatidilserina y lipoproteína oxidada
Src	Proteína tirosina quinasa src
SSC	"Side scatter"
SU	Superficie
SUV	"Standardized uptake values"
TAC	Tomografía axial computarizada
TAR	Terapia antirretroviral

TARc	Terapia antirretroviral combinada
TDF	Tenofovir
TF	Factor tisular
TFG-b	Factor de crecimiento transformante b
TFV	Tenofovir
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tl o p51	Transcriptasa inversa
TLR4	"Toll-like receptor 4"
TM	Trombomodulina
TMB-301	Ibalizumab
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TXA2	Tromboxano
UCIM	Unidad central de investigación de medicina
UGT	Uridina difosfato glucoroniltransferasa
UV	Universitat de València
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VE-PTP	Proteína tirosina fosfatasa ve-cadherina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia simia
VLA-4	Integrina a4b1
vWF	Factor de von Willebrand
WT	Cepa salvaje
ZDV	Zidovudina

RESUMEN



La terapia antirretroviral combinada es la que se utiliza para el tratamiento del virus VIH y ha permitido que el SIDA haya pasado de ser una enfermedad mortal a crónica. Sin embargo, su uso se ha asociado con la aparición de diversos efectos adversos, entre ellos las enfermedades cardiovasculares. Debido a que los fármacos se pautan de manera combinada, es difícil establecer la implicación de cada uno de los fármacos en estos efectos adversos. Abacavir (ABC) –inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido (ITIAN), concretamente de la guanina (purina endógena)– ha sido relacionado con un mayor riesgo de padecer infarto de miocardio. No obstante, entorno a esta asunción existe una gran controversia a consecuencia del desconocimiento del mecanismo de acción por el cual estuviera provocando la toxicidad cardiovascular.

Se ha descrito que ABC tiene efectos proinflamatorios, sin embargo, existe un desconocimiento del papel de ABC sobre la función plaquetaria, célula clave en el paso de inflamación a trombosis. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue analizar el efecto de ABC y de otros antirretrovirales sobre las diferentes fases de la trombogénesis *in vitro*; y sobre la generación del trombo *in vivo* así como explorar los mecanismos por los que ABC pudiera ser protrombótico.

Se utilizaron células endoteliales obtenidas de cordón umbilical y células sanguíneas aisladas (PMNs, plaquetas) de sangre entera obtenida de donantes sanos. Por una parte, se evaluó, *in vitro*, el efecto de ABC y de otros antirretrovirales a concentraciones clínicamente relevantes sobre las diferentes fases implicadas en la trombogénesis [interacción plaqueta-endotelio, plaqueta-leucocito y plaqueta-plaqueta (agregación)]. Estas interacciones se evaluaron con una cámara de flujo, un citómetro de flujo y un agregómetro, respectivamente. También, se analizó por citometría de flujo la activación plaquetaria mediante la cuantificación de la expresión de P-selectina y de GPIIb/IIIa. Así, se observó que ABC, pero no el resto de los antirretrovirales, induce la interacción de las plaquetas tanto con el endotelio

como con los leucocitos a través de los receptores purinérgicos P2X₇, ya que al bloquear los mismos con antagonistas farmacológicos del receptor, los efectos de ABC desaparecieron. Además, la plaqueta no fue la célula responsable de estos efectos, sino que fueron las células endoteliales o los leucocitos. En este sentido, ABC no promovió ni la agregación plaquetaria ni la activación de las mismas, confirmando que la plaqueta juega un papel pasivo en esta respuesta. Por otro lado, se analizó la capacidad de ABC y de otros antirretrovirales de promover la formación de un trombo inducido por FeCl₃ en un modelo murino estandarizado por microscopía intravital. Los resultados obtenidos *in vivo* confirman que ABC es capaz de promover la formación de un trombo en un proceso dependiente de la presencia de leucocito y del receptor P2X₇, ya que el efecto se revirtió en ausencia, o bien del leucocito –utilizando un modelo leucopénico inducido por ciclofosfamida–, o bien del receptor –empleando tanto antagonistas farmacológicos del receptor como un modelo murino deficiente en el receptor P2X₇ (P2X₇ KO)–.

Los resultados obtenidos señalan a ABC como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, comorbilidad de los pacientes con VIH, debido a su carácter protrombótico que podría justificar la asociación de ABC con un mayor riesgo de infarto de miocardio en pacientes infectados por VIH.

ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN	3
I.A. INTEGRIDAD CARDIOVASCULAR: INFLAMACIÓN, HEMOSTASIA Y TROMBOSIS	3
I.A.1. INTEGRIDAD CARDIOVASCULAR	3
I.A.1.1. Endotelio	3
I.A.1.2. Integridad vascular y disfunción endotelial	6
I.A.2. INFLAMACIÓN	12
I.A.2.1. Respuesta inmunitaria	12
I.A.2.2. Proceso inflamatorio y la función de los leucocitos	13
I.A.3. HEMOSTASIA Y TROMBOSIS	16
I.A.3.1. Hemostasia	16
I.A.3.3. Trombosis	20
I.A.4. RECEPTORES PURINÉRGICOS	23
I.A.5. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	25
I.A.6.1. Aterosclerosis	26
I.B. VIH, SIDA, TERAPIA ANTIRRETROVIRAL Y COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES	29
I.B.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	29
I.B.1.1. Clasificación	29
I.B.1.2. Genoma	30
I.B.1.3. Morfología	31
I.B.1.4. Ciclo biológico	32
I.B.2. SÍNDROME DE LA INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA	36
I.B.2.1. Etiología y semiología	36
I.B.2.2. Perspectiva evolutiva de la epidemia	38
I.B.3. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	42
I.B.3.1. Fármacos	42
I.B.3.2. Pautas posológicas	54

I.B.3.3. Abacavir	56
I.B.3.4. Efectos adversos e interacciones de la terapia	63
I.B.4. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES	66
I.B.4.1. Comorbilidad cardiovascular en pacientes con VIH	66
I.B.4.2. Toxicidad cardiovascular y abacavir	67
II. OBJETIVOS	75
III. MATERIAL Y MÉTODOS	79
III.A. MATERIAL	81
III.A.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	81
III.A.2. ANIMALES	81
III.A.3. FÁRMACOS	83
III.A.3.1. Antirretrovirales	83
III.A.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	83
III.A.3.3. Antagonistas	84
III.A.4. ANTICUERPOS	84
III.A.5. REACTIVOS	85
III.A.6. EQUIPOS	87
III.B. MÉTODOS: TÉCNICAS IN VITRO	87
III.B.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS	87
III.B.1.1. Extracción y cultivo de células endoteliales	87
III.B.1.2. Aislamiento de leucocitos	90
III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas	91
III.B.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES DEL TRATAMIENTO IN VITRO	93
III.B.3. ADHESIÓN EN CÁMARA PARALELA DE FLUJO	95
III.B.3.1. Estudio del efecto in vitro de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-endotelio	98
III.B.4. CITOMETRÍA DE FLUJO	100
III.B.4.1. Estudio del efecto in vitro de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-leucocito	104

III.B.4.2. Estudio del efecto in vitro de ABC y otros ARV sobre la activación plaquetaria	106
III.B.5. AGREGOMETRÍA	107
III.B.5.1. Estudio del efecto in vitro de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-plaqueta	109
III.C. MÉTODOS: TÉCNICAS IN VIVO	110
III.C.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES DE TRATAMIENTO IN VIVO	110
III.C.2. MICROSCOPIA INTRAVITAL	112
III.C.2.1. Modelo de trombosis inducida por FeCl ₃	115
III.C.2.2. Estudio del efecto in vivo de ABC y otros ARV sobre la trombogénesis	116
III.C.3. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)	117
III.C.3.1. Estudio del efecto in vivo de ABC en un modelo de inflamación de placas ateroscleróticas	120
III.D. COMITÉS ÉTICOS	121
III.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	122
IV. RESULTADOS	125
IV.A. ESTUDIOS IN VITRO	127
IV.A.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES SOBRE LAS DISTINTAS FASES DE LA FORMACIÓN DEL TROMBO IN VITRO.	127
IV.A.1.1. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la interacción plaqueta-endotelio	127
IV.A.1.2. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la interacción plaqueta-leucocito	130
IV.A.1.3. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la agregación plaquetaria (interacción plaqueta-plaqueta)	133
IV.A.1.4. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la activación plaquetaria (expresión de P-selectina y GPIIb/IIIa)	136
IV.A.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS POR LOS QUE ABC TIENE EFECTO PROTROMBÓTICO IN VITRO	139

IV.A.2.1. Análisis de la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC	139
IV.A.2.2. Análisis de la interacción plaqueta-leucocito inducida por ABC	145_Toc89459577
IV.B. ESTUDIOS IN VIVO	151
IV.B.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES EN UN MODELO DE GENERACIÓN DEL TROMBO IN VIVO	151
IV.B.1.1. Evaluación del efecto de los antirretrovirales en el modelo de trombosis inducida por FeCl ₃ in vivo	151
IV.B.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS POR LOS QUE ABC TIENE EFECTO PROTROMBÓTICO IN VIVO	158
IV.B.2.1. Análisis del papel leucocitario en el modelo de trombosis inducida por ABC: modelo leucopénico	158
IV.B.2.2. Análisis de la implicación del sistema purinérgico en el modelo de trombosis inducida por ABC	161
IV.B.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE ABC EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN DE PLACAS ATEROESCLERÓTICAS	164
IV.B.3.1. Análisis del efecto de ABC en función de la dieta en el modelo de aterosclerosis: ApoE KO	164
V.DISCUSIÓN	169
VI. CONCLUSIONES	187
VII. REFERENCIAS	191
VIII. CERTIFICADOS	227

I

INTRODUCCIÓN



I.A. INTEGRIDAD CARDIOVASCULAR: INFLAMACIÓN, HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

I.A.1. Integridad cardiovascular

I.A.1.1. Endotelio

El endotelio es el órgano que reviste tanto los vasos linfáticos como los sanguíneos (arterias, capilares y venas). A diferencia de la gran mayoría de los órganos, presenta una distribución espacial a través de todo el organismo. Se estima que en un adulto humano, el endotelio, pesa alrededor de un kilogramo y tiene una extensión superficial entre 4000 y 7000 m². A. Maraviroc B. Fostemsavir C. Enfuvirtida D. Ibalizumab (1). Además, está constituido por entre $1 \cdot 10^{13}$ y $6 \cdot 10^{13}$ células endoteliales (CE) polarizadas, es decir, células en las que se diferencian dos dominios, el apical y el basolateral (2). La zona apical –recubierta por el glicocálix¹– se dispone hacia el lumen del vaso y, por ende, está en contacto con la sangre o con la linfa; mientras que la zona basolateral –recubierta por una lámina basal de glicoproteínas– se dispone hacia los tejidos circundantes (tejido conectivo laxo). El endotelio, la lámina basal y el tejido conectivo laxo configuran la túnica íntima, que es la capa más interna de los vasos. Además de la túnica íntima, los vasos están formados por otras dos túnicas: la media y la adventicia (Figura 1); excepto los capilares que únicamente tienen la túnica íntima.

¹ Glicocálix es una estructura, formada por proteoglicanos, glucosaminoglicanos (GAG), glicoproteínas y glicolípidos, que provee al endotelio de una barrera ante la sangre o la linfa.

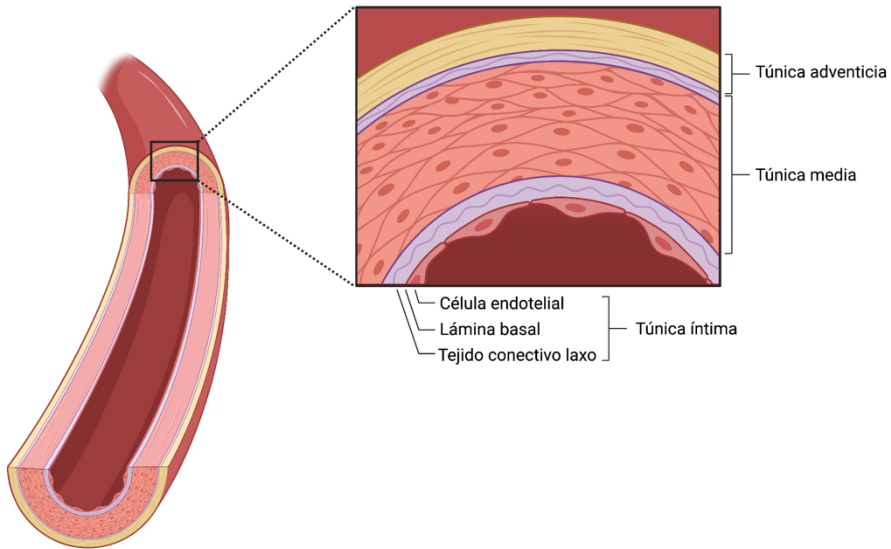


Figura 1. Estructura de una arteria. En las arterias se distinguen la túnica adventicia formada por tejido conectivo; la túnica media formada por células musculares lisas y una lámina elástica; y, la túnica íntima formada por las células endoteliales, la lámina basal y el tejido conectivo liso.

En las CE se aprecian tres tipos de uniones intercelulares –uniones adherentes, uniones estrechas y uniones hendidura (Figura 2)– que proporcionan una elevada cohesión al endotelio, permitiéndole actuar como barrera celular (3). Sin embargo, este también permite el trasiego de moléculas, células y líquidos mediante diferentes mecanismos de transporte. Estos mecanismos son: difusión pasiva, transcitosis y transporte mediado por transportadores tanto dependientes como independientes de adenosín trifosfato (ATP) (4). Todo ello confiere al endotelio permeabilidad vascular; propiedad clave y graduable ya que la función angular del endotelio es regular tanto el flujo como la perfusión sistémica. También ejerce otras funciones diversas y esenciales a nivel endocrino, metabólico e inmunológico gracias a la heterogeneidad de las CE a lo largo del árbol vascular (5,6).

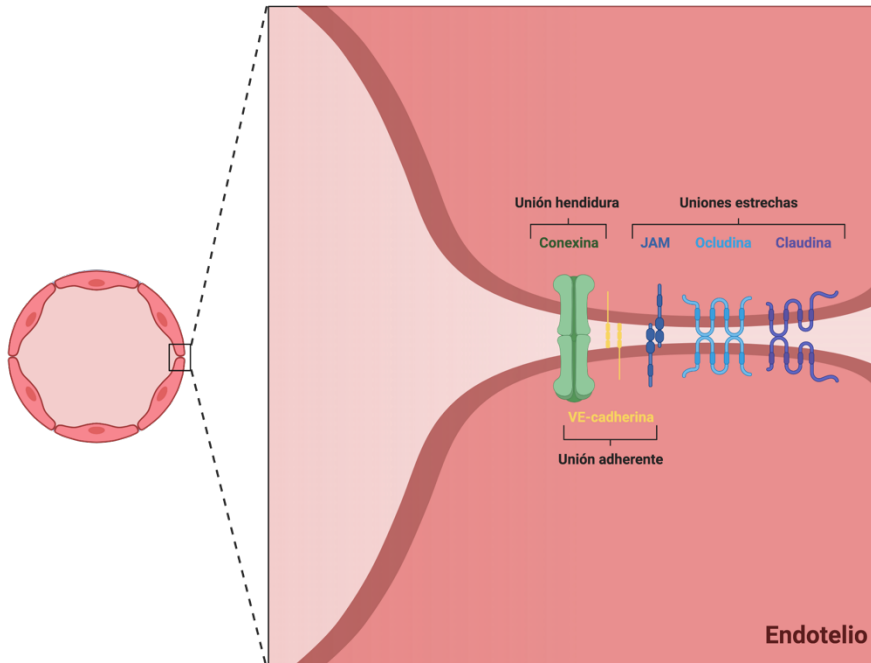


Figura 2. Uniones intercelulares presentes en el endotelio. Las uniones adherentes involucran cadherinas, las uniones estrechas claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de la unión (JAM, por sus siglas en inglés), y las uniones hendida conexinas.

El endotelio en el desempeño de sus funciones envuelve muchos procesos, como por ejemplo la modulación del diámetro y del tono vascular, la síntesis y el tráfico de sustancias, la coagulación, el reclutamiento de leucocitos, y la adhesión plaquetaria y leucocitaria, entre otros, gracias a los receptores y moléculas presentes en sus membranas. En definitiva, el endotelio desempeña un papel en la homeostasis vascular incuestionable, garantizando el balance entre condiciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras (7,8). Por lo general, el estado vasoconstrictor se asocia con condiciones prooxidantes, proinflamatorias y protrombóticas; mientras que el estado vasodilatador con condiciones antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas (9).

I.A.1.2. Integridad vascular y disfunción endotelial

El endotelio es fundamental para asegurar la homeostasis vascular –como se ha indicado previamente–; por tanto, es imprescindible preservar la integridad endotelial. Sin embargo, en ciertos escenarios fisiopatológicos se producen daños en el endotelio que, en última instancia, se traducen en la disfunción endotelial (DE), y, por ende, el endotelio queda incapacitado para generar respuestas fisiológicas adecuadas. Dos de las primeras señales de DE son el aumento de la permeabilidad y la alteración del tono vascular. Ambas características están relacionadas directamente con las funciones principales del endotelio, que son la regulación de la perfusión sistémica y del flujo.

En cuanto a la permeabilidad, el grado de esta se modula a través de la estabilidad de las uniones endoteliales y del estado del glicocálix (10). De los tres tipos de uniones endoteliales descritos, la que contribuye en mayor medida a la integridad estructural del endotelio es la de tipo adherente (11). Las uniones adherentes (Figura 2) median la adhesión homofílica célula-célula de manera calcio dependiente. La estabilidad de estas uniones se regula a través de un modelo dinámico basado en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y en el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) (Figura 3) (12). En condiciones basales, la VE-cadherina se une a la p120-catenina, formando un complejo que posteriormente se une a la actina de los microfilamentos del citoesqueleto celular (13,14). Ello confiere estabilidad al endotelio, y por tanto el grado de permeabilidad es el adecuado. No obstante, en condiciones fisiopatológicas se produce un aumento de la permeabilidad como consecuencia de la no formación del complejo VE-cadherina/p120-catenina, contribuyendo así al desarrollo de la DE.

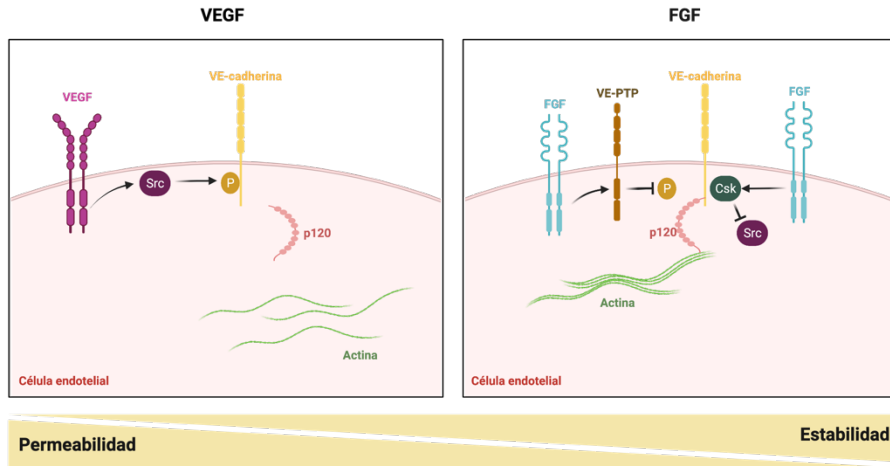


Figura 3. Modulación de la permeabilidad de las células endoteliales a través de la interacción VEGF-FGF. VEGF induce la fosforilación de VE-cadherina a través de la proteína tirosina quinasa Src (Src). La VE-cadherina fosforilada no puede unirse a p120-catenina, aumentando así la permeabilidad (15,16). Mientras que FGF contrarresta el efecto de VEGF a través de dos mecanismos con el fin de restablecer la estabilidad celular. Por un lado, FGF activa la proteína tirosina fosfatasa VE-cadherina (VE-PTP) que mantiene la VE-cadherina desfosforilada y por tanto se puede unir con p120-catenina (17). Por otro lado, FGF facilita la unión de la proteína tirosina quinasa Csk (Csk) a la VE-cadherina, inhibiendo a la Src (18).

En referencia al tono vascular, el flujo será adecuado o no dependiendo de la tonicidad vascular (hipertónico o hipotónico) y del diámetro del vaso. El tono vascular se regula gracias a sustancias vasoactivas producidas por el propio endotelio que modulan la contracción y la dilatación. En condiciones basales, se sintetizan niveles bajos –pero suficientes– de óxido nítrico (NO) a partir de la L-Arginina (L-Arg) mediante la acción de la isoforma calcio dependiente óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés). El NO, sustancia vasodilatadora, difunde hacia las células del músculo liso, produciéndose así la vasodilatación del vaso (Figura 4).

Otras sustancias vasodilatadoras secundarias son el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF) y la prostaciclina (PGI_2). El estado vasodilatado se equilibra a través de la acción de sustancias vasoconstrictoras como la angiotensina II (AII), el tromboxano A_2 (TXA_2) y la endotelina-1 (ET-1) (Figura 4) (19,20). No obstante, en un escenario fisiopatológico las concentraciones de las sustancias vasoactivas se desequilibran, favoreciendo el desarrollo de la DE.

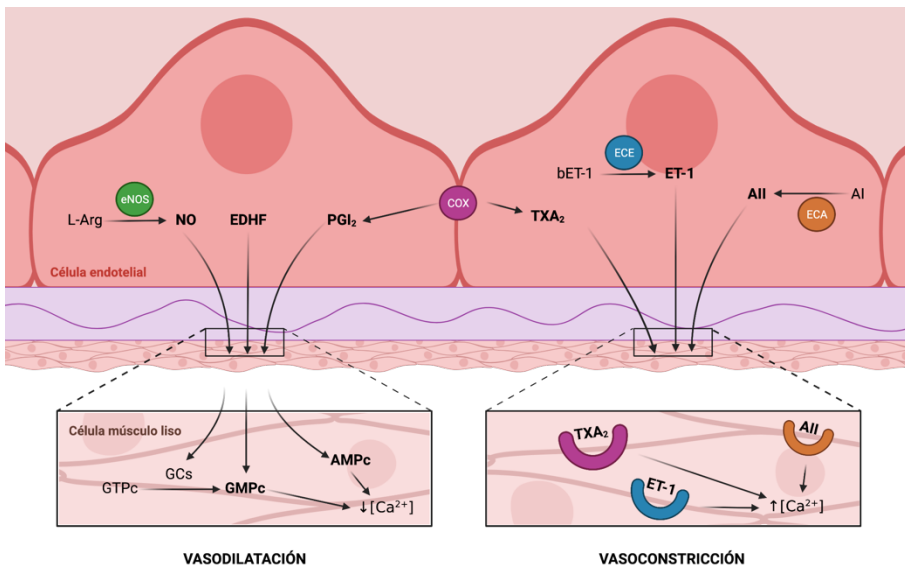


Figura 4. Vasodilatación y vasoconstricción vascular. En cuanto a la vasodilatación, se produce NO, –por acción de la eNOS– en la CE, que difunde hasta las células musculares lisas. Allí, NO activa la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) que interviene en la formación de guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Otras de las moléculas que intervienen en la relajación del vaso son EDHF y PGI_2 . EDHF también induce GMPc, también; y PGI_2 , que se produce gracias a la ciclooxigenasa (COX), induce al adenosín monofosfato cíclico (AMPc) tras difundir a las células musculares lisas. En última instancia, tanto GMPc como AMPc, como segundos mensajeros, provocan una disminución en la concentración de iones calcio intercelular (Ca^{2+}). En cuanto a la vasoconstricción, la ET-1, la AII y el TXA_2 , producidos por la enzima de conversión de la endotelina (ECE), la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) y la COX, respectivamente, difunden hacia las células musculares lisas donde se unen a sus receptores provocando el aumento de la $[Ca^{2+}]$.

Además de las sustancias vasoactivas, previamente descritas, el endotelio produce otras sustancias (Tabla 1) responsables de la amplia diversidad funcional que presenta (21). Estas se agrupan en sustancias vasoactivas, sustancias coagulantes y fibrinolíticas, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios e inmunológicos, y especies reactivas de oxígeno o nitrógeno.

Tabla 1. Sustancias producidas por las células endoteliales.

Sustancias vasoactivas	Sustancias coagulantes y fibrinolíticas	Factores de crecimiento	Mediadores inflamatorios e inmunológicos	Especies reactivas
<p>VASOCONSTRICTORAS</p> <p>All ET-1 TXA₂</p> <p>VASODILATADORAS</p> <p>ADM EDHF NO PGI₂ Quininas</p>	<p>COAGULANTES</p> <p>Factor V vWF HS Proteína C y S TF TM</p> <p>FIBRINOLÍTICAS</p> <p>PAI-1 tPA Uroquinasa</p>	<p>bFGF</p> <p>IGF-1</p> <p>PDGF</p> <p>TGF</p>	<p>CITOQUINAS</p> <p>IL MCP-1 TGF TNF-α</p> <p>MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</p> <p>ICAM PECAM Selectinas VCAM</p>	<p>OXÍGENO</p> <p>H₂O₂ HO₂ O₂⁻</p> <p>NITRÓGENO</p> <p>NO₂⁻ NO₂ NO₂Cl ONOO⁻</p>

All: angiotensina II; ADM: adrenomedulina; bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico; EDHF: factor de hiperpolarización derivado del endotelio; ET-1: endotelina-1; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; HO₂: hidroperóxido; HS: heparán sulfato; ICAM: moléculas de adhesión celular intercelular; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; IL: interleuquinas; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; NO: óxido nítrico; NO₂: dióxido de nitrógeno; NO₂⁻: ion nitrato; NO₂Cl: cloruro de nitrilo; O₂⁻: superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PECAM: molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas; PGI₂: prostaciclina, TF: factor tisular; TGF: factor de crecimiento transformante; TM: trombomodulina; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; tPA: activador tisular del plasminógeno; TXA₂: tromboxano; VCAM: molécula de adhesión celular vascular; vWF: factor de von Willebrand).

El endotelio sano tiene la capacidad de orquestar la síntesis de todas estas sustancias. Sin embargo, si el endotelio está deteriorado como consecuencia de la DE, presentará un fenotipo alterado que se caracteriza por una baja biodisponibilidad de NO y por la secreción aumentada de mediadores proinflamatorios. Por tanto, el estrés oxidativo (EO) y la inflamación crónica son dos posibles mecanismos responsables de la DE.

Por un lado, el EO se produce como consecuencia de la baja disponibilidad de NO, ya que el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) –especie reactiva de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) producida en la mitocondria– consume el NO producido, transformándolo en peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). El peroxinitrito, que es una especie reactiva de nitrógeno, produce el desacoplamiento de la eNOS que conlleva a la generación de más superóxido y peroxinitrito, perpetuando así la retroalimentación (22). Por otro lado, la inflamación crónica se caracteriza por niveles elevados de TNF- α y de proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés). El TNF- α es un mediador proinflamatorio que disminuye la expresión de eNOS directamente, y además inhibe la degradación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) que es un inhibidor de la eNOS. Asimismo, también, promueve la activación de la NADPH oxidasa que genera un aumento de ROS. La PCR atenúa la producción de NO por medio de la desestabilización del ARNm de la eNOS.

En definitiva, el EO y la inflamación se retroalimentan y promueven la DE (Figura 5) (23-25).

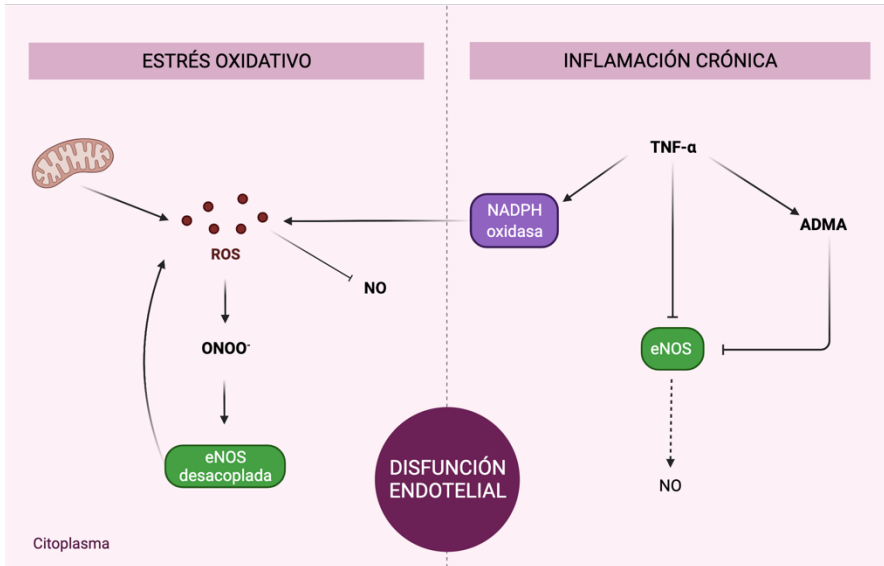


Figura 5. Estrés oxidativo e inflamación crónica como mecanismos de disfunción endotelial.

Estrés oxidativo: la mitocondria genera ROS que reduce la disponibilidad de NO y genera ONOO⁻ que provoca el desacoplamiento de eNOS. **Inflamación crónica:** el TNF-α activa a la NADPH oxidasa que induce la producción de ROS, e inhibe la eNOS –directa e indirectamente– por lo que impide la generación de NO.

La DE desencadena otros procesos desfavorables como la activación de la cascada de coagulación plasmática, y la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio como consecuencia de la reactividad endotelial. Por tanto, es necesario preservar la integridad vascular mediante diversos mecanismos fisiológicos homeostáticos acoplados con el fin de evitar hemorragias, trombos, edemas, émbolos, etc. Algunos de estos mecanismos son la inflamación y la hemostasia. Estos son procesos fisiológicos que se desencadenan en respuesta a un daño y están interrelacionados bidireccionalmente configurando un circuito de retroalimentación positiva, donde intervienen CE, leucocitos, plaquetas, factores de coagulación, mediadores inflamatorios, etc. (26).

I.A.2. Inflamación

I.A.2.1. Respuesta inmunitaria

La inflamación es un proceso fisiológico que se desencadena de manera espontánea, como respuesta inmunitaria, cuando el sistema inmunológico (SI) percibe una señal exógena de alerta con el propósito de combatirla. Existe un amplio abanico de señales; no obstante, las señales predominantes son la presencia de patógenos, los efectos de agentes químicos y las lesiones físicas externas que causan heridas. Esta respuesta inmunitaria pone en marcha diferentes procesos con el objetivo de detectar y eliminar el daño y, posteriormente, recuperar el tejido dañado. A nivel macroscópico, la inflamación puede percibirse por lo que se conoce como tétrada de Celso: rubor, calor, hinchazón y dolor (27). El rubor y el calor se deben a la acumulación de sangre en el tejido afectado; la hinchazón a la acumulación de células inmunitarias y a la extravasación del líquido plasmático; y el dolor se produce por la presión generada sobre las terminaciones nerviosas. A nivel microscópico, en las zonas de inflamación hay un microambiente cargado de células inmunitarias y de mediadores proinflamatorios. Los mediadores liberados aumentan la permeabilidad de los vasos favoreciendo la extravasación de las células que viajan a través de la sangre, contribuyendo así al proceso de sanación (28).

Se distinguen dos tipos de inflamación, la aguda y la crónica. La inflamación aguda se caracteriza por un comienzo rápido e intenso y una duración corta y es la que propiamente supone un mecanismo de defensa. Sin embargo, la inflamación crónica se prolonga en el tiempo de manera sostenida, llegando a ocasionar problemas autoinmunológicos (29).

I.A.2.2. Proceso inflamatorio y la función de los leucocitos

El proceso inflamatorio consta de diferentes fases que se autorregulan a través de la concentración presente de los mediadores inflamatorios con el objetivo de evitar respuestas magnificadas (30). Asimismo, la evolución del proceso inflamatorio involucra la interacción de diversos tipos celulares tales como CE, neutrófilos, linfocitos T y plaquetas, entre otros.

Las fases del proceso inflamatorio son las siguientes (31):

- **Primera fase:** el SI detecta una señal de alerta y los mastocitos liberan mediadores inflamatorios preformados o sintetizados de *novo*.
- **Segunda fase:** los mediadores provocan tanto el aumento de la permeabilidad como un efecto quimiotáctico sobre moléculas proinflamatorias y células inmunes circundantes, favoreciendo la acumulación de estas en la zona inflamada.
- **Tercera fase:** los leucocitos² acumulados transmigran desde los vasos hacia los tejidos con el fin de fagocitar al agente causal.
- **Cuarta fase:** tras eliminar el agente causal del daño, se inicia un proceso de reparación para regenerar el tejido afectado.

² Los leucocitos o glóbulos blancos son un conjunto heterogéneo de células del SI derivadas de la célula madre hematopoyética, pudiendo pertenecer al linaje linfoide o mieloide. Principalmente hay cinco clases de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Estos se agrupan en granulocitos (neutrófilo, eosinófilo y basófilo) y agranulocitos (monocito y linfocito). Asimismo, los mastocitos y las células dendríticas, también, pertenecen al conjunto de leucocitos.

Durante la segunda y tercera fase descrita de la inflamación, se produce la interacción leucocito-endotelio (32). Esta interacción es parte del proceso secuencial de etapas de la migración leucocitaria (33-35). Las etapas son (Figura 6):

- **Captura:** el primer paso para desencadenar la migración leucocitaria consiste en reclutar los leucocitos circulantes por el torrente sanguíneo en la zona afectada. Esta captura se produce gracias a la acción quimiotáctica de los mediadores inflamatorios presentes en el endotelio activado.
- **Rodamiento:** una vez capturados los leucocitos en la zona, comienzan a rodar sobre el endotelio, en vez de fluir inmersos en el torrente sanguíneo, y por consiguiente su velocidad disminuye. En este proceso participan fundamentalmente las moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las selectinas que interactúan con sus ligandos correspondientes (36).
- **Activación:** el rodamiento desencadena la activación inducible del leucocito a través de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios presentes en el endotelio activado.
- **Adhesión:** una vez el leucocito y el endotelio están activados y, por tanto son reactivos, pueden establecer interacciones firmes. Las moléculas que intervienen principalmente en estas interacciones son las integrinas y sus ligandos.
- **Migración o diapédesis:** tras la adhesión, el leucocito se prepara para la extravasación hacia los tejidos circundantes. La diapédesis puede ser para- o transcelular.

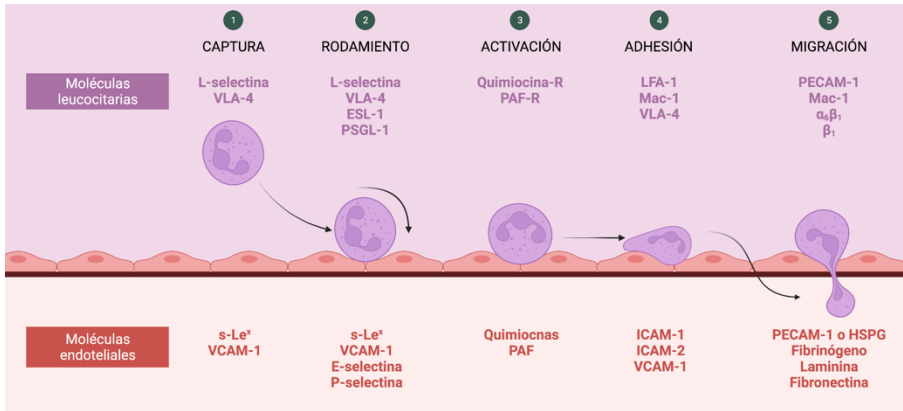


Figura 6. Etapas de la migración leucocitaria y moléculas de adhesión implicadas. Las etapas representadas son las descritas en el texto, y en cada una se produce la interacción específica de las moléculas leucocitarias con sus ligandos (moléculas endoteliales) respectivos. (ESL-1: ligando de E-selectina; HSPG: proteoglicano heparán sulfato; ICAM-1: molécula de adhesión celular intercelular 1; ICAM-2: molécula de adhesión celular intercelular 2; LFA-1: antígeno 1 asociado a la función linfocitaria; Mac-1 (CD11b/CD18): antígeno 1 macrófágico; PAF: factor activador de plaquetas; PAF-R: receptor del factor activador de plaquetas; PECAM-1: molécula de adhesión celular endotelial de plaqueta; PSGL-1: ligando de P-selectina; s-Le^x: sialil Lewis X ; VLA-4: integrina $\alpha_4\beta_1$; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1).

Las moléculas descritas en la **Figura 6** son las moléculas clásicas involucradas en las distintas etapas que conducen a la migración leucocitaria. Sin embargo, en los últimos años, se han implicado también los receptores endoteliales de tipo *scavenger* (SR, por sus siglas en inglés) (37). Los SR se agrupan en ocho clases (A-H) y sus ligandos principales son lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (oxLDL) o acetiladas (acLDL). Concretamente se ha señalado a los siguientes SR: LOX-1 (SR-EI), SR-PSOX (SR-G) y SCARF-1 (SR-F) (38).

I.A.3. Hemostasia y trombosis

I.A.3.1. Hemostasia

La hemostasia es el conjunto de procesos fisiológicos complejos que tienen lugar con el fin de prevenir y detener las hemorragias. Al menos cuatro mecanismos intervienen en la hemostasia que están estrechamente relacionados: vasoconstricción, hemostasia primaria, coagulación y fibrinólisis (39).

La hemostasia primaria consiste en la agregación plaquetaria sobre la pared del vaso, formándose, así, un tapón que ayuda a sellar el vaso y por consiguiente a detener el sangrado. Este proceso involucra tres eventos: la adhesión de las plaquetas³ sobre el endotelio, la activación plaquetaria y la agregación de plaquetas (Figura 7).

³ Las plaquetas o trombocitos son células anucleadas y discoidales (2-3 μm de diámetro) formadas mediante un proceso de escisión de los megacariocitos denominado trombopoyesis. Los megacariocitos derivan del linaje mieloide de la célula madre hematopoyética (284). En el ser humano se estima que hay alrededor $150-400 \times 10^9$ plaquetas/L circulando (285).

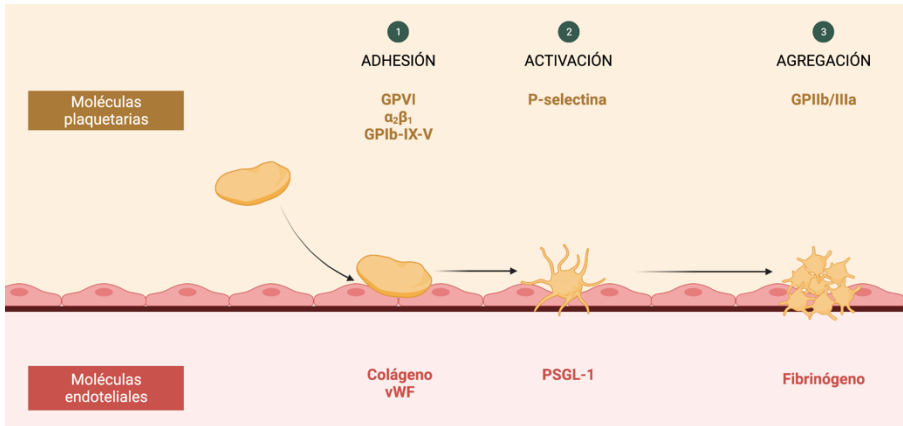


Figura 7. Eventos durante la hemostasia primaria y moléculas implicadas. En la hemostasia primaria se produce primero la interacción plaqueta-endotelio que da lugar a la adhesión de las plaquetas. Posteriormente, se produce la activación de las plaquetas, lo cual provoca una serie de cambios que finalmente dan lugar a la formación de un aglomerado plaquetario mediante la interacción plaqueta-plaqueta. ($\alpha_2\beta_1$: integrina $\alpha_2\beta_1$; GPIb-IX-V: glicoproteína Ib-IX-V; GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa; GPVI: glicoproteína VI; PSGL-1: ligando de la P-selectina; vWF: factor de von Willebrand)

En un primer momento, el endotelio dañado queda expuesto a colágeno – sustancia protrombótica– que induce la adhesión de las plaquetas sobre él. Esta adhesión puede ser directa gracias a los receptores plaquetarios GPVI y $\alpha_2\beta_1$, o indirecta través del vWF, secretado por las CE, que se une al receptor plaquetario GP1b-IX-V (40).

Una vez adheridas, las plaquetas se activan por la acción de diferentes moléculas como colágeno, adenosín difosfato (ADP), TXA_2 , trombina, etc. (Figura 8) (41).

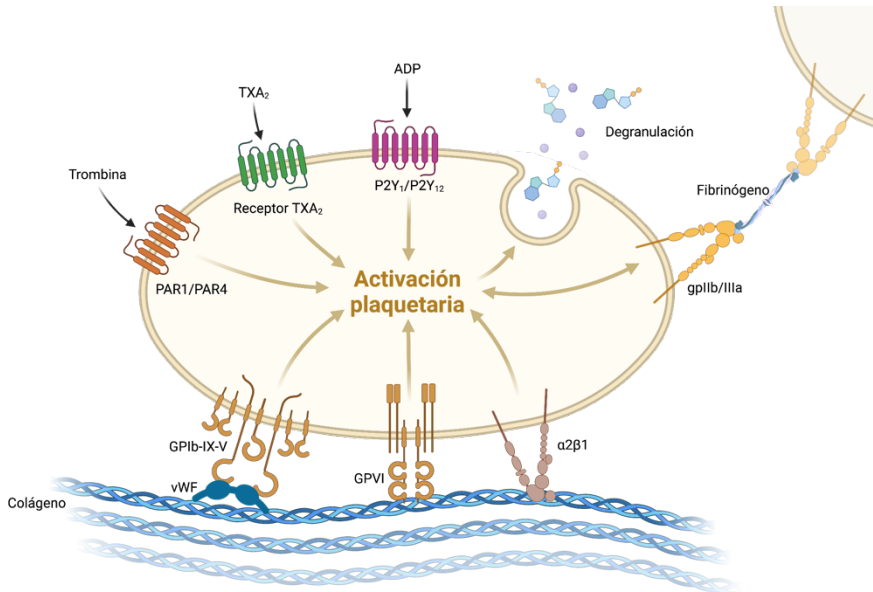


Figura 8. Activación plaquetaria por la acción de diferentes moléculas. En la figura se muestran siete vías por las que se pueden activar las plaquetas. Se puede activar por acción de la trombina a través de los receptores PAR1 y PAR4; del tromboxano (TXA₂) y su receptor; del adenosín difosfato (ADP) interaccionando con los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂; del colágeno vía el factor de von Willebrand (vWF); del fibrinógeno a través de GPIIb/IIIa; y, de la interacción con GPVI y α₂β₁.

Esta activación provoca la degranulación (Figura 8) y el cambio morfológico de la plaqueta, adquiriendo esta una forma elongada. La degranulación consiste en la liberación del contenido preformado y almacenado en los gránulos plaquetarios principales (gránulos- α , gránulos- δ y lisosomas), ya que además tienen otras vesículas secretoras como por ejemplo los peroxisomas o gránulos T. Asimismo, la plaqueta activada es capaz de sintetizar mediadores adicionales de *novo* (42). El contenido granular presenta una amplia variedad, incluyendo factores de coagulación, moléculas de adhesión, citoquinas, etc. (Tabla 2) (43).

Tabla 2. Contenido de los gránulos plaquetarios.

Gránulos- α	Gránulos- δ	Lisosomas
<p>GP de ADHESIÓN</p> <p>P-selectina Fibrinógeno vWF Fibronectina Trombosporina</p>	<p>AMINAS</p> <p>Serotonina Histamina</p>	<p>PROTEASAS ÁCIDAS</p>
<p>FACTORES DE COAGULACIÓN</p> <p>Factor V Factor XI Factor XIII</p>	<p>CATIONES BIVALENTES</p> <p>Ca²⁺ Mg²⁺</p>	<p>GLICOHIDROLASAS</p>
<p>OTROS FACTORES</p> <p>PDGF TGF-β EFG VEGF</p>	<p>NUCLEÓTIDOS</p> <p>ATP ADP GTP GDP</p>	
<p>QUIMIOCINAS</p>		

ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; EFG: factor de crecimiento epidérmico; GDP: guanosín difosfato; GTP: guanosín trifosfato; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; vWF: factor de von Willebrand).

La liberación del contenido granular permite la continuidad del proceso hemostático (44). Los gránulos- α liberan vWF y fibrinógeno que participan en la agregación plaquetaria. También, liberan P-selectina que se transloca a la superficie facilitando la adhesión uniéndose a PSGL-1 (45,46). Los gránulos- δ liberan ADP – agonista plaquetario– que induce el reclutamiento de otras plaquetas a través del receptor P2Y₁₂, y otros receptores purinérgicos. También, liberan Ca²⁺, aumentando la concentración intracelular. Esto es clave tanto para la coagulación como para la activación de otras plaquetas (43).

Finalmente, todas las plaquetas acumuladas van interaccionando, formándose, así, el aglomerado plaquetario que sella el vaso. Este tapón plaquetario esta mediado por fibrinógeno que se une al receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas (47,48).

Este agregado plaquetario primario sirve como andamiaje reticular para la formación del coágulo de fibrina mediante los diferentes procesos implicados en la cascada de coagulación (49).

I.A.3.3. Trombosis

La trombosis es el estado patológico inducido por la formación de coágulos en el interior de los vasos sanguíneos que resulta en el cese del flujo sanguíneo, llegando a producir MI entre otras ECV (50). El coágulo y el trombo se forman fisiológicamente igual; no obstante, la formación del coágulo hace referencia a una respuesta homeostática de eminente valor, mientras que la formación del trombo a una condición patológica, que puede conllevar a diversas manifestaciones clínicas en función del vaso que se obstruya.

Los procesos de inflamación y coagulación están estrechamente relacionados, ya que por ejemplo las heridas formadas en los tejidos requieren la activación tanto de la respuesta inmune inflamatoria para atacar a los patógenos, como del proceso de coagulación con la finalidad de detener el sangrado (50). Por tanto, razonablemente, trombosis e inflamación también están relacionadas. Incluso algunos expertos acuñan el término inmunotrombosis (50). Como se ha visto antes uno de los primeros pasos en el proceso inflamatorio es la interacción leucocito-endotelio (Figura 6), esto puede causar eventualmente la activación de los leucocitos, y especialmente de los neutrófilos promoviendo así la adhesión de las plaquetas circundantes sobre los mismos neutrófilos (51). Esta adhesión se puede dar principalmente mediante la interacción de la molécula de adhesión PSGL-1 en leucocitos y P-selectina en plaquetas, aunque otras moléculas de adhesión están involucradas en dicho proceso (52,53). Estas otras moléculas son: Mac-1 leucocitaria con GPIIb/IIIa (vía fibrinógeno) plaquetarias; CD40 y $\alpha_1\beta_2$ leucocitaria con CD40L e ICAM-2 plaquetaria, respectivamente (56). Subsecuentemente, las plaquetas se pueden activar durante este proceso e inducir tanto su adhesión sobre las células endoteliales como la propia agregación plaquetaria (Figura 7) (56). A consecuencia de todas estas interacciones entre los diferentes tipos de células vasculares y otros mecanismos (descritos en la Figura 9) (50,54) se puede producir la formación de los trombos (Figura 9).

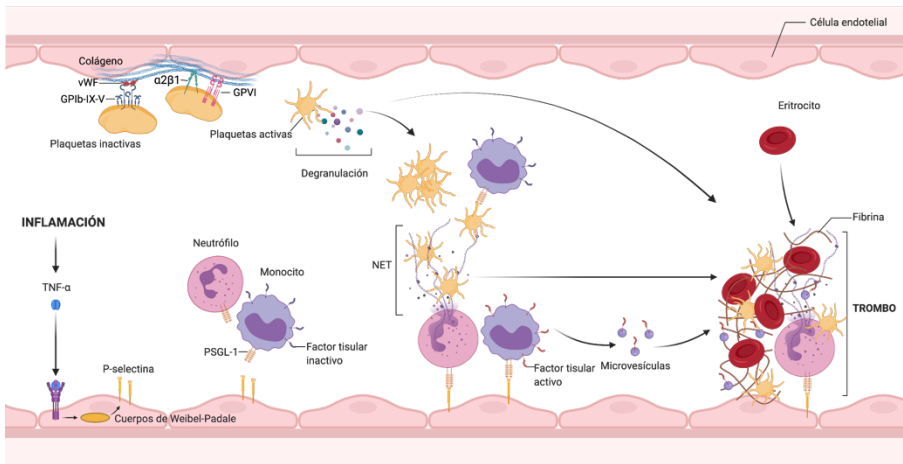


Figura 9. Procesos durante la inmunotrombosis. La inflamación produce factor de necrosis tumoral α ($TNF-\alpha$) que induce la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, liberando P-selectina. P-selectina recluta tanto a neutrófilos como monocitos a través de PSGL-1. Por un lado, el factor tisular expuesto en los monocitos se activa –en respuesta a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) o a los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) a través del receptor de reconocimiento de patrones–, induciendo la activación de la ruta extrínseca de la coagulación. Por otro lado, los neutrófilos liberan las trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en Inglés) que son redes de ADN asociadas a histonas (H3 y H4). Las NET pueden activar directamente la coagulación a través de la activación del factor XII. Además, las NET favorecen el reclutamiento de plaquetas al unirse al factor de von Willebrand. Asimismo, las histonas promueven la activación plaquetaria. Asimismo, el endotelio dañado queda expuesto a colágeno que favorece la adhesión de las plaquetas al endotelio a través de diferentes receptores plaquetarios (GPIIb/IIIa, $\alpha_2\beta_1$ y GPIb-IX-V). Una vez activadas las plaquetas, la degranulación de las mismas induce la agregación plaquetaria, la interacción plaqueta-neutrófilo y la formación del trombo. Todo ello desencadena en la formación del trombo, en cuyo entramado también hay eritrocitos y fibrina.

I.A.4. Receptores purinérgicos

El término purinérgico fue introducido en 1972 por Burnstock (55), que más tarde clasificó los receptores purinérgicos basándose en la especificidad por sus ligandos, como son el ATP y otros nucleótidos de purina y pirimidina que se liberan en los tejidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (56,57). Estos receptores están implicados en procesos fundamentales para organismo como la homeostasis, inmunidad e inflamación (58).

Los receptores purinérgicos, identificados hasta el momento, se han dividido en P1 y P2 en función de sus estructuras moleculares y de las vías de transducción que activan. Los receptores P1, están acoplados a la proteína G, mientras que los receptores P2 se subdividen en receptores de canal iónico, receptores P2X, y en receptores acoplados a la proteína G, receptores P2Y, y presentan diferente sensibilidad a los ligandos endógenos (59).

En cuanto a los receptores de tipo P1 o receptores de adenosina, hay descritos cuatro (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3). Los receptores A_1 y A_3 se acoplan a la proteína $G_{\alpha_{i/o}}$ y median la inhibición de la adenilato ciclasa: mientras que los receptores A_{2A} y A_{2B} se acoplan a la proteína G_{α_s} y activan la adenilato ciclasa. Por tanto, los receptores P1 en conjunto regulan la acumulación de AMPc (60). En el caso de los receptores P2Y, hay descritos ocho ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) y presentan diferentes afinidades por los ligandos ADP, UTP, UDP y ADP-glucosa, a excepción del $P2Y_{11}$ que es selectivo para el ligando ATP (61). Estos receptores son funcionales cuando interactúan dos subunidades, formando complejos homodiméricos, si las dos subunidades son idénticas o heterodiméricos, si las subunidades son diferentes. Como se ha indicado previamente, los receptores P2Y se acoplan a las proteínas G heterotrimérica. Los receptores $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$,

P2Y₆ y P2Y₁₁ se acoplan a la proteína G $\alpha_{q/11}$; y los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ a la G $\alpha_{i/o}$. Asimismo, el P2Y₁₁ también acopla con la G α_s (62). En referencia a los receptores P2X, se han descrito siete (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) y estos son selectivos para el ATP, pero presentan una sensibilidad por el mismo muy diferentes entre ellos (61,63). Estos receptores son funcionales cuando interactúan tres subunidades, formando complejos homotriméricos, si las tres subunidades son idénticas, o heterotriméricos, si al menos una de las subunidades es diferente (62).

El receptor P2X₇ es el último subtipo de receptor perteneciente a la familia de los receptores P2X, que ha sido identificado (64). Actualmente es el foco de muchas investigaciones como posible diana terapéutica debido a su contribución en una gran cantidad de trastornos relacionados con la inmunidad y la inflamación (65). El receptor P2X₇, al igual que otros miembros de su familia, utiliza ATP como ligando, pero curiosamente presenta una estructura única, que hizo que en un primer momento se clasificara como receptor P2Z, y que se asocia con un mecanismo de activación poco definido causado por niveles inusualmente elevados de ATP (64,66). Además, su activación prolongada resulta en la apertura de un poro de membrana que permite la entrada de moléculas de alto peso molecular.

Aunque el mecanismo de acción del receptor P2X₇ es ambiguo, existe un consenso general sobre su implicación en procesos inflamatorios. Además, recientemente también se ha asociado el receptor P2X₇ con la trombosis (67) y otras patologías como el cáncer, y enfermedades neurológicas. En cuanto a su relación con los procesos trombóticos, diferentes estudios *in vivo* han demostrado el papel de los receptores P2X₇ en la formación de trombos a nivel de la arteria carótida (68), y se observó que tras su activación se induce la liberación de TF por parte de los macrófagos (67).

I.A.5. Enfermedades cardiovasculares

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se considera enfermedad cardiovascular (ECV) al conjunto de trastornos que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, De acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-11) todos estos trastornos cardiovasculares se agrupan de la siguiente manera:

- Arritmia e insuficiencia cardíaca;
- Cardiopatía pulmonar;
- Cardiopatías isquémicas (por ejemplo, infarto de miocardio);
- Coronariopatías (por ejemplo, arterioesclerosis coronaria);
- Endo- y pericarditis;
- Enfermedades cardíacas reumáticas;
- Enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, isquemia cerebral);
- Enfermedades de las cavidades y válvulas cardíacas;
- Enfermedades de los vasos (por ejemplo, aterosclerosis, oclusión arterial aguda, trombosis venosa profunda, etc.);
- Enfermedades hiper- e hipotensivas.

De entre todos los desórdenes citados previamente, destacan por su prevalencia las cardiopatías isquémicas y las enfermedades cerebrovasculares. A nivel mundial, en 2019, fueron la primera y segunda causa de defunción, según el informe presentado por la OMS (69). En España, fueron la segunda y tercera causa de fallecimiento en 2020, después del COVID-19, según los últimos datos presentados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) (70).

La hegemonía de las ECV como principal causa de muerte no es puntual de este último lustro, sino que podría decirse que es la primera causa de defunción del siglo XXI a nivel mundial. Por tanto, es necesario encaminar los esfuerzos a prevenir el desarrollo de las ECV con el objetivo de reducir la mortalidad asociada. La probabilidad de desarrollar las ECV se asocia con una serie de variables, conocidas como factores de riesgo CV. Los factores pueden ser (71):

- **No modificables:** edad, sexo, predisposición genética.
- **Modificables de tipo comportamental:** tabaco, dieta, alcohol, deporte, etc.
- **Modificables de tipo fisiológico:** hipertensión, hiperglucemia, hiperlipidemia, sobrepeso u obesidad, diabetes mellitus, síndrome metabólico, etc.

Los factores modificables son de mayor interés dado que se puede actuar sobre ellos de manera preventiva.

A nivel fisiológico, un escenario proinflamatorio y un balance hemostático deteriorado se asocia con el desarrollo de ECV (72,73).

I.A.6.1. Ateroesclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva, con elevada participación inmunitaria (74,75) que causa diversas ECV. Esta patología implica la formación de lesiones debidas a la acumulación de lípidos, especialmente de la fracción conocida como lipoproteínas de baja densidad (LDL) del colesterol. Estas lesiones, que se conocen como placas ateroscleróticas, suelen presentarse como engrosamientos focales asimétricos de la túnica íntima de los vasos arteriales (76). La primera etapa de la formación de la placa consiste en la acumulación de células

inmunes y depósitos de lípidos. Las placas maduras, también conocidas como ateromas, presentan una estructura más compleja (75). En el centro de la placa se encuentran los macrófagos infiltrados y los lípidos acumulados, y a su alrededor se forma una capa de células musculares lisas y una matriz rica en colágeno (Figura 10) (77). En los ateromas, muchas de las células inmunes infiltradas (linfocitos T) muestran signos de activación y producen y liberan mediadores proinflamatorios, como la interleucina-1 beta (IL-1 β), el interferón- γ (IFN γ) y el TNF, perpetuando así la inflamación (78,79).

Por tanto, las placas se caracterizan por tener un componente inflamatorio y fibrótico; cuya estabilidad depende tanto con el propio grosor como con el nivel de células inmunitarias infiltradas; las placas delgadas y con un número elevado de células se denominan placas vulnerables (80). Aunque las complicaciones clínicas de la aterosclerosis pueden surgir de placas que causan estenosis que limitan el flujo sanguíneo, los eventos clínicos más graves siguen la rotura de la placa, que expone el material protrombótico de la placa a la sangre y provoca una oclusión trombótica repentina de la arteria. En el corazón, la aterosclerosis puede conducir a MI (Figura 10) e insuficiencia cardíaca; mientras que en las arterias que perfunden el cerebro puede causar isquemia (75).

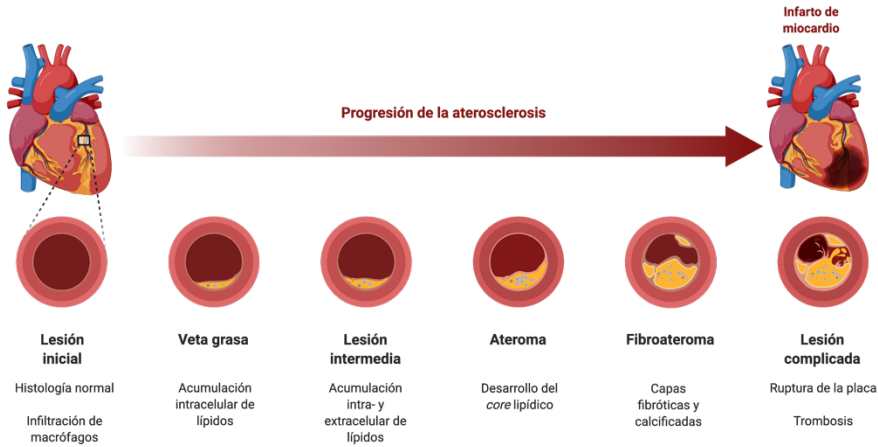


Figura 10. Progresión de la formación de la placa aterosclerótica. En la figura se muestran las diferentes etapas de la aterosclerosis, desde una lesión inicial en la arteria hasta el desarrollo de una lesión complicada que culmina con la ruptura de la placa y trombosis.

El papel que desempeñan las plaquetas en la aterosclerosis, especialmente en su desarrollo, está bien definido (81). Las plaquetas son las células clave que relacionan la inflamación y la trombosis (82), ya que la expresión y secreción de quimiocinas por parte de las plaquetas facilita tanto la interacción plaqueta-endotelio como de otras interacciones celulares en la placa aterosclerótica (83). La adhesión plaquetaria en la pared vascular conduce a la activación plaquetaria que induce, a su vez, la liberación de quimiocinas, como PF4, que median el reclutamiento de leucocitos en el vaso, favoreciendo así la aterogénesis, ateroprogresión y aterotrombosis (84,85).

I.B. VIH, SIDA, TERAPIA ANTIRRETROVIRAL Y COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES

I.B.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

I.B.1.1. Clasificación

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus que afecta al SI, pudiendo llegar a producir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Hoy en día, se conocen dos especies del VIH, VIH-1 y VIH-2. Ambas son descritas, por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV), como miembros pertenecientes al género *Lentivirus*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, familia *Retroviridae* y orden *Ortervirales* (86). La similitud a nivel genómico entre ambas especies es aproximadamente del 48% (87). Asimismo, cada especie está conformada por diferentes cepas. En cuanto a las cepas de la especie VIH-1 se han agrupado en tres grupos: principales, nuevas y atípicas. Además, dada la diversidad existente, las cepas del grupo principal se han subclasificado en 11 subtipos (de la A a la K), más los intersubtipos recombinantes (88). En el caso del VIH-2, la diversidad es menor y únicamente se han descrito 8 subtipos (de la A a la H).

Independientemente de la descripción taxonómica del virus, este se puede catalogar atendiendo a la clasificación de Baltimore (89). Esta agrupa los virus en siete grupos en función de su genoma y su método de replicación. El VIH pertenece al grupo VI que se caracteriza por presentar un genoma constituido por una cadena monocatenaria de ácido ribonucleico (ARNmc) de sentido positivo, la cual se replica a través de una bicadena de ácido desoxirribonucleico (ADNbc) (90).

I.B.1.2. Genoma

El VIH tiene un genoma de ARN diploide, es decir, tiene dos copias idénticas de ARNm. Cada copia tiene aproximadamente una longitud de 9,2 kilobases (Kb) (91), que comprenden un total de nueve genes que codifican a 15 proteínas (Figura 11). Los nueve genes se agrupan según su función:

- **Estructurales:** *gag*, *pol* y *env*.
- **Reguladores:** *tat* y *rev*.
- **Accesorios:** *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*.

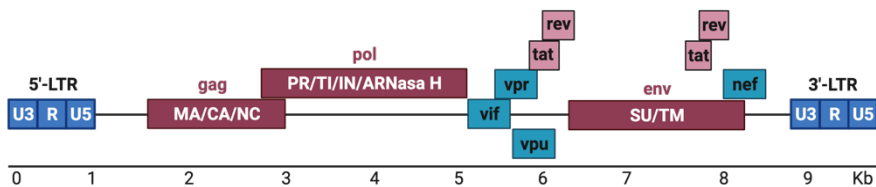


Figura 11. Representación esquemática del genoma del VIH. El genoma está flanqueado por secuencias denominadas LTR por sus siglas en inglés (“long terminal repeat”). La región 5'-LTR codifica al promotor para la transcripción de los genes virales, mientras que el extremo 3'-LTR permite la poliadenilación del ARN. Los **genes estructurales** codifican un total de nueve proteínas. El gen *gag* codifica la proteína de la matriz (MA, p17), la proteína de la cápside (CA, p24), y la nucleoproteína (NC, p7); el gen *pol* codifica las siguientes enzimas: proteasa (PR, p10), transcriptasa inversa (TI, p51), integrasa (IN, p32) y ARNasa H; y, el gen *env* codifica tanto la glicoproteína de superficie (SU, gp120) como de transmembrana (TM, gp41). Los **genes reguladores** codifican una proteína cada uno. El gen *tat* codifica a la proteína transactivadora (p14) –que activa la transcripción de los genes virales– y el gen *rev* al regulador del “splicing” del ARN (p19). Los **genes accesorio** codifican cuatro proteínas accesorias. El gen *nef* (p27) al factor regulador negativo; el gen *vif* (p23) al factor de infectividad viral; el gen *vpr* (p15) a la proteína r vírica; y, el gen *vpu* (p16) a la proteína única vírica (92).

I.B.1.3. Morfología

El VIH es un virus complejo con envoltura, cuya morfología es semejante a un esfera de 100 nm de diámetro (Figura 12) (92). La envoltura es una bicapa lipídica constituida por un total de 72 trímeros de gp120/gp41 que son glicoproteínas de superficie y de transmembrana, respectivamente. Por debajo de esta bicapa, hay una matriz formada por la proteína de matriz, p17. Esta matriz a su vez envuelve una nucleocápside formada por la proteína de cápside, p24, que encapsula el material genético –que se asocia a la proteína de nucleocápside, p7, formando un complejo ARN/proteína– y algunas enzimas como la proteasa (PR), transcriptasa inversa (TI) e integrasa (IN) (93).

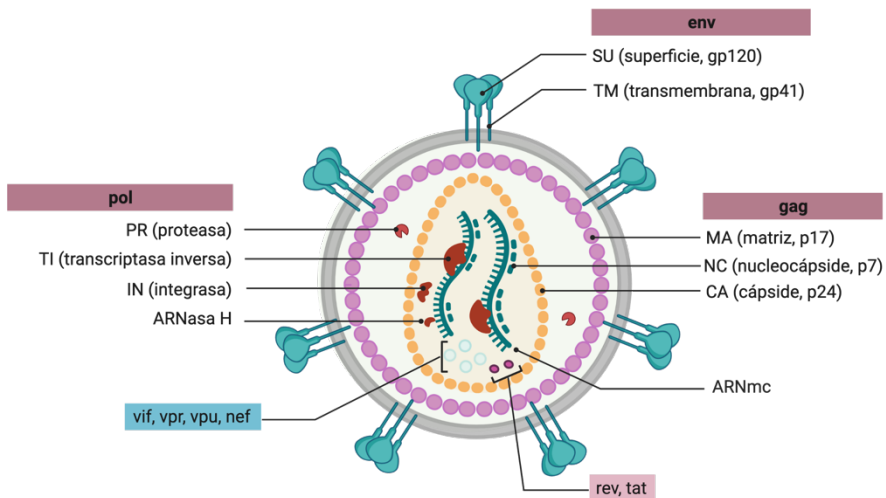


Figura 12. Representación esquemática de la estructura del VIH. En la superficie, se observan los trímeros de gp120/gp41 que forman la bicapa lipídica. Por debajo de esta, se encuentra tanto la matriz que está compuesta por la p17 como la nucleocápside por la p24. En el interior, se encuentra el ARNmc, las proteínas y las enzimas propias del VIH.

I.B.1.4. Ciclo biológico

El ciclo de vida del VIH, por el cual se produce la infección, se puede dividir en nueve etapas (Figura 13) (94):

1. Fijación

El primer paso para que el virus cause una infección es la fijación de este en la célula hospedadora. Esta fijación se produce gracias a la unión de las gp120, presentes en la envoltura del virus, y los receptores CD4 ("Cluster of Differentiation 4") expresados en la superficie de linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Este reconocimiento provoca un cambio conformacional en la gp41 del virus. Además, esta unión requiere de la participación de co-receptores que generalmente son los receptores de quimiocina, CCR5 y CXCR4. El primero se expresa en linfocitos T de memoria, macrófagos y células dendríticas, mientras que el segundo en linfocitos T de memoria y "naive".

2. Fusión

Tras la fijación, se produce la fusión de la envoltura lipídica del virus con la membrana plasmática de la célula hospedadora, gracias a alta hidrofobicidad del virus. Una vez dentro, se produce la denudación de la matriz, la cápside y la nucleocápside del virus como consecuencia de un cambio en el pH. Finalmente, el ARN viral queda libre en el espacio citoplasmático de la célula hospedadora.

3. Transcripción Inversa

Una vez el ARN viral está libre en el citoplasma, actúa sobre él la enzima transcriptasa inversa viral, que lo emplea como molde para generar la monocadena de ADN complementario (ADNc) a través del proceso conocido como transcripción inversa. A continuación, se forma una doble cadena de ADN viral gracias a la enzima ADN polimerasa celular que utiliza como molde la monocadena de ADNc. Por otro lado, el ARN viral es degradado por la enzima ARNasa H.

4. Integración

Tras la obtención del ADNbc viral, se produce la translocación citoplasma-núcleo a través de los poros nucleares. Una vez en el interior del núcleo se integra con el ADN de la célula hospedadora mediante la acción de la enzima integrasa viral. Tras integrarse, este puede replicarse junto con el resto del genoma durante la división celular.

5. Transcripción

Llegado el momento, el ADN viral se transcribe a ARN mensajero (ARNm) mediante los mecanismos propios de la célula hospedadora.

6. Traducción

Una vez transcrito el material genético del virus a ARNm, en el núcleo, se transloca al citoplasma, donde se traduce a poliproteínas inmaduras con la intervención de los propios ribosomas de la célula.

7. Maduración

Las poliproteínas inmaduras son proteolizadas por parte de la proteasa viral, dando lugar a las proteínas constitutivas y maduras del virus.

8. Ensamblaje

Antes de que las nuevas partículas víricas se liberen, se produce el ensamblaje del ARN viral junto con las proteínas propias del virus para así constituir el componente estructural interno del virión.

9. Liberación

Finalmente, la liberación consiste en la expulsión del nuevo virión al exterior de la célula hospedadora por gemación; y por ende, estará envuelto con una porción de la membrana plasmática celular.

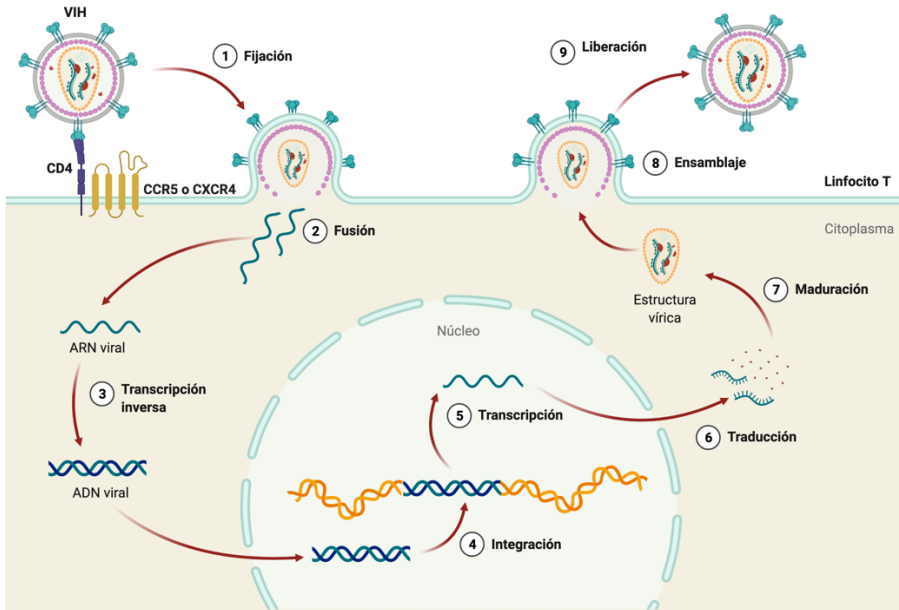


Figura 13. Representación esquemática del ciclo vital del VIH en un linfocito T, donde se muestran las nueve fases del ciclo replicativo del virus. Las etapas diferenciadas son: 1. Fijación, 2. Fusión, 3. Transcripción inversa, 4. Integración, 5. Transcripción, 6. Traducción, 7. Maduración, 8. Ensamblaje y 9. Liberación de los nuevos viriones. **(1)** En un primer momento, los trímeros de gp120/gp41 del virus son reconocidos por los CD4 de los linfocitos T, fijando el virus a la célula. Además, en esta unión intervienen co-receptores de quimiocina (CCR5 o CXCR4). **(2)** Tras la fijación se produce la fusión de la envoltura del virus con la membrana del linfocito. **(3)** Seguidamente, se produce la denudación del virus, quedando libre el ARN viral en el citoplasma que será transcrito a ADN viral mediante la transcripción inversa. **(4)** A continuación, se transloca el ADN viral al interior del núcleo para su integración con el ADN celular. **(5)** Una vez integrado el ADN viral en el celular se replica y se transcribe mediante los mecanismos propios de la célula. **(6)** El ADN viral transcrito a ARNm se transloca al citoplasma para ser traducido en poliproteínas inmaduras **(7)** que serán proteolizadas. **(8)** Finalmente, el ARN viral junto con sus proteínas se ensambla y **(9)** se libera por gemación para infectar nuevas células.

I.B.2. Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

I.B.2.1. Etiología y semiología

La etiología del SIDA es la infección provocada por el VIH. Una vez el virus invade el cuerpo humano induce un cambio en las células inmunitarias, provocando una alteración en el SI. En la infección por el VIH se pueden distinguir tres estadios y en cada uno se aprecia una semiología propia (Figura 14) (95):

1. Infección aguda: fase temprana de la infección y se manifiesta en un intervalo de tiempo de dos a cuatro semanas tras la invasión. En esta etapa el VIH es sumamente contagioso debido a su intensa replicación y a su propagación por todo el cuerpo. Durante este período el virus ataca y destruye aceleradamente los linfocitos T CD4+, y el organismo produce anticuerpos contra el virus. Los síntomas y signos que se pueden apreciar son similares a los del virus de la influenza: fiebre, escalofríos, sudoración, dolor de cabeza, erupción cutánea, inflamación de los nodos linfáticos, dolores musculares, diarrea, etc.

2. Infección crónica: etapa donde se produce un equilibrio entre los mecanismos inmunológicos de neutralización contra el virus y la regeneración de los linfocitos T CD4+. Esto permite que la cantidad de virus circulante, la carga viral plasmática (CVP) y el recuento de los linfocitos T CD4+ estén en armonía, por lo general, y por tanto la persona infectada sea asintomática. Sin embargo, con el paso del tiempo –10 o más años, aunque en algunas personas puede avanzar más rápido– la concentración del virus aumenta gradualmente y la cantidad de linfocitos T CD4+ disminuye, lo cual afecta gravemente al sistema inmunitario.

3. SIDA: fase más avanzada de la infección por el VIH y para emitir el diagnóstico de SIDA, o bien el recuento de linfocitos T CD4+ es menor a $200/\text{mm}^3$, o bien la persona presenta afecciones características del SIDA, como consecuencia de que el SI está destruido y el organismo es vulnerable a las infecciones oportunistas y al cáncer. Algunos ejemplos de estas afecciones son encefalopatía, retinitis por citomegalovirus, neumonía, criptosporidiosis intestinal crónica, cáncer cervicouterino invasor, etc. En última instancia, el SIDA puede desembocar en la muerte.

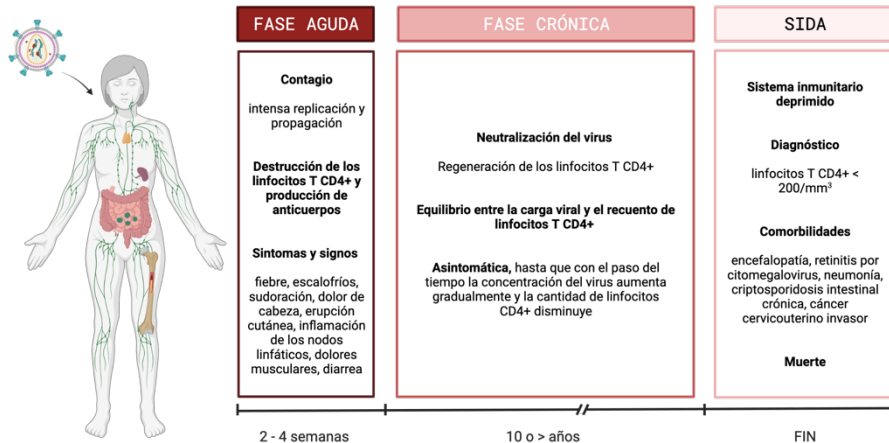


Figura 14. Cuadro de los estadios de la infección por VIH. La primera fase comienza cuando el VIH penetra en el hospedador y se desarrolla la infección aguda, ya que este se replica y propaga intensamente. En esta fase se aprecia una sintomatología similar a la gripe como consecuencia de la destrucción de los linfocitos T. Tras esta fase, se produce la infección crónica, donde el organismo neutraliza el virus y se logra un equilibrio entre la carga viral plasmática (CVP) y el número de linfocitos T. Esta fase se caracteriza por ser asintomática y por presentar una duración muy variable. Finalmente, el último estadio es el SIDA, donde el sistema inmunitario está destruido y se presentan comorbilidades; todo ello converge en la muerte.

I.B.2.2. Perspectiva evolutiva de la epidemia

El VIH se originó como resultado de múltiples transmisiones zoonóticas del virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) de primates no-humanos a humanos (96). El primer indicio relatado de la enfermedad data de 1931 en la República Democrática del Congo, donde un hombre contrajo la enfermedad a partir de los chimpancés (97). No obstante, no fue hasta la década de los 80 cuando se evidenció el SIDA (98) y se relacionó el VIH como agente causal del SIDA (99,100). Desde entonces se han contabilizado, a nivel mundial, alrededor de 79,3 millones de afectados y 36,3 millones de fallecidos como consecuencia de la infección (96).

En 2020, la estimación de personas –niños y adultos– con VIH fue de 37,7 millones a nivel mundial y de 150.000 en España, según la ONUSIDA(101),(102). En cuanto a los fallecimientos, como consecuencia de la infección, a nivel mundial se estimaron 680.000 y en España menos de 1.000. Estos datos cobran gran relevancia al tratarse desde una perspectiva histórica, y no de manera aislada o puntual, viéndose, así, la evolución de la epidemia (Figura 15). Por un lado, la tendencia de las personas que viven con VIH –tanto mundialmente como en España– es creciente; aunque este crecimiento lleva siendo moderado durante los últimos 20 años (Figura 15. A-B). Por otro lado, desde el pico máximo de personas fallecidas a causa del VIH, en 2005 y 1995, –en el mundo y en España, respectivamente– la tendencia cada vez es menor tanto mundialmente como en España (Figura 15. C-D).

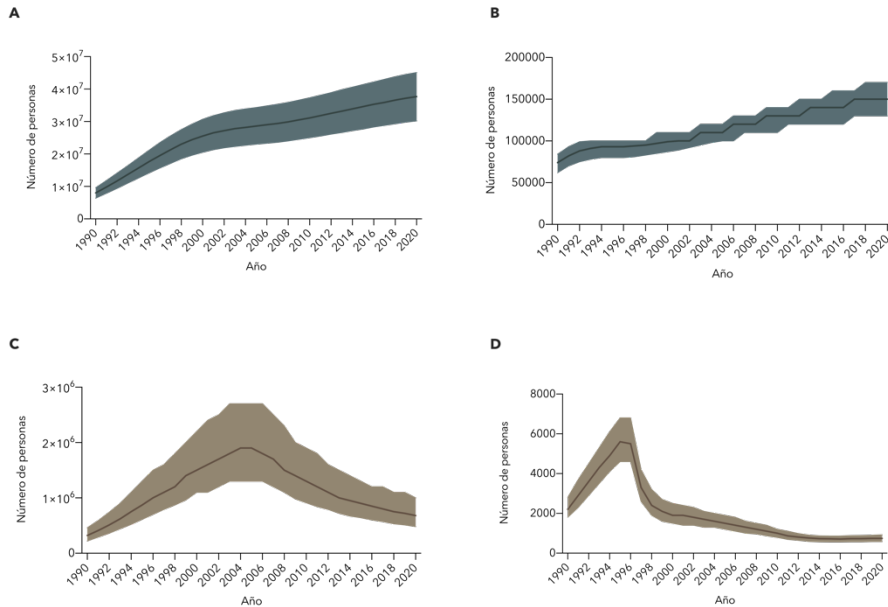


Figura 15. Evolución del número de personas con VIH y fallecidas a consecuencia del VIH durante las tres últimas décadas. A. Personas que viven con VIH (mundo) **B.** Personas que viven con VIH (España) **C.** Personas que han muerto a causa del VIH (mundo) **D.** Personas que han muerto a causa del VIH (España). *Adaptado de ONUSIDA (103).*

La situación del colectivo afectado por el VIH ha mejorado, en las últimas décadas, gracias a la prevención y a los tratamientos. En referencia a la prevención, que es esencial, ha permitido que el número de infecciones nuevas decrezca a lo largo de los años desde el pico alcanzado en 1997 a nivel mundial (Figura 16. A). Concretamente, en 2020, se produjeron 1,5 millones de nuevas infecciones a nivel mundial y 3500 en España. En cuanto al tratamiento, el acceso al mismo cada vez es mayor (Figura 16. C-D), lo cual permite que la esperanza de vida de los infectados sea, a su vez, mayor. Concretamente, en 2020, 27,5 millones de personas tuvieron acceso a la terapia antirretroviral a nivel mundial, mientras que 130.000 en España.

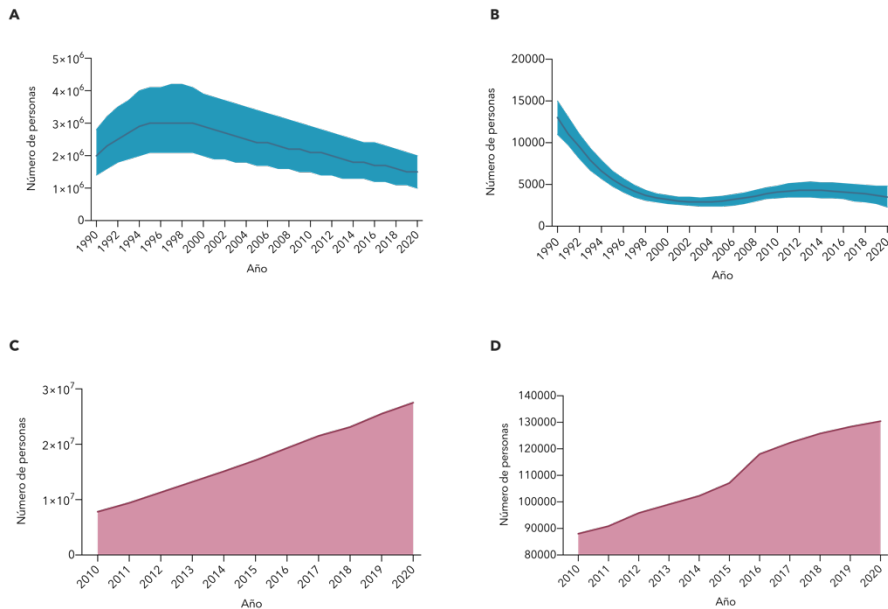


Figura 16. Evolución del número de personas con nueva infección y con acceso al tratamiento. **A.** Personas de nueva infección (mundo) **B.** Personas de nueva infección (España) **C.** Personas con acceso al tratamiento (mundo). **D.** Personas con acceso al tratamiento (España). *Adaptado de ONUSIDA (103).*

Teniendo en cuenta la trayectoria (Figura 15 y Figura 16) de la epidemia, la coyuntura del VIH y del SIDA en términos globales es favorable. La situación actual está relacionada directamente con las medidas profilácticas aplicadas y con el acceso al tratamiento de la enfermedad. Ambos frentes de abordaje contra la epidemia son fundamentales para lograr erradicar la epidemia y para garantizar al colectivo la mejor calidad de vida posible. El acceso al tratamiento permite aumentar la esperanza y la calidad de vida, reduciendo así el número de fallecidos. Esto tiene la implicación directa sobre el número de personas con VIH, aumentándolo. Mientras que las medidas de prevención permiten reducir el número de nuevos contagios. Esto también posee implicación directa sobre el número de personas con VIH.

Pese a que el contexto global es favorable –como se ha comentado previamente–, es imprescindible matizar que existen considerables desigualdades entre países desarrollados y países poco desarrollados. Por ejemplo, más de la mitad del colectivo con VIH se concentra en África Oriental y Meridional. Todavía queda un camino por recorrer para eliminar las desigualdades y el VIH. Recientemente, la ONUSIDA ha adoptado una nueva agenda con objetivos nuevos para 2025 bajo el lema “acabar con las desigualdades y estar en condiciones de poner fin al SIDA para 2030” tras no haber alcanzado los objetivos 2020. Una de las causas por las que no se ha podido alcanzar los objetivos 2020 ha sido la reciente pandemia de COVID-19 que ha agravado e interrumpido la evolución del VIH. Por un lado, tanto los confinamientos como las restricciones establecidas a raíz de la pandemia han interrumpido las pruebas diagnósticas del VIH aproximadamente en un 40%. Por otro lado, la población con VIH tiene el doble de riesgo de morir por COVID-19 respecto a la población general.

Como se ha comentado, anteriormente, ante una epidemia o pandemia es importante destinar los esfuerzos tanto al tratamiento de la enfermedad como a la prevención de esta. La prevención erige el objetivo más ambicioso dado que en última instancia puede llegar a lograrse la erradicación. De este modo, las investigaciones respecto al SIDA no sólo tratan de desarrollar nuevos tratamientos para combatir el VIH, sino que también persiguen la búsqueda de una vacuna frente a esta patología. Hasta la fecha no se ha conseguido una vacuna eficaz debido a la variabilidad genética del VIH como consecuencia de que la enzima transcriptasa inversa viral no cuenta con un mecanismo de comprobación de lectura y, por tanto, la ratio de mutaciones y recombinaciones es elevado. Así, la prevención primaria es imprescindible como medida para combatir eficazmente la enfermedad. Además, el porcentaje de personas diagnosticadas cada vez es mayor, ya que las técnicas empleadas son más sensibles y accesibles a la población.

I.B.3. Terapia antirretroviral

La terapia antirretroviral (TAR) es la que se emplea para el tratamiento de la infección del VIH y del SIDA y cuenta con un amplio abanico de fármacos desarrollados y comercializados que han transformado esta enfermedad terminal en una enfermedad crónica.

El primer fármaco para el VIH aprobado en 1987 por la *Food and Drug Administration* (FDA) fue zidovudina (ZDV o AZT) (104) que es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido. En 1995, se aprobó saquinavir (SQV) que fue el primer inhibidor de proteasa. Un año más tarde, se aprobó nevirapina (NVP), que fue el primer inhibidor de la transcriptasa inversa no-análogo de nucleósido. Sin embargo, fue en 1997 cuando se produjo un gran cambio en la TAR con la aprobación de combivir. Este fármaco está compuesto por la combinación de dos antirretrovirales –ZDV y lamivudina (3TC)– y con él se instauró la terapia antirretroviral combinada (TARc) que consiste en la administración simultánea de dos o tres fármacos antirretrovirales, permitiendo reducir la CVP y recuperar el número de células CD4+. La TARc permanece vigente hoy en día gracias a su eficiencia y a que evita la aparición de resistencias asociadas al tratamiento.

I.B.3.1. Fármacos

Se clasifican en función de la fase del ciclo biológico sobre la que actúan. Actualmente, se distinguen cinco grupos (105): inhibidores de entrada, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/-tidos, inhibidores de la transcriptasa inversa no-análogos de nucleósidos, inhibidores de integrasa e inhibidores de proteasa.

I.B.3.1.1. Inhibidores de entrada

Los inhibidores de entrada (IE) son fármacos antirretrovirales que impiden el acceso del virus a la célula hospedadora. Esta clase de antirretrovirales está formada por fármacos muy diversos químicamente, que se subclasifican en otros grupos - dependiendo del mecanismo que empleen-: inhibidores de fusión, antagonistas del co-receptor CCR5, inhibidores de fijación e inhibidores de post-fijación.

Actualmente, en España, se comercializan tres (Figura 17):

- Maraviroc (MVR o MVC), comercializado como Selzentry®, es un antagonista del co-receptor CCR5 presente en las células hospedadoras (106). Por tanto, bloquea al co-receptor, impidiendo así la penetración del virus en la célula.
- Enfuvirtida (ENF o T-20), comercializado como Fuzeon®, es un inhibidor de fusión que impide la fusión de las membranas, dado que bloquea la gp41 presente en la envoltura del virión (107).⁴
- Ibalizumab (TMB-301 o IBA), comercializado como Trogarzo®, es un inhibidor de post-fijación que se une al segundo dominio extracelular del receptor CD4 de la célula hospedadora, y consecuentemente el virus no se puede unir a los co-receptores CCR5 y CXCR4 (108).

Además de los tres anteriores, recientemente -a principios de 2021-, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha aprobado Fostemsavir (FTR), comercializado como Rukobia®, que es un inhibidor de fijación que se une a la gp120 del virus, imposibilitando la entrada del virus a la célula hospedadora.

⁴ En las guías clínicas de EE. UU. no se recomienda desde 2020.

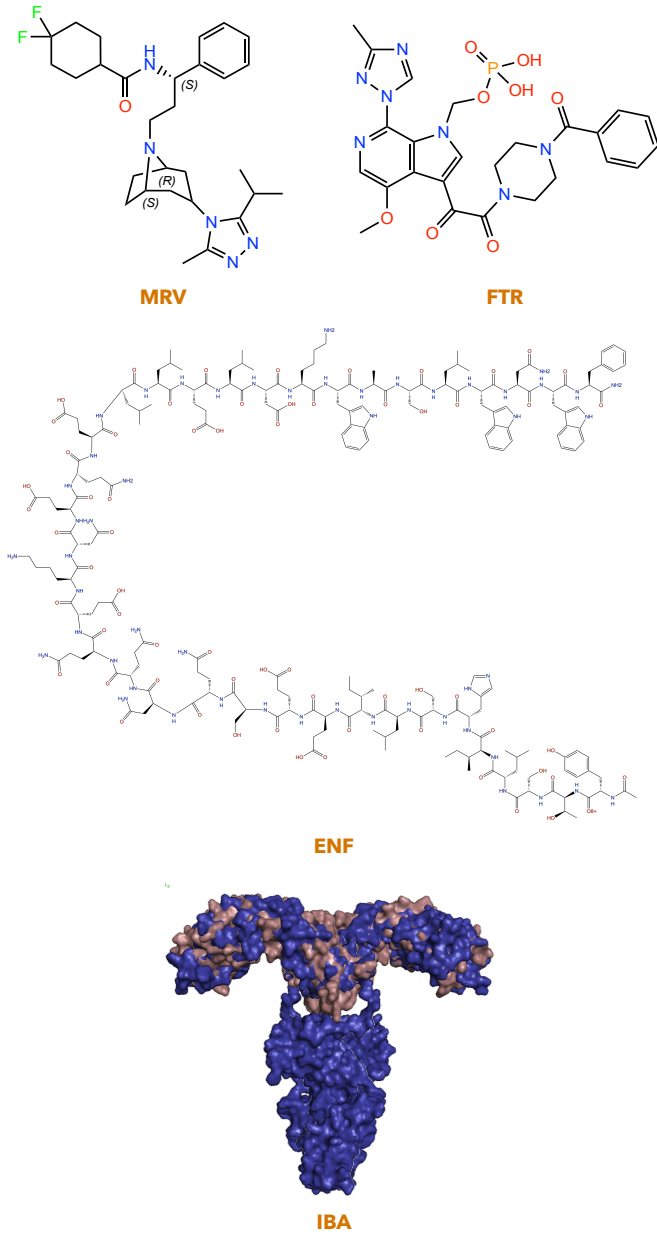


Figura 17. Representación estructural de los inhibidores de entrada.⁵ Maraviroc (MRV), fostemsavir (FTR), enfuvirtida (ENF) e Ibalizumab (IBA).

I.B.3.1.2. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/-tidos

Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/-tidos (ITIAN) son fármacos análogos, o bien de las bases púricas, o bien de las pirimidínicas (

Figura 18) –propias del material genético del ser humano–, que bloquean de manera competitiva a la transcriptasa inversa (TI), evitando así la transformación del ARN viral en ADN viral. Estos análogos difieren en pequeños cambios estructurales –como por ejemplo el déficit del extremo 3'-OH del anillo de ribosa–, respecto a los nucleósidos/-tidos fisiológicos, que impiden la elongación de la cadena de ADN dado que no se puede formar el enlace 3'-5' fosfodiéster entre la cadena y el nucleósido entrante.

En la actualidad, en España, se comercializan seis compuestos activos de tipo inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido y uno de nucleótido. Los ITIAN comercializados como un único principio activo son (

Figura 18):

- ZDV, comercializado como Retrovir®
- 3TC, comercializado como Epivir®
- Emtricitabina (FTC), comercializado como Emtriva®
- Abacavir (ABC), comercializado como Ziagen®
- Estavudina (d4T), comercializado como Zerit®⁶

⁵ Para la representación de Ibalizumab se ha utilizado una representación tridimensional al tratarse de un anticuerpo monoclonal humanizado, resultado esta visualización más conveniente.

⁶ No se recomienda desde 2020, solo en casos donde se produzca el fracaso del tratamiento.

- Didanosina (ddl), comercializado como Videx EC⁷
- Tenofovir (TFV)⁸, comercializado con dos formulaciones diferentes: tenofovir disoproxilo fumarato (TDF, comercializado como Viread[®]) y tenofovir alafenamida (TAF)⁹.

Y en co-formulaciones son:

- TDF + 3TC, comercializado como Cimduo[®] y Temixys[®]
- ZDV + 3TC, comercializado como Combivir[®]
- TAF + FTC, comercializado como Descovy[®]
- ABC + 3TC, comercializado como Epzicom[®]
- TDF + FTC, comercializado como Truvada[®]

Es importante destacar que todo este grupo de fármacos necesita una triple fosforilación intracelular para ser activos, a excepción del TFV que sólo necesita una doble fosforilación (109).

⁷ No se recomienda desde 2020, solo en casos donde se produzca el fracaso del tratamiento.

⁸ TFV es el inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido.

⁹ TAF se comercializa en un tipo de formulación combinada con otros principios activos: FTC + TAF (Descovy[®]); FTC + TAF + BIC (Biktarvy[®]); FTC + TAF + EVG/c (Genvoya[®]); FTC + TAF + RPV (Odefsey[®]); FTC + TAF + DRV/p (Symtuza[®]).

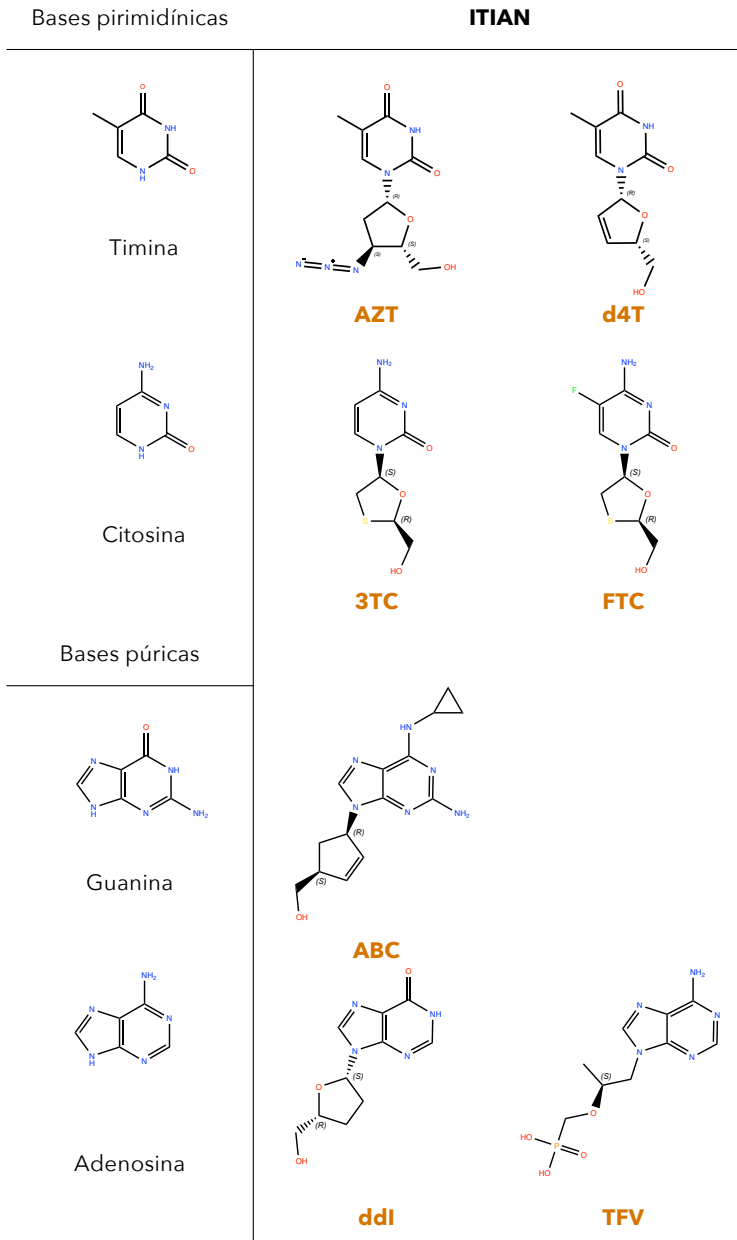


Figura 18. Estructura química de los nucleósidos y de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos. Zidovudina (AZT), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC), abacavir (ABC), didanosina (ddl) y tenofovir (TFV).

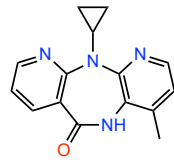
I.B.3.1.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

Los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) al igual que los ITIAN bloquean la TI, pero en esta ocasión de forma no competitiva interaccionando directamente con el centro catalítico de la enzima o con un bolsillo hidrofóbico próximo al mismo. Ello desencadena un cambio conformacional en la transcriptasa inversa, interrumpiendo su actividad ADN polimerasa e inhibiendo la replicación viral (106).

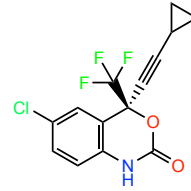
Los ITINN constituyen un grupo de fármacos muy heterogéneo estructuralmente que, a diferencia de los ITIAN, no requieren ser modificados para ser activos y son inductores de algunas isoenzimas del citocromo P450 y, por tanto, pueden interaccionar con otros fármacos metabolizados por esta vía.

Actualmente, en España, se encuentran comercializados cinco ITINN (Figura 19):

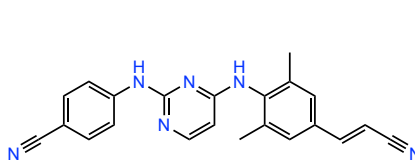
- NVP, comercializado como Viramune®
- Efavirenz (EFV), comercializado como Sustiva®
- Rilpivirina (RPV), comercializado como Edurant®
- Etravirina (ETR), comercializado como Intelence®
- Doravirina (DOR), comercializado como Pifeltro®



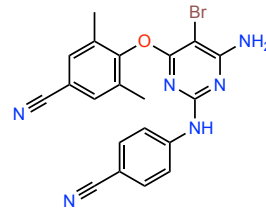
NVP



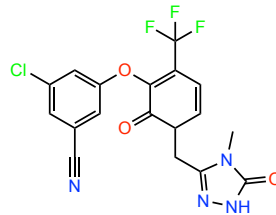
EFV



RPV



ETR



DOR

Figura 19. Estructura química de los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido. Nevirapina (NVP), efavirenz (EFV), rilpivirina (RPV), etravirina (ETR) y doravirina (DOR).

I.B.3.1.4. Inhibidores de la integrasa

Los inhibidores de la integrasa (INI) bloquean la IN viral previniendo la integración del ADN viral en el genoma celular de la célula hospedadora. El grupo está constituido por cuatro fármacos comercializados en España¹⁰ (Figura 20):

- Raltegravir (RAL), comercializado como Isentress®
- Dolutegravir (DTG), comercializado como Tivicay®
- Elvitegravir (EVG), comercializado como Vitekta®
- Bictegravir (BIC), comercializado como Biktarvy®¹¹
-

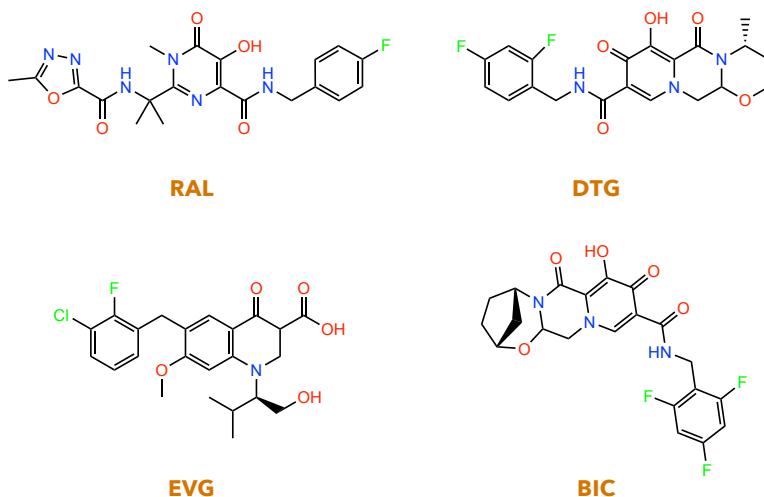


Figura 20. Estructura química de los inhibidores de la integrasa. Raltegravir (RAL), dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG) y bictegravir (BIC).

¹⁰ A finales de 2020, la EMA aprobó Cabotegravir comercializado como Vocabria®.

¹¹ Biktarvy® es una coformulación de BIC + TAF + FTC.

I.B.3.1.5. Inhibidores de la proteasa

Los inhibidores de la proteasa (IP) bloquean la proteasa impidiendo que aparezcan las formas maduras de las proteínas víricas necesarias para el ensamblaje del virión, ya que poseen una alta afinidad por el centro activo de la proteasa. La estructura de estos es similar a la de los péptidos virales (sustrato de la proteasa); no obstante, conforman un grupo muy heterogéneo químicamente.

Los IP son inductores e inhibidores del citocromo P450; por tanto, pueden generar interacciones farmacológicas. Además, en la mayoría de los casos se administran en combinación con un potenciador farmacológico, con el objetivo de administrar una dosis menor del fármaco, ya que alarga la semivida en plasma de este. Los potenciadores son Cobicistat (COBI; comercializado como Tybost®) –representado por IP/c- o Ritonavir (RTV; comercializado como Norvir®) –representado por IP/r- (Figura 21).

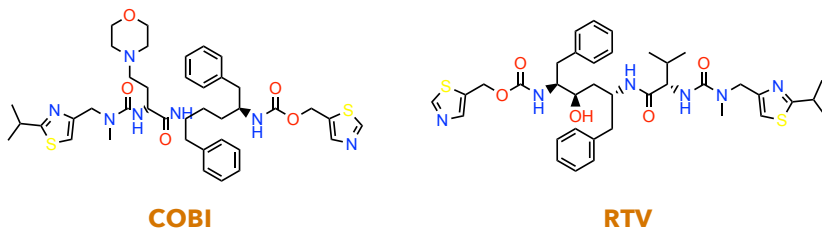


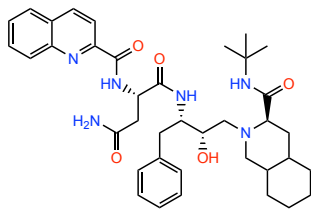
Figura 21. Estructura química de los potenciadores. Cobicistat (COBI) y ritonavir (RTV).

Actualmente, en España, hay seis IP comercializados (Figura 22):

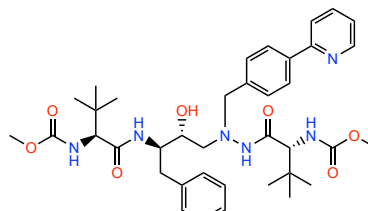
- SQV, comercializado como Invirase®
- Atazanavir (ATV), comercializado como Reyataz®
- Darunavir (DRV), comercializado como Prezista®
- Lopinavir (LPV), comercializado potenciado como Kaletra® (LPV/r)
- Fosamprenavir (FPV), comercializado como Lexiva®
- Tripanavir (TPV), comercializado como Aptivus®

También, se comercializan lo siguientes IP/p:

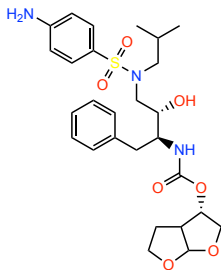
- ATV/c, comercializado como Evotaz®
- LPV/r, comercializado como Kaletra®
- DRV/c, comercializado como Prezcobix®



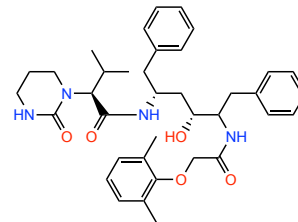
SQV



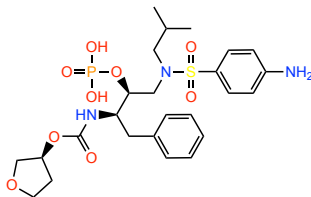
ATV



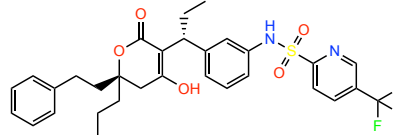
DRV



LPV



FPV



TPV

Figura 22. Estructura química de los inhibidores de la proteasa. Saquinavir (SQV), atazanavir (ATV), darunavir (DRV), lopinavir (LPV), fosamprenavir (FPV) y tripanavir (TPV).

I.B.3.2. Pautas posológicas

La valoración individualizada del y de la paciente es fundamental para determinar tanto el inicio de la TARc como los fármacos que constituirán su pauta posológica, sopesando tanto las ventajas como los inconvenientes de las diferentes opciones. No obstante, en el documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos Infeccionados por el VIH (2020) (110) se indica que la TARc se ha de iniciar independientemente al número linfocitos T CD4+ y lo antes posible tras el diagnóstico para, así, garantizar la reducción de la morbilidad y de la mortalidad asociadas a la infección por el VIH, la recuperación y la preservación de la función inmunológica, evitando así el efecto nocivo de la multiplicación del virus sobre posibles comorbilidades coexistentes, y la disminución de la transmisión del propio virus. Asimismo, en el documento se recogen las pautas recomendadas de inicio que se agrupan en preferentes y en alternativas (Tabla 3), y están constituidas por la combinación de tres fármacos principalmente, excepto una por dos fármacos (111).

Por un lado, las pautas preferentes se aplican a la mayoría de los y las pacientes debido a que clínicamente se ha demostrado la eficacia de estas y, a que presentan ventajas adicionales de tolerancia, menor toxicidad o un bajo riesgo de interacciones farmacológicas. Por otro lado, las pautas alternativas se aplican en situaciones especiales y a subgrupos de pacientes, a pesar de tener una eficacia menor y de presentar restricciones en su indicación o desventajas potenciales. No obstante, ambos tipos logran una CVP inferior a 50 copias/mL en más del 85% de los casos tras 48 semanas de tratamiento.

Tabla 3. Combinaciones recomendables para el inicio de la TARc.¹²

Pautas preferentes				
ITIAN	ITIAN	INI	Nombre comercial	Posología
FTC	TAF	BIC	Biktarvy®	QD: 200/25/50 mg
FTC	TAF	RAL	Descovy® + Isentress®	QD: 200/25 mg + BID: 600 mg
FTC	TAF	DTG	Descovy® + Tivicay®	QD: 200/25 mg + QD: 50 mg
3TC	ABC	DTG	Triumeq®	QD: 300/600/50 mg
3TC		DTG	Dovato®	QD: 300/50 mg
Pautas alternativas				
ITIAN	ITIAN	INI	Nombre comercial	Posología
FTC	TAF	EVG/c	Genvoya®	QD: 200/10/150/150 mg
ITIAN	ITIAN	IP/p	Nombre comercial	Posología
FTC	TAF	DRV/c o DRV/r	Symtuza®	QD: 200/10/800/150 mg
ITIAN	ITIAN	ITINN	Nombre comercial	Posología
FTC	TAF	DOR	Descovy® + Pifeltro®	QD: 200/25 mg + QD: 100 mg
FTC	TAF	RPV	Odefsey®	QD: 200/25/25 mg

* 3TC: lamivudina; ABC: abacavir; BIC: bictegravir ; DOR: doravirina ; DRV/c: darunavir + cobicistat ; DRV/r: darunavir + ritonavir ; DTG: dolutegravir ; EVG/c: elvitegravir + cobicistat ; FTC: emtricitabina; RAL: raltegravir ; TAF: tenofovir)

En la **Tabla 3** se aprecia que todas las pautas preferentes triples están constituidas por dos ITIAN –que pueden ser, o bien FTC + TAF, o bien 3TC + ABC– y un INI; mientras que las pautas alternativas triples por dos ITIAN, también, pero pudiendo ser un INI, un ITINN, o un IP el tercer fármaco.

¹² QD: una dosis diaria, BID: dos dosis diarias.

Pese a que las pautas recomendadas son directrices generales es esencial resaltar que algunos de los fármacos de las pautas presentan particularidades muy específicas como por ejemplo ABC que está contraindicado en pacientes con HLA-B*57:01*¹³ o DTG que no se recomienda ni para mujeres en edad fértil ni embarazadas. En la misma línea, las pautas descritas previamente no son válidas en ciertos contextos -como por ejemplo pacientes con tuberculosis (TB)- e incluso pueden llegar a fracasar. Por ende, se establece un régimen diferente o se efectúa un cambio de régimen a otro. Estos nuevos regímenes pueden ser pautas de tres fármacos o menos. En el caso de la terapia dual o monoterapia se ha de tener en cuenta que la eficacia es menor y que rápidamente aparecen resistencias; es por lo que suelen estar contraindicadas en un primer momento.

I.B.3.3. Abacavir

I.B.3.3.1. Generalidades

ABC químicamente es un ITIAN análogo de la base púrica guanina, y por ende su diana farmacológica es la TI vírica. Se trata de un profármaco que debe metabolizarse intracelularmente a Carbovir 5'-trifosfato (CBV-TP), metabolito activo (Figura 23).

La posología recomendada en una persona adulta es de 600 mg diarios, pudiéndose tomar en una única toma o en dos tomas de 300 mg.

¹³ Véase el apartado *I.B.3.3.4.Farmacogenética*.

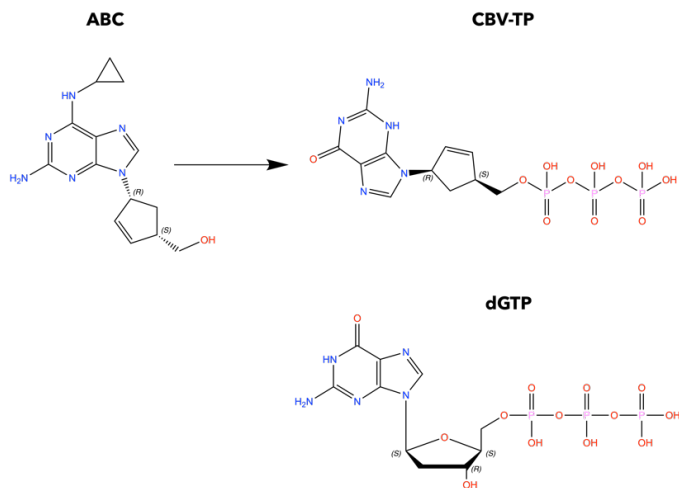


Figura 23. Estructura química de ABC , CBV-TP y dGTP. Abavavir (ABC) se transforma a su forma activa llamada carbovir trifosfato (CBV-TP). El CBV-TP es prácticamente igual al trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), nucleótido endógeno. La ausencia del grupo 3'-OH en el anillo de desoxirribosa de CBV-TP impide la adición de nuevos nucleótidos.

I.B.3.3.2. Farmacocinética

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el curso temporal de la concentración de los fármacos en el organismo con el fin de conocer las concentraciones del fármaco en el lugar de acción y, por lo tanto, su efectividad. Depende de cinco procesos que sufre el fármaco como consecuencia de su paso por el organismo: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción. El conjunto de estos procesos es conocido por el acrónimo LADME.

Cada uno de estos procesos se ve influenciado por las propiedades físico-químicas del fármaco. ABC, cuyo peso molecular 286,33 g/mol, es un compuesto lipófilo (77 mg/mL en sal de sulfato) que además, también, muestra una alta solubilidad en agua (77 mg/L en agua a 25°C) (112) y puede atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva (113). Estas propiedades son responsables de la alta

biodisponibilidad de entorno al 83% tras absorberse (114,115). Todo ello facilita que pueda acceder a diferentes tejidos, incluido el paso al sistema nervioso central (SNC) a través de la barrera hematoencefálica (115). Otros parámetros propios del perfil farmacocinético son la concentración plasmática máxima (C_{max}), el tiempo necesario para alcanzar la C_{max} (T_{max}) y el área bajo la curva (AUC). Para la administración de una dosis única diaria de 600 mg se ha determinado una C_{max} de 4,10-5,45 mg/mL y un T_{max} de 0,63-1 horas (116,117); mientras que para una pauta de tres dosis orales diarias de 400 mg, se ha determinado una C_{max} de 3,3 mg/L, un T_{max} de 0,7-1,7 horas, y un AUC de 7,1 mg/L·h (118).

En cuanto al volumen de distribución está entorno a 0,86 L/kg tras una administración intravenosa. Este valor sugiere que se distribuye en los espacios extravasculares. Asimismo, el 50% de ABC se une a proteínas plasmáticas de manera independiente de la concentración.

Tras ser absorbido, se metaboliza principalmente (>98%) en el hígado por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH) y uridina difosfato glucoroniltransferasa (UGT) presentes en los hepatocitos. La primera da lugar a un metabolito carboxilado inactivo (2269W93) y la segunda a un metabolito glucorinado (361Q94), también inactivo (Figura 24). Posteriormente, estos metabolitos –mayoritarios– junto con los minoritarios son excretados mediante la orina y heces (119). En relación a la excreción del ABC su vida media como fármaco está entorno a 0,8-1,5 horas (118), mientras que como metabolito activo de 12-26 horas.

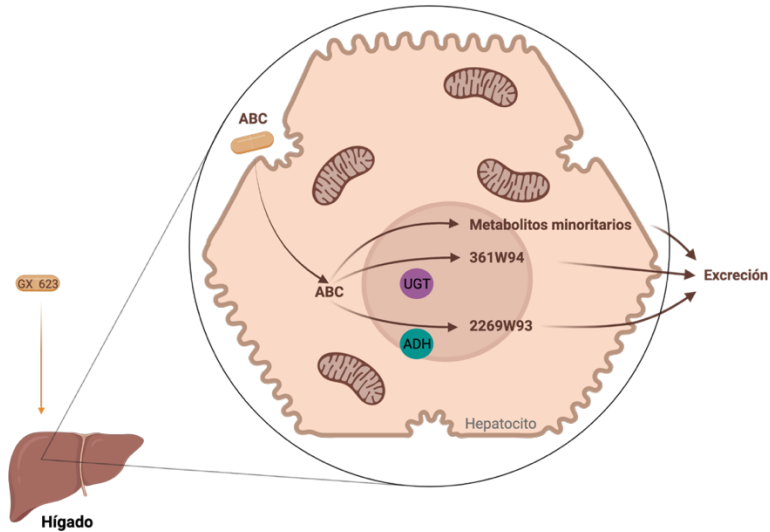


Figura 24. Representación farmacocinética de ABC en el hepatocito. En el interior del hepatocito el ABC es metabolizado, bien por la enzima UGT (uridina difosfato glucuroniltransferasa) que da lugar a un metabolito glucoronado (361W94), o bien por la enzima ADH (alcohol deshidrogenasa citosólica) que produce un metabolito carboxilado (2269W93). Ambos son inactivos y junto con el resto de metabolitos minoritarios se eliminan a través de la orina y las heces.

Alrededor del 2% de ABC que no ha sido metabolizado en los hepatocitos llega al interior de los linfocitos donde se transforma en la forma farmacológicamente activa a través de una serie de procesos anabólicos (Figura 25) (113).

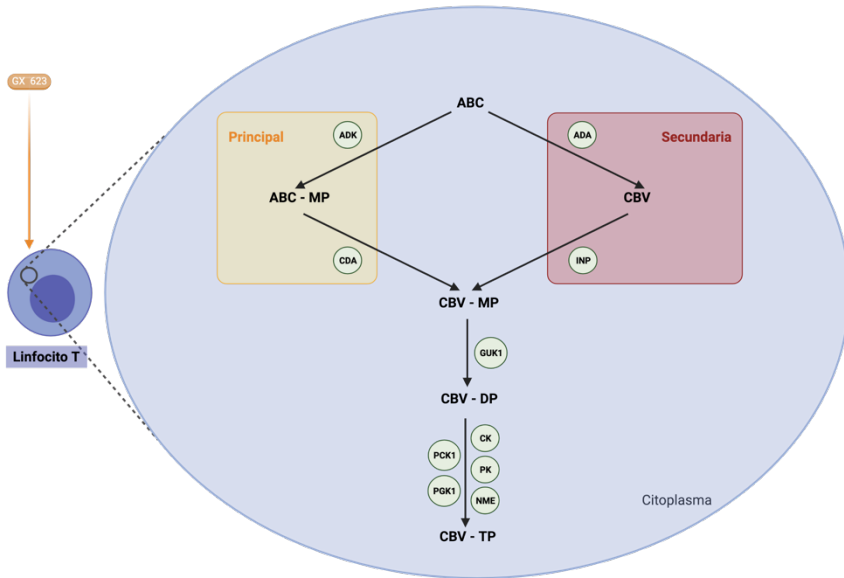


Figura 25. Representación farmacocinética de ABC en el linfocito T. El ABC que llega al linfocito T se puede metabolizar hasta CBV-TP por dos rutas: principal y secundaria. Ruta primaria: primero el ABC se convierte en ABC 5'-monofosfato por acción de la enzima adenosina fosfotransferasa (ADK). Después es sometido a un proceso de desanimación por una desaminasa de citidina (CDA), dando lugar a (-)-carbovir 5'-monofosfato (CBV-MP). Seguidamente la enzima guanilato quinasa (GUK1) añade otro fosfato y como resultado se obtiene el (-)-carbovir 5'-difosfato (CBV-DP). Finalmente, este se convierte en (-)-carbovir 5'-trifosfato (CBV-TP) gracias a la acción de cinco enzimas tipo quinasa (creatín quinasa (CK), piruvato quinasa (PK), nucleósido difosfato quinasa (NME), fosfoglicerato quinasa (PGK1) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK1)) (120). Ruta secundaria (o minoritaria): el ABC se transforma primero en carbovir (CBV) por acción de la desaminasa de adenosina (ADA) y luego la enzima inosina fosfotransferasa (INP) lo transforma en carbovir 5'-monofosfato (121). Posteriormente, se transforma como en la ruta principal.

I.B.3.3.3. Farmacodinámica

La farmacodinamia evalúa los mecanismos de acción de los fármacos y los efectos bioquímicos y fisiológicos que estos producen en el organismo. Desde esta perspectiva CBV-TP, que es el metabolito activo de ABC, inhibe la correcta transcripción inversa del virus. CBV-TP actúa como un análogo de guanosina y por tanto, compete con los nucleótidos endógenos durante la elongación la cadena de nucleótidos que configuraran la cadena de ADN producida por la acción de la enzima TI a partir del ARN viral (122). Después de la inserción del CBV-TP, se paraliza la síntesis del ADN viral ya que la falta de un grupo hidroxilo en la posición 3 (3'-OH) del anillo del azúcar desoxirribosa previene la adición de otros nucleótidos (120).

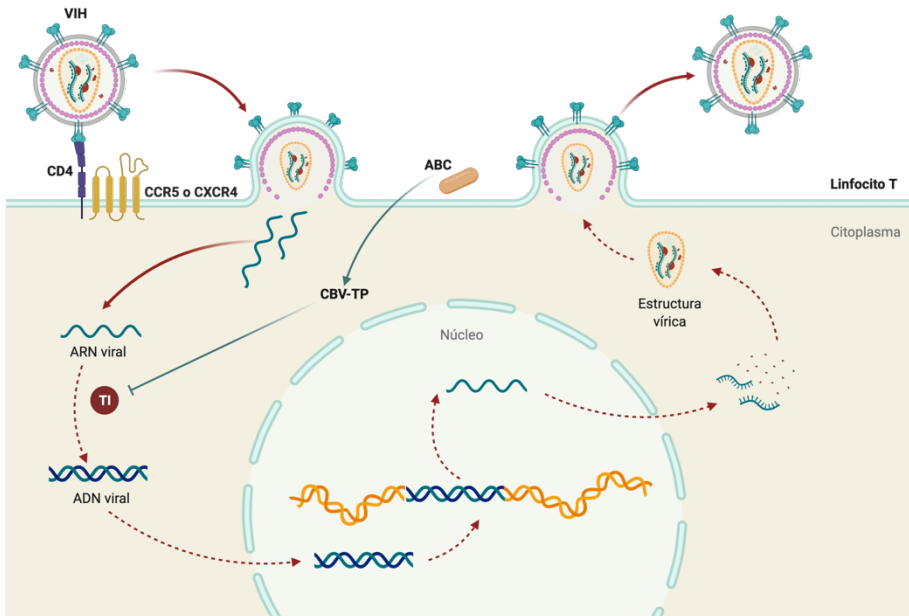


Figura 26. Representación farmacodinámica de ABC Y CBV-TP. El ABC es absorbido por el linfocito T que rápidamente lo transforma en CBV-TP. Este que es análogo a la dGTP (trifosfato de desoxiguanosina) inhibe la TI, bloqueando la conversión del ARN viral a ADN viral durante el ciclo biológico del VIH. como consecuencia el resto del ciclo se ve paralizado (líneas discontinuas).

I.B.3.3.4.Farmacogenética

La farmacogenética es la rama de la farmacología que se encarga de estudiar como la variabilidad genética de un individuo afecta en la respuesta que produce el fármaco. En el caso de ABC se ha observado que los y las pacientes con la variante alélica *57:01 del gen HLA-B (antígeno leucocitario humano B) desarrollan reacciones de hipersensibilidad (HSR, por sus siglas en inglés) con mayor frecuencia respecto a los y las pacientes sin esa variante alélica. La HSR se caracteriza por presentar al menos dos de los siguientes signos: fiebre, erupciones, síntomas gastrointestinales, disnea, mialgias, dolor osteomuscular, cefalea, etc. (123). El gen HLA-B codifica a su proteína epónima, la cual forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-1)¹⁴ (124).

Pese a que el mecanismo no está esclarecido, las evidencias más recientes (125,126) apoyan que ABC puede unirse de manera no covalente y con especificidad al bolsillo F del surco de unión del CMH-1 en los individuos que presentan dicha variación alélica. Esto provoca un cambio conformacional y como consecuencia los péptidos son detectados como exógenos y estimulan una respuesta masiva de los linfocitos T CD8+, dando lugar a la hipersensibilidad.

Además, estudios recientes también relacionan el gen HSP70-HOM perteneciente a la familia de genes de las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) como factor riesgo de la HSR. En esta ocasión, los individuos con la variación alélica HSP70-HOM 493T codifican a una proteína que de algún modo facilita la presentación de ABC a los linfocitos T CD8+(127).

¹⁴ El CMH-1 participa en la presentación de péptidos endógenos a las células inmunitarias y se expresa en la superficie de todas las células nucleadas.

I.B.3.4. Efectos adversos e interacciones de la terapia

Cualquier tratamiento *per se* presenta cierto potencial riesgo a desencadenar efectos secundarios. Este riesgo puede ser mayor o menor en función de la composición del fármaco (principio activo y excipientes). Asimismo, estos efectos adversos pueden desarrollarse a corto o a largo plazo. En el caso de la TARc -que se introdujo de manera rápida debido a la gravedad de la enfermedad para que los pacientes no murieran-, se han manifestado tanto efectos adversos a corto como a largo plazo debido a que se ha consolidado como tratamiento crónico al no conseguir erradicar el genoma viral de los tejidos reservorio.

Concretamente, los efectos a corto plazo se manifiestan de forma transitoria y consisten, principalmente, en alteraciones cutáneas y ungueales, trastornos gastrointestinales, e incluso problemas neuropsiquiátricos (128). Estos se pueden tratar valorando la tolerabilidad y la adherencia del o de la paciente. Mientras que a largo plazo se pueden presentar alteraciones metabólicas, anomalías en la distribución de la grasa corporal y lipodistrofia, daño mitocondrial, nefrotoxicidad e insuficiencia renal, osteopenia, osteoporosis y necrosis ósea aséptica (128). Estos son más difíciles de prever y controlar -a diferencia de los de corto plazo o inmediatos- debido a que pueden pasar desapercibidos al considerarse como signos asociados al envejecimiento o a otras enfermedades crónicas.

Independientemente del lapso de tiempo en que aparecen los efectos adversos, estos pueden ser comunes de un grupo farmacológico o particulares de un fármaco (Tabla 4). La asociación fármaco-efecto adverso es crucial y es posible gracias a los sistemas de farmacovigilancia que registran estos episodios.

En cuanto a las interacciones farmacológicas de la TARc, los ITINN, los INI y los IP son los grupos farmacológicos que mayores interacciones implican debido a su metabolización. Esta se produce vía citocromo (CYP), pudiendo actuar como inductores o inhibidores de las rutas causando así interacciones con otros fármacos. Principalmente interaccionan con corticoides, antipsicóticos, antiagregantes plaquetarios, antifúngicos imidazólicos, procinéticos y estatinas.

Tabla 4. Efectos adversos descritos de la TARc.

	IE				ITIAN						ITINN					INI					IP/p		
	ENF	MVC	IBA	FTR	ZDV	ABC	FTC	3TC	TAF	TDF	DOR	EFV	ETR	NVP	RPV	BIC	CAB	DTG	EVG	RAL	ATV	DRV/c	LPV/r
Acidosis láctica					+																		
Aumento de peso									+		+					+	+	+	+	+			
Colelitiasis																							+
Daños gastrointestinales					+											+			+	+		+	+
Diabetes mellitus y resistencia a la insulina					+																		+
Dislipidemia					+	+			+		+								+		+	+	+
Disminución de densidad ósea									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erupción e hiperpigmentación		+	+	+			+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hepatotoxicidad		+		+	+						+		+	+		+	+	+			+	+	+
Lipodistrofia					+						+									+	+	+	+
Miopatía y aumento creatina fosfoquinasa					+													+		+			
Nefrotoxicidad		+	+						+	+	+		+	+		+		+			+		+
Reacción de hipersensibilidad	+	+	+			+							+	+				+		+			
Reacción en el lugar de inyección	+													+		+							
Riesgo cardiovascular				+		+					+				+						+	+	+
Síndrome de Stevens-Johnson													+	+						+	+	+	+
Supresión de la médula ósea					+																		
Toxicidad en SNC	+	+	+	+					+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+

Enfuvirtida (ENF), maraviroc (MVC), ibalizumab (IBA), fostemsavir (FTR), zidovudina (ZDV), abacavir (ABC), emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC), tenofovir alafenamida (TAF), tenofovir disoproxil fumarato (TDF), doravirina (DOR), efavirenz (EFV), etravirina (ETR), nevirapina (NVP), rilpivirina (RPV), bicitegravir (BIC), cabotegravir (CAB), dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG), raltegravir (RAL), atazanavir (AZT), darunavir + cobicistat (DRV/c) y lopinavir + ritonavir (LPV/r).

En resumen, existe un amplio abanico de efectos adversos y de interacciones farmacológicas asociados a la TARc. Como consecuencia, las metas actuales de la farmacología anti-VIH son principalmente dos: la primera es buscar las combinaciones de fármacos más eficaces contra la infección de VIH y la segunda investigar los mecanismos toxicológicos de esta terapia con el fin de minimizar las comorbilidades asociadas a su administración.

I.B.4. Comorbilidades cardiovasculares

I.B.4.1. Comorbilidad cardiovascular en pacientes con VIH

Pese a la disminución de la mortalidad asociada al VIH gracias a la TARc, se ha descrito que estos pacientes presentan un incremento en el riesgo de sufrir ECV (129). Por ello, tanto el propio VIH como la TARc podrían ser responsables del desarrollo de la comorbilidad, al igual que cualquier otro factor asociado como los hábitos de alimentación y de ejercicio físico. Incluso el aumento en la esperanza de vida de estos pacientes.

En lo referente al VIH, este produce la destrucción del tejido epitelial – especialmente la del intestino–. Esta destrucción provoca un desequilibrio de la composición del microbiota intestinal (disbiosis) y la movilización de los lipopolisacáridos (LPS) presente en la pared celular de las bacterias Gram negativas a la circulación. Los LPS se unen al CD14 presente tanto en monocitos como macrófagos. El complejo LPS/CD14 activa los receptores tipo Toll 4 (TLR4, por sus siglas en inglés), induciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias que favorecen un estado inflamatorio crónico. La inflamación sostenida afecta también al tejido linfóide a través del TFG- β que estimula la producción de colágeno que

reemplazará la red de fibroblastos, modificando así la función y estructura del tejido linfoide. Asimismo, el complejo, LPS/CD14, activa la cascada de coagulación mediante el aumento de factores procoagulantes. Todo este escenario desencadena en la DE que finalmente da lugar al desarrollo de diferentes comorbilidades CV como son el síndrome metabólico (MetS) y las ECV (130).

Profundizando en las comorbilidades de ECV, los y las pacientes con VIH presentan un mayor riesgo a padecer MI, infarto cerebrovascular isquémico, enfermedad prematura de arterias coronarias etc. (131)

En cuanto a la TARc, dado que los tratamientos involucran dos o tres fármacos es difícil definir cual o cuales están implicados en el desarrollo de comorbilidades asociadas a su toxicidad. Por ello, existe un especial interés en conocer los posibles mecanismos por los que los fármacos pudieran estar causando el desarrollo de ECV.

I.B.4.2. Toxicidad cardiovascular y abacavir

Con el fin de reducir el riesgo CV en los pacientes con VIH es necesario prestar atención al estilo de vida y al perfil lipídico. En lo que respecta al perfil lipídico, es importante evaluarlo cada cierto tiempo con el fin de determinar si es necesario un cambio de régimen, dado que el tratamiento tiene un efecto sobre él. Generalmente, los pacientes con VIH presentan tanto dislipidemia como una redistribución de la grasa corporal.

Inicialmente, la toxicidad cardiovascular se asoció con los IP, ya que producen lipodistrofia e hiperlipidemia (132). Posteriormente, se relacionó la dislipidemia con algunos ITIAN como d4T, ZDV y ABC, y con el ITINN, EFV (133-135). Recientemente,

el grupo D:A:D (del inglés “*Data Collection on Adverse events of Anti-HIV Drugs Study Group*”) señaló –en su estudio prospectivo multicohorte presentado en el CROI 2017 (“*Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*”)– a DRV como factor para el desarrollo de eventos CV (136).

En cuanto a ABC, la primera evidencia de la asociación como riesgo de ECV apareció en 2005 en un informe del Programa de Vigilancia Farmacéutica Internacional emitido por la OMS (137). En 2008, el estudio D:A:D reafirmó las bases para la vinculación entre la terapia con ABC y el mayor riesgo de sufrir MI (138). Asimismo, estudios posteriores del mismo grupo (D:A:D) resaltan que ABC puede ser un factor riesgo en aquellos pacientes con VIH que presenten otros riesgos CV preexistentes (139). Sin embargo, otros estudios concluyen que no hay relación alguna entre el uso de ABC y la aparición del MI (140-142). Por tanto, sobre el uso de ABC ha existido una gran controversia en relación con el riesgo de ECV, encontrando numerosos estudios que apoyan esta asociación y otros que la refutan (143). Esta controversia prevalece debido a que el mecanismo de acción por el cual ABC pudiera estar favoreciendo la aparición de complicaciones CV no es conocido. Hasta el momento se han propuesto diversos mecanismos. Uno de ellos sugiere que el riesgo CV de ABC se debe a un proceso rápido de inflamación vascular inducido, ya que tras la interrupción del tratamiento el riesgo de desarrollar MI disminuye (138). Otro relaciona ABC con una regulación negativa de la enzima eNOS, estimulando la producción de ROS en las CE; ambos escenarios pueden dar lugar a la DE y a la acumulación leucocitaria (144). Por último, otro mecanismo planteado se fundamenta en la inhibición de la guanilil ciclasa en plaquetas, provocando un incremento de la expresión de P-selecina (145).

Nuestro grupo de investigación ha estudiado, tanto *in vitro* como *in vivo*, el efecto de ABC y otros ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio, uno de los primeros

procesos desencadenados durante la inflamación. Se ha demostrado que ABC y ddi –ambos ITIAN análogos de purinas–, pero no los ITIAN análogos de pirimidina y los análogos de nucleótido analizados –FTC, 3TC, ZDV y TDF–, inducen interacciones leucocito-endotelio, tanto *in vitro* –utilizando leucocitos polimorfonucleares (PMN) y células endoteliales de venas de cordón umbilical (HUVEC) (146)– como *in vivo* –en venas y arterias de mesenterios de ratas (147)– (Figura 27)(148).

También, se determinó que el efecto producido por ABC sobre la interacción leucocito-endotelio se debe a la interacción de las moléculas de adhesión, ICAM-1 endotelial con Mac-1 (CD11b/CD18) leucocitaria, ya que el efecto de ABC se revierte con anticuerpos frente a esas moléculas (146). También, se demostró *in vitro* que el efecto de ABC sobre la acumulación vascular de leucocitos está mediado por el receptor P2X₇, ya que el efecto de ABC fue abolido en presencia de antagonistas específicos de este receptor (oxATP y BGG) (Figura 28). Asimismo, es dependiente de ATP al ser revertido el efecto por apirasa, compuesto que hidroliza el ATP (Figura 28).

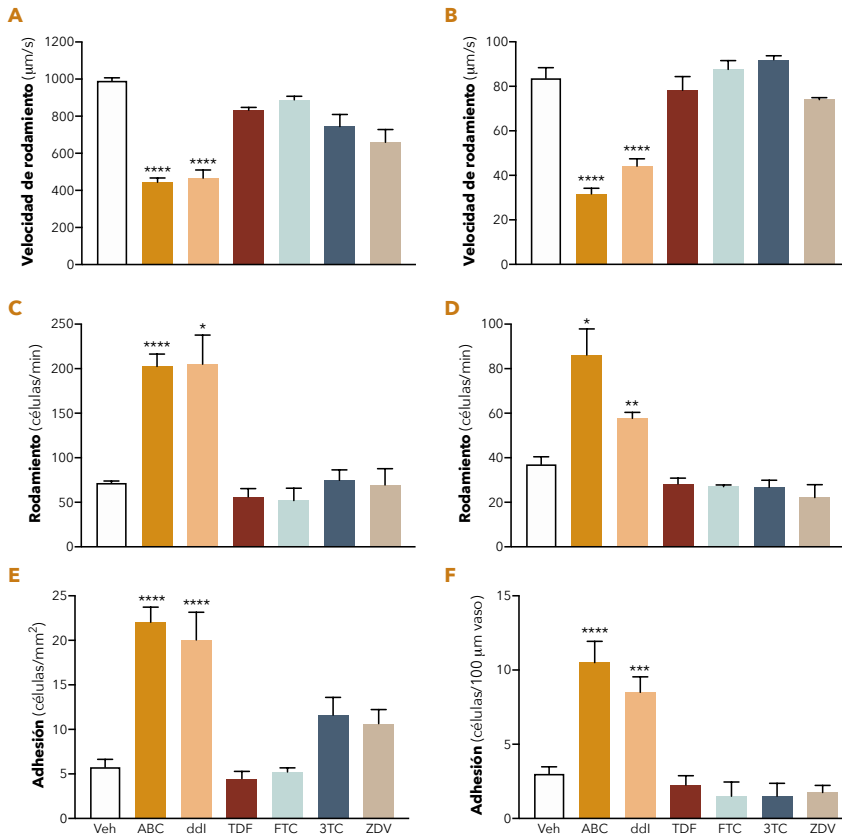


Figura 27. Interacción leucocito-endothelium inducida por ABC y otros ITIAN tanto *in vitro* (A, C y D) como *in vivo* (B, D y F). La figura muestra la velocidad de rodamiento (A-B), el rodamiento (C-D) y la adhesión (E-F) inducida por los antirretrovirales. Adaptado de la Tesis doctoral titula "Efectos proinflamatorios de los fármacos antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido *in vitro* e *in vivo*" defendida por Carmen de Pablo Bernal en 2013.

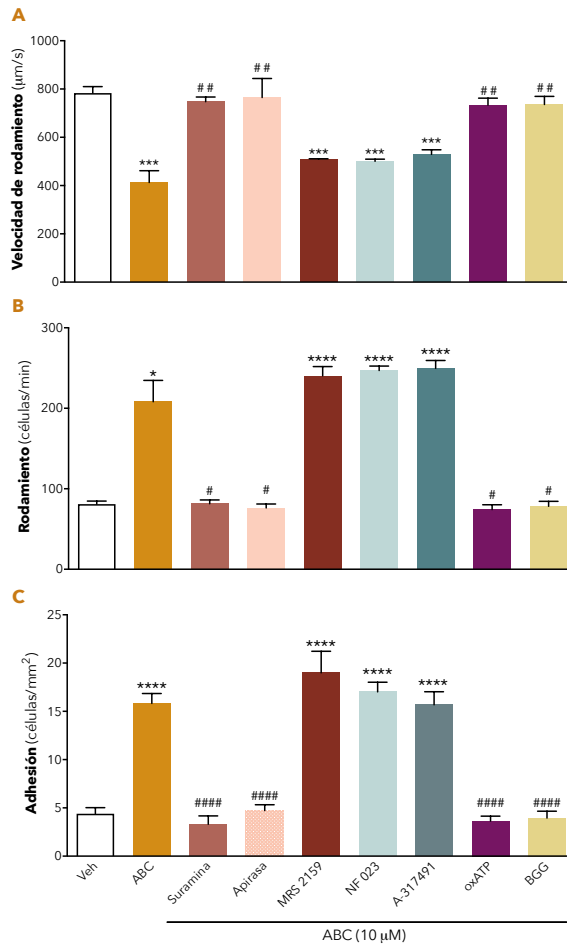


Figura 28. Análisis de la implicación de los receptores P2X-Y en los efectos de ABC sobre la interacción PMN-endotelio *in vitro*. La figura muestra la velocidad (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de los PMN sobre el endotelio inducida por ABC en presencia de distintos antagonistas de los receptores purinérgicos o compuestos que participan en la señalización purinérgica: suramina (Antagonista inespecífico de los receptores P2X-Y), apirasa (hidrolasa de ATP), MRS2159 (Antagonista específico del receptor P2X1), A-317491 (Antagonista específico de los receptores P2X2/3), NF023 (Antagonista específico del receptor P2X1-4), y oxATP y BBG (Antagonistas específicos del receptor P2X₇). Adaptado de la Tesis doctoral titula “Efectos proinflamatorios de los fármacos antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido *in vitro* e *in vivo*” defendida por Carmen de Pablo Bernal en 2013.

Debido a estos resultados obtenidos previamente, cobra especial importancia el estudio de los efectos de ABC sobre la función plaquetaria analizando su efecto sobre la reactividad plaquetaria (activación y agregación) y sobre la adhesión plaquetaria a otras células vasculares –concretamente a las endoteliales y a los leucocitos–, procesos fundamentales durante la trombogénesis (Figura 29) (149).

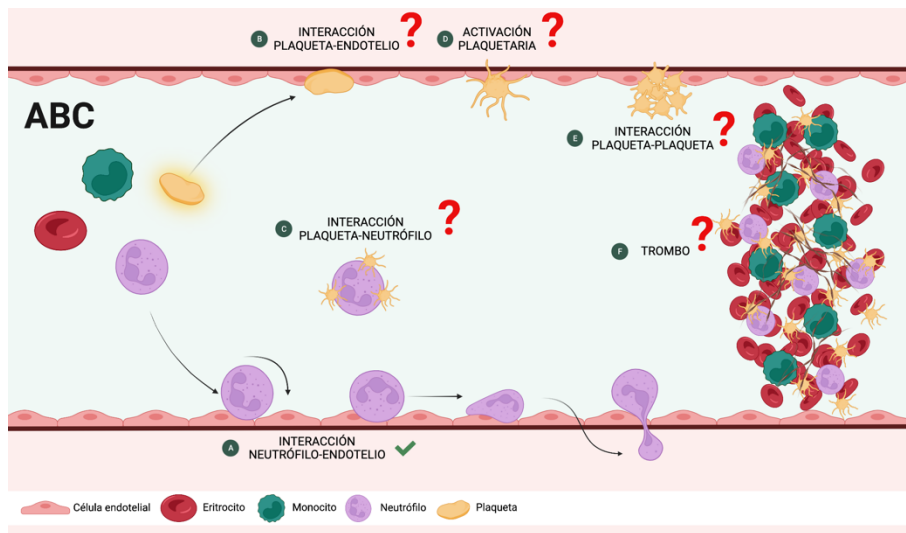


Figura 29. Esquema representativo de las posibles acciones de ABC a nivel vascular. En la figura se muestra que ABC tiene un efecto sobre la interacción neutrófilo-endotelio; no obstante, se desconoce el efecto de ABC sobre la plaqueta y la trombogénesis.

II

OBJETIVOS



El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue caracterizar los efectos protrombóticos de ABC y de otros fármacos antirretrovirales, y caracterizar los mecanismos que los producen. Es decir, estudiar la acción de estos fármacos sobre diversos parámetros trombóticos tanto *in vitro* e *in vivo*.

En particular, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos inducidos por ABC y por otros fármacos antirretrovirales sobre las distintas fases implicadas en la trombogénesis *in vitro* [interacción plaqueta-endotelio, interacción plaqueta-leucocito, interacción plaqueta-plaqueta y activación plaquetaria (P-selectina y GPIIb/IIIa)].
2. Estudiar los posibles mecanismos por los que ABC induce los fenómenos protrombóticos *in vitro* –concretamente la interacción plaqueta-endotelio y la interacción plaqueta-leucocito– analizando el tipo celular implicado, las moléculas de adhesión responsables y los receptores purinérgicos involucrados en dichas respuestas.
3. Examinar el efecto protrombótico de ABC y de otros fármacos antirretrovirales en un modelo murino de trombosis.
4. Explorar los posibles mecanismos por los que ABC favorece la generación del trombo *in vivo*, analizando el papel del leucocito y de los receptores purinérgicos en esta respuesta.
5. Analizar el efecto de ABC en un modelo de aterosclerosis *in vivo*.

III

MATERIAL Y MÉTODOS



III.A. MATERIAL

III.A.1. Muestras biológicas

Una muestra biológica es cualquier material biológico de origen humano que alberga información genética y es susceptible de conservación. En la presente Tesis Doctoral se emplearon muestras humanas de cordones umbilicales y de sangre.

Los cordones umbilicales humanos frescos procedentes de donantes sanos (Hospital Clínico Universitario de Valencia) se destinaron para la obtención de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC, por sus siglas en inglés).

Las muestras sanguíneas utilizadas provenían de donantes sanos (Centro de Transfusiones de la Comunitat Valenciana) y se recogieron en tubos de citrato sódico como anticoagulante. Los donantes sanos debían ser mayores de edad y no haber tomado medicación durante las dos semanas previas.

III.A.2. Animales

El modelo *in vivo* manejado fue el murino. Se utilizaron las siguientes cepas de ratones –viables, fértiles y sin ninguna anomalía física (150)– con el mismo fondo genético:

- C57BL/6NCrc
- B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}/J o P2X(7)R KO
- B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J o ApoE KO

La cepa C57BL/6NCr es una cepa salvaje (WT, por sus siglas en inglés) que se obtuvo de la compañía Charles River (Francia) (151). Esta cepa puede abreviarse como B6 y es la más utilizada¹⁵ (152). Las otras dos cepas son deficientes genéticamente, comúnmente conocidas como cepas *knockout* (KO), y se adquirieron en la Institución de Investigación Biomédica “The Jackson Laboratory” (Estados Unidos de América) (153). Estas fueron la cepa B6.129P2-P2rx^{7tm1Gab}/J (154) –también conocida como P2X(7)R KO¹⁶– y la B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J (155) –o ApoE KO¹⁷–. Ambas cepas son líneas homocigotas congénicas, en las cuales se ha eliminado el gen del receptor purinérgico P2X₇ y el gen que codifica la Apolipoproteína E (Apo E), respectivamente.

Los ratones utilizados fueron machos, de edad comprendida entre 4 y 16 semanas y de peso entre los 20-30 g. Se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM), de la Universitat de València (UV), bajo condiciones controladas –de ventilación, luz y temperatura– y dispusieron de agua y comida *ad libitum*.

¹⁵ Fue la primera cepa secuenciada y su uso es ideal para diversos campos de estudio como la obesidad inducida por la dieta, la inmunidad e incluso para el desarrollo de cepas modificadas genéticamente.

¹⁶ Se emplea en diversas áreas de investigación como inmunología, inflamación, autoinmunidad, factores de crecimiento, receptores, citoquinas, etc.

¹⁷ Se utiliza en diferentes campos como la investigación sobre la diabetes, la obesidad, el metabolismo, las ECV, la aterosclerosis y el envejecimiento.

III.A.3. Fármacos

III.A.3.1. Antirretrovirales

Todos los ARV empleados en los estudios agudos se adquirieron en Sequoia Research Products Ltd (Reino Unido) y fueron:

- ITIAN: ABC, TDF, ddl, 3TC y FTC
- ITINN: NVP, RPV y EFV
- CCR5: MRV
- IP: LPV, ATV y DRV
- INI: EVG y RAL

Estos se disolvieron en sus respectivos vehículos: agua ácida (NVP), dimetilsulfóxido (DMSO) (ATV, EVG, DRV, RAL y RPV), metanol (EFV, LPV y MVC) y salino (3TC, ABC, ddl, FTC y TDF).

Para el ensayo crónico *in vivo* se utilizó el preparado de ABC comercializado (Ziagen® 300 mg) que se obtuvo a través del servicio de farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

III.A.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Se incluyeron dos AINE, diclofenaco y rofecoxib obtenidos de Merck. El primero es un inhibidor no selectivo de la COX (156); mientras que el segundo es un inhibidor selectivo de la isoforma 2 de la COX (COX-2) (157).

III.A.3.3. Antagonistas

Se utilizaron los siguientes antagonistas del sistema purinérgico suministrados por Sigma-Aldrich, Inc.: apirasa (enzima hidrolítica de nucleósidos di-y trifosfatos), suramina (antagonista no específico de los receptores purinérgicos), NF023 (antagonista del receptor P2X₁) (158), A317491 (antagonista del receptor P2X₃ y P2X_{2/3}) (159) y A804598 (antagonista competitivo selectivo de P2X₇) (160). También, se empleó NF449 (antagonista competitivo reversible del receptor P2X), MRS2500 (antagonista selectivo del receptor P2Y₁) (161) y clopidogrel (antagonista selectivo del receptor P2Y₁₂) (162) que se obtuvieron en Tocris.

III.A.4. Anticuerpos

Todos los anticuerpos empleados (Tabla 5 y Tabla 6) son anticuerpos frente a humano, cuya diana, o bien es el endotelio, los leucocitos, o la plaqueta. Algunos anticuerpos se utilizaron conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) o con ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés).

Tabla 5. Anticuerpos bloqueantes utilizados.

Casa comercial	ANTICUERPO (Ab)
Abcam	anti-CD42b
	anti-CD162
Merck Millipore	anti-CD62P
	anti-GPIIb/IIIa
	anti-ICAM-1
	anti-JAMC

Tabla 6. Anticuerpos de marcaje utilizados

Casa comercial	ANTICUERPO (Ab)
Abcam	CD41 purificado
Beckman Coulter	CD41 - PE
BD Biosciences	anti-CD11b - PE
	anti-CD18 - FITC
	anti-CD62P - FITC
Life Technologies	anti-PAC-1 - FITC
	Alexa Flour® 488

III.A.5. Reactivos

Los reactivos usados se muestran en la [Tabla 7](#) agrupados por la casa comercial.

Tabla 7. Reactivos utilizados.

Casa comercial	REACTIVO
AirLiquide	Gases
BD Biosciences	Solución de lisis citometría
BD Vacutainer	Tubos con citrato sódico
Braun	Suero fisiológico (NaCl 0,9%)
Chrono-Log Corp.	Adenosín difosfato (ADP)
GE Healthcare	Ficoll-Paque TM Plus Colagenasa
Gibco	"Phosphate Buffered Saline" (PBS) Tripsina
J.T. Baker	Etanol
Lonza	Dulbecco's PBS con Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS+)
	Dulbecco's PBS sin Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS-)
	"Endothelial Cell Growth Basal Medium- 2" (EBM-2)
	"Hank's balanced salt solution" (HBSS)
	Kit suplemento "SingleQuots" TM de EGM-2 Suero Fetal Bovino (FBS)
Nunc	Cubreobjetos de cristal (25 mm Ø) Cubreobjetos de plástico (25 mm Ø)
Panreac	Paraformaldehído
Sigma-Aldrich, Inc	ADP
	Agua para cultivos
	Albúmina Sérica Humana 25% (HSA)
	Ciclofosfamida (CPM)
	Cloruro férrico (FeCl ₃)
	Dextrano
	Dimelsulfóxido (DMSO)
	Fibronectina
	Formalina 10%
	RPMI 1640 suplementado con 20 mM HEPES
Xilacina	

III.A.6. Equipos

El equipamiento empleado se indica, a continuación, en la metodología, situándolo en la técnica correspondiente.

III.B. MÉTODOS: TÉCNICAS *IN VITRO*

III.B.1. Obtención de células

III.B.1.1. Extracción y cultivo de células endoteliales

Las CE empleadas fueron las HUVECs y se obtuvieron mediante disgregación enzimática con colagenasa de los cordones umbilicales humanos frescos y completos (148,163). Los cordones presentan una morfología helicoidal y tubular (Figura 30). Además, a nivel vascular están constituidos por dos arterias y una única vena (164).



Figura 30. Cordón umbilical humano. Sección del cordón umbilical pinzado mediante una llave que tiene acoplada una jeringa y una pinza, permitiendo que el interior de la vena esté cargado de colagenasa.

Extracción de HUVEC

La extracción comenzó con un lavado de la vena del cordón con PBS a 37°C para eliminar los restos de sangre. Tras el lavado se introdujo la colagenasa (1 mg/mL, enzima con acción disgregante) en la vena, dejándola actuar durante 17 min en el incubador (37°C) (148,163,165). Transcurrido ese período de tiempo, el cordón se masajeó suavemente para garantizar la separación de las CE de la pared del vaso y se neutralizó la actividad de la colagenasa mediante EBM-2 –medio de cultivo específico–. El contenido se recogió y se centrifugó a 259 xg durante 5 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 5 mL de EBM-2 suplementado con un kit que contiene FBS (2% v/v), hidrocortisona (0,04% v/v), bFGF humano (hbFGF, 0,4% v/v), VEGF, (0,1% v/v), "Recombinant Long R³ Insulin-Like Growth Factor-1" (R3-IGF-1, 0,1% v/v), ácido ascórbico (0,1% v/v), Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF, 0,1% v/v), anfotericina B sulfato de gentamicina (GA-1000, 0,1% v/v), heparina (0,1% v/v), penicilina (50 unidades/mL), estreptomycin (50 µg/ml) y fungizona (2,5 µg/ml).

Cultivo de células endoteliales

El contenido anterior se depositó en un frasco de cultivo celular T-25 que se almacenó en el incubador, donde las células se adhirieron y crecieron hasta alcanzar el 100% de confluencia. Una vez se alcanzó la misma, los cultivos primarios se despegaron con tripsina (166). En primer lugar, se aspiró el medio y se añadieron 5 mL de PBS para lavar. En segundo lugar, se añadieron 2 mL de tripsina y se aspiró rápidamente. En tercer lugar, se volvieron a añadir 2 mL de tripsina y se dejó actuar durante 2 min en el incubador. Tras los 2 min, se neutralizó con 5 mL de EBM-2 y se transfirió el contenido a un falcón de 50 mL para ser centrifugado durante 5 min a 1200 rpm. Finalmente, se aspiró todo el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el volumen adecuado de EBM-2 que depende del número de

pocillos a sembrar (2 mL/pocillo). Este nuevo contenido se transfirió a las placas de cultivo de seis pocillos con cubreobjetos de 25 mm Ø revestidos de fibronectina (5mg/mL) (167).

Las placas de cultivo se mantuvieron en el incubador a 37°C, en atmósfera húmeda de 95% aire / 5% CO₂, durante aproximadamente 48 h que es el tiempo necesario para alcanzar el 100% de confluencia en estos pocillos. Estas células del primer pase de los cultivos primarios de HUVECs (Figura 31) sobre los cubreobjetos son las que se utilizaron en los experimentos de adhesión en cámara paralela de flujo (véase *III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo*).

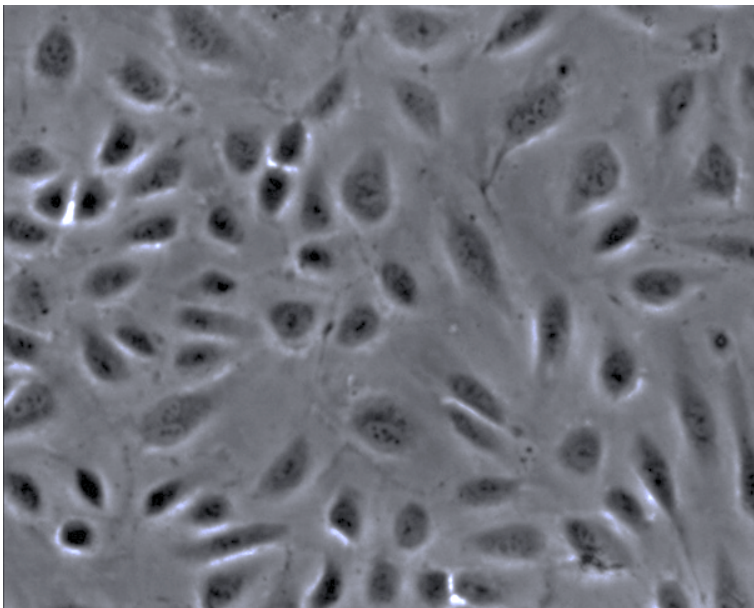


Figura 31. Imagen representativa de la monocapa de HUVECs.

III.B.1.2. Aislamiento de leucocitos

La obtención de los leucocitos se realizó a partir de las muestras sanguíneas recolectadas en tubos de citrato como anticoagulante (146,165). Los leucocitos de interés fueron los polimorfonucleares (PMN) y estos se aislaron mediante un método basado en el gradiente de densidad (168).

El proceso comenzó con la adición de 10 mL de dextrano al 3% (en suero fisiológico) sobre, aproximadamente, un total de 20 mL de sangre periférica, para eliminar los eritrocitos (169,170). Tras un período de 45 min a temperatura ambiente (25°C), se recogió la parte superior (Figura 32. A) –ya que la mayoría de los eritrocitos se deposita en la parte inferior– que se depositó cuidadosamente sobre 15 mL de medio Ficoll-Paque Plus (Figura 32. B). Este medio origina un gradiente de densidad que junto a una centrifugación de 25 min a 259 xg permitió aislar los PMN en el precipitado (Figura 32. C). Este precipitado se resuspendió en 3 mL de tampón de lisis y tras 5 min a temperatura ambiente se centrifugó de nuevo a 259 xg durante 5 min. Posteriormente, se lavaron con 5 mL de HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y se centrifugó otra vez a 259 xg durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el precipitado –donde se hayan los PMN– en 3 mL de medio RPMI suplementado con FBS inactivado (10% v/v), penicilina/estreptomicina (1% v/v), glutamina (1% v/v) y piruvato sódico (1% v/v) (146,165).

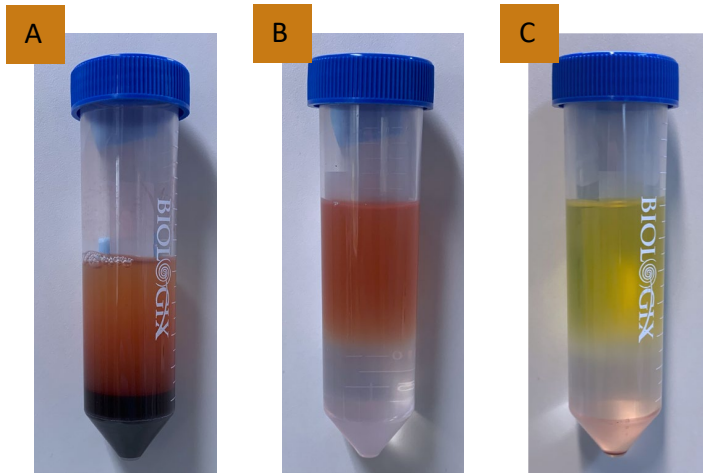


Figura 32. Imágenes representativas del proceso de aislamiento de leucocitos basado en el gradiente de densidad. **A.** Sangre periférica con dextrano al 3% para eliminar los eritrocitos depositados. **B.** Sobrenadante del tubo A sobre el medio Ficoll-Paque Plus que permite el gradiente de densidad. **C.** Tubo B tras 25 min de centrifugación a 259 xg, a partir del cual se obtienen los PMNs del precipitado.

Este contenido celular se utilizó en los experimentos de citometría (véase *III.B.4. Citometría de flujo*).

III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas

La obtención tanto del plasma rico en plaquetas (PRP) como de plaquetas lavadas se realizó a partir de la sangre entera, mediante un método de extracción con prostaciclina (171) para evitar la activación mecánica de las plaquetas (172).

Extracción de PRP

Los tubos de citrato sódico con la sangre (Figura 33. A) se centrifugaron a 220 g – con aceleración y desaceleración suave– durante 10 min y se obtuvo un sobrenadante que constituyó el PRP *per se* (Figura 33. B).



Figura 33. Extracción PRP. A. Sangre entera. B. Tubo A tras la centrifugación donde se aprecia el PRP en la parte superior (fase traslúcida de color amarillo).

Preparación de plaquetas lavadas

Para obtener las plaquetas lavadas, se centrifugó el PRP a 700 g durante 10 min. Tras la centrifugación, el plasma pobre en plaquetas (PPP) –que es el sobrenadante– se eliminó, y el precipitado de plaquetas se resuspendió suavemente en tampón salino hasta alcanzar una concentración final de 1×10^7 plaquetas/mL (173).

Estos contenidos celulares se utilizaron en los experimentos de adhesión en cámara paralela de flujo y en los de citometría de flujo (véase *III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo* y *III.B.4. Citometría de flujo*, respectivamente).

III.B.2. Protocolos experimentales del tratamiento *in vitro*

En los ensayos *in vitro* se efectuaron los mismos tratamientos farmacológicos en las distintas muestras biológicas empleadas (células endoteliales, plaquetas, neutrófilos, sangre entera y PRP) que posteriormente se analizaron con las distintas técnicas que se describen posteriormente (véase *III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo*, *III.B.4. Citometría de flujo* y *III.B.5. Agregometría*).

Los tratamientos fueron los siguientes (Figura 34):

- ITIAN: ABC (2,5-5 µg/mL), TDF (10 µg/mL), ddl (10 µg/mL), 3TC (10 µg/mL) y FTC (10 µg/mL)
- ITINN: NVP (50 µg/mL), RPV (1 µg/mL) y EFV (25 µg/mL)
- CCR5: MRV (5 µg/mL)
- IP: LPV (25 µg/mL), ATV (25 µg/mL) y DRV (25 µg/mL)
- INI: EVG (10 µg/mL) y RAL (5 µg/mL)

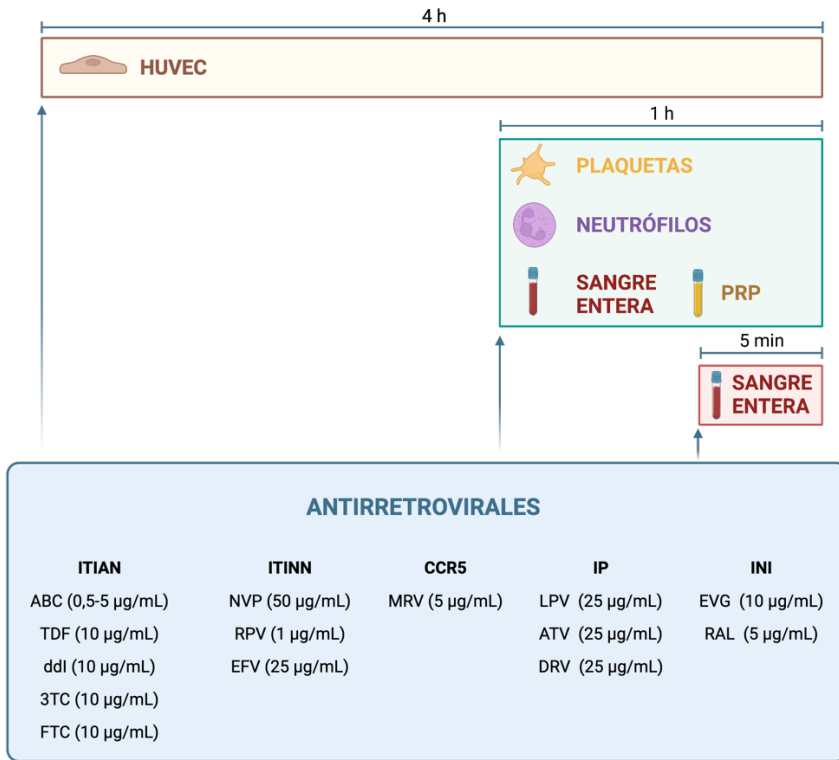


Figura 34. Protocolo experimental del tratamiento in vitro. La figura muestra el tratamiento de las distintas muestras con los diferentes antirretrovirales: abacavir (ABC, 2,5-5 µg/mL), tenofovir (TDF, 10 µg/mL), didanosina (ddl, 10 µg/mL), lamivudina (3TC, 10 µg/mL), emtricitabina (FTC, 10 µg/mL), nevirapina (NVP, 50 µg/mL), rilpivirina (RPV, 1 µg/mL), efavirenz (EFV, 25 µg/mL), maraviroc (MRV, 5 µg/mL), lopinavir (LPV, 25 µg/mL), atazanavir (ATV, 25 µg/mL), darunavir (DRV, 25 µg/mL), elvitegravir (EVG, 10 µg/mL) y raltegravir (RAL, 5 µg/mL). Todos los tratamientos se realizaron a 37°C.

III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo

La cámara paralela de flujo es una técnica que permite el estudio de las interacciones entre distintas células sobre una superficie en condiciones dinámicas y controladas (174) y trata de reproducir experimentalmente lo que sucede fisiológicamente en un vaso sanguíneo. En esta Tesis Doctoral, se analizaron las interacciones entre CE –HUVEC– y plaquetas. La ejecución de esta técnica involucra fundamentalmente el siguiente equipamiento: una cámara paralela de flujo, una bomba de infusión, un microscopio, un sistema de epi-fluorescencia, una videocámara y un ordenador con el software específico como sistema de detección (Figura 35) (146,175).

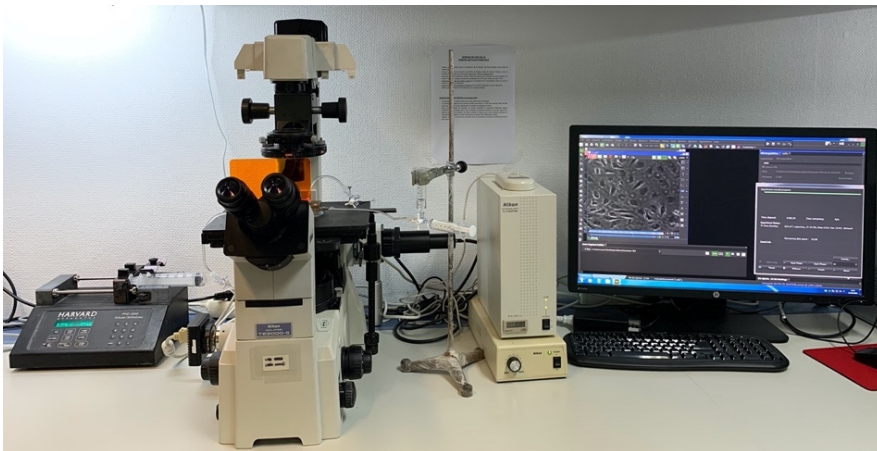


Figura 35. Equipo de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo. De izquierda a derecha: bomba de infusión/perfusión (Harvard Apparatus PHD 2000), microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) con una videocámara acoplada (Sony Exware HAD), cámara paralela de flujo, equipo de Epi-luminiscencia (Nikon), y ordenador con el software *NIS-Elements Advanced Research* para la adquisición de las imágenes y los vídeos.

El parámetro estudiado para evaluar la interacción celular fue (176):

- **Adhesión plaquetaria al endotelio (células/mm²):** una plaqueta se considera adherida al endotelio vascular si permanece estacionada sobre la monocapa endotelial durante un período igual o superior a 30 s y se cuantificó el número de células adheridas a lo largo de 100 μm de vaso.

La cámara paralela de flujo posee tres placas con una hendidura circular (Figura 36. A) que permite la visualización, siendo una de ellas calefactora lo cual permite que la experimentación se realice a 37°C. En la hendidura de la placa inferior se insertó el cubreobjetos que contiene las HUVEC confluentes (177). Una vez se montó la cámara, se acoplaron las conexiones a través de las cuales se permite el flujo de la suspensión celular a través de la bomba de infusión. Esta se calibró para que la suspensión celular circulara con un caudal de 0,36 mL/min o con una presión de 0,7 dinas/cm² sobre un área de 125 mm² del cubreobjetos (146). Posteriormente, la cámara se colocó sobre el microscopio invertido (Figura 36. B).

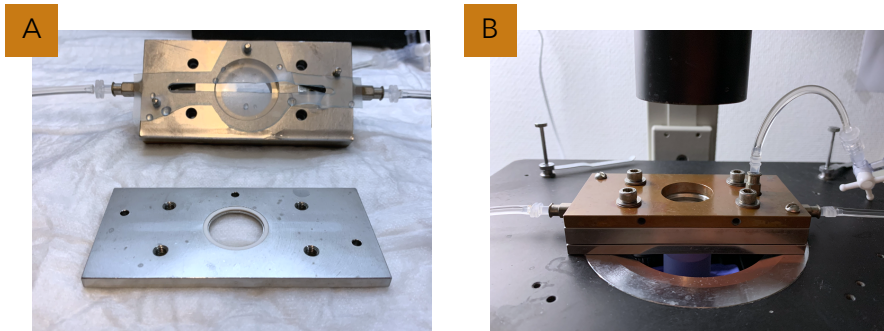


Figura 36. Cámara paralela de flujo. A. Cámara abierta. **B.** Cámara cerrada sobre el microscopio invertido. En ambas imágenes se aprecia la hendidura circular sobre la cual se coloca el cubreobjetos con la monocapa confluyente de HUVEC y las conexiones que permiten que se perfunda la suspensión celular a través de la cámara paralela de flujo.

El microscopio está equipado con un sistema de Epi-Fluorescencia y un objetivo 40X que permite la observación de la interacción de las plaquetas con el endotelio (Figura 35). Además, este está conectado a una videocámara y a un ordenador con el *software* que facilita tanto la visualización a tiempo real de las imágenes y los vídeos como el tratamiento posterior.

Previamente a la técnica de adhesión en la cámara paralela de flujo, las plaquetas se marcaron debido a que es imprescindible para detectarlas, ya que por su tamaño no pueden observarse a simple vista en el microscopio. Por tanto, antes de detallar el ensayo a estudio para determinar la adhesión plaquetaria, se detalla el marcaje de plaquetas a continuación. Las plaquetas lavadas (véase *III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas*) se incubaron a 37°C durante 30 min con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488 (173). Esta incubación permite marcar fluorescente y específicamente las plaquetas. A continuación, las plaquetas se centrifugaron para eliminar el CD41-Alexa Fluor®488 no unido a las plaquetas. Después, estas se resuspendieron para alcanzar aproximadamente una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/mL.

4mL de plaquetas lavadas y marcadas se perfundieron durante 5 min y consecutivamente, se lavó la monocapa con 4 mL de tampón salino para eliminar las plaquetas no adheridas. Finalmente, se tomaron 5 imágenes de campos independientes –tanto en campo claro como fluorescente– a partir de las cuales se calculó la adhesión plaquetaria al endotelio (173), parámetro evaluado para analizar la interacción.

III.B.3.1. Estudio del efecto *in vitro* de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-endotelio

El efecto *in vitro* de los ARV sobre la interacción plaqueta-endotelio analizó la adhesión plaquetaria (plaquetas/mm²) al endotelio. Así, se estudió el efecto de ABC y de otros ARVs, y, en el caso particular de ABC, también, se determinó el tipo celular involucrado, las moléculas de adhesión responsables y la implicación del sistema purinérgico.

Protocolo experimental

Se trataron tanto las HUVEC como las plaquetas –de manera independiente y no excluyente– con concentraciones clínicamente relevantes de los diferentes ARV (178,179,188,189,180-187), tal y como se indica anteriormente en la [Figura 34](#). Como control negativo se utilizó el vehículo correspondiente de cada fármaco; mientras que TNF- α (25 ng/mL) y ADP (5 μ mol/L) se emplearon como control positivo de HUVEC y plaquetas, respectivamente. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se marcaron las plaquetas y se perfundieron sobre la monocapa endotelial para así determinar la adhesión de plaquetas al endotelio (células/mm²) (véase [III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo](#)).

Con el fin de evaluar el tipo celular implicado se trataron, o las HUVEC y las plaquetas conjuntamente con ABC 5 μ g/mL, o se trataron ambos tipos celulares de forma independiente, es decir, tratando un tipo u otro. El resto del procedimiento es análogo al descrito previamente.

Para evaluar las moléculas de adhesión responsables de la respuesta con ABC, previamente al tratamiento con ABC 5 μ g/mL o con el vehículo, se pretrataron tanto las HUVEC como las plaquetas durante 15 min a 37°C con los diferentes anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión endoteliales y plaquetarias (175,190-196).

En el caso de las HUVEC se utilizó el anticuerpo bloqueante frente a ICAM-1 (CD54, 20 µg/mL), P-selectina (CD62P, 25 µg/mL) o PSGL-1 (CD162, 5 µg/mL); mientras que en las plaquetas el anticuerpo bloqueante frente a JAMC (10 µg/mL), PSGL-1 (CD162, 5 µg/mL), GPIIbα (CD42b, 25 µg/mL), P-selectina (CD62P, 25 µg/mL) o la molécula bloqueante de GPIIbIIIa (eptifibatida, 0,65 µg/mL) (197-199). Transcurrido el tiempo de pre- y tratamiento, se marcaron las plaquetas y se perfundieron sobre la monocapa endotelial para así determinar la adhesión de plaquetas al endotelio (células/mm²) (véase *III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo*).

Para estudiar la implicación del sistema purinérgico en la respuesta de ABC, previamente al tratamiento de las HUVEC y las plaquetas con ABC 5 µg/mL o con vehículo, se pretrataron ente 15 y 60 min a 37°C con diversos compuestos que intervienen en diferentes puntos de la ruta de señalización purinérgica (200-203). Las HUVEC se pretrataron con apirasa (30 min, 1 µmol/L), suramina (60 min, 100 µmol/L, antagonista no selectivo de los receptores de ATP), NF023 (30 min, 10 µmol/L, antagonista de los receptores de ATP _{P2X₁₋₄}), A317491 (30 min, 25 nmol/L, antagonista de los receptores de ATP P2X₃ y P2X_{2/3}) o A804598 (30 min, 1 µmol/mL, antagonista del receptor de ATP P2X₇). Mientras que las plaquetas con apirasa (30 min, 1 µmol/L) NF449 (15 min, 100 µmol/L, antagonista de los receptores de ATP P2X₁), MRS2500 (15 min, 100 µmol/L, antagonista del receptor de ATP P2Y₁) o clopidogrel (15 min, 30 µmol/L, antagonista del receptor de ATP P2Y₁₂) (158,160,161,204-206). Transcurrido el tiempo de pre- y tratamiento, se marcaron las plaquetas y se perfundieron sobre la monocapa endotelial para así determinar la adhesión de plaquetas al endotelio (células/mm²) (véase *III.B.3. Adhesión en cámara paralela de flujo*).

III.B.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica sofisticada, desarrollada durante el siglo XX (207), compuesta básicamente por tres sistemas –de fluidos, óptico y electrónico– (208) que se acoplan y proporcionan un análisis multiparamétrico rápido e individual a partir de una suspensión celular en movimiento. En primer lugar, el sistema de fluidos genera una presurización y como consecuencia la suspensión celular circula. Una vez la suspensión celular está en circulación participa el sistema óptico que la excita mediante un láser y la fluorescencia emitida es captada y registrada por el sistema electrónico. La captación de luz se produce en dos direcciones, directa y lateral (90°). La primera es conocida como FSC (*forward scatter*) e indica el tamaño relativo de la célula; y la lateral como SSC (*side scatter*) que revela la granulosidad o complejidad celular. Por tanto, esta técnica permite caracterizar simultáneamente diferentes tipos celulares¹⁸ en función de su tamaño y granulosidad. Por último, el sistema electrónico transforma las señales ópticas en electrónicas, es decir, se encarga de ejecutar la conversión analógica-digital de los datos.

El citómetro empleado es el BD FACSCalibur™ (209) (Figura 37) que consta de un sistema óptico formado, entre otros elementos, por un láser de Argón y un láser de diodo rojo. Además, el ordenador al cual está conectado cuenta con el *software* BD CellQuest™ Pro (210), que permite manipular y analizar la distribución de los diferentes parámetros analizados a través de la representación en forma de histograma de las poblaciones celulares.

¹⁸ Cada célula o partícula que detecta el citómetro se designa como evento.



Figura 37. Equipo de citometría. De izquierda a derecha: citómetro (modelo BD FACSCalibur™ de BD Biosciences), tubo de citómetro y pantalla de ordenador con el software BD CellQuest™ Pro.

En la presente Tesis Doctoral, el parámetro indicativo de estudio es la mediana de intensidad de fluorescencia. Principalmente, la fluorescencia utilizada proviene de los siguientes fluorocromos: FITC (pequeña molécula orgánica, cuyo peso molecular (PM) es 389 Da) o PE (ficobiliproteína, cuyo PM es 240000 Da) que se conjugan con anticuerpos (208) dirigidos contra antígenos de superficie celular¹⁹. El primer fluorocromo se excita a 488 nm y emite alrededor de 530 nm, mientras que el segundo a 532 nm y a 550 nm (207).

¹⁹ Cada antígeno tiene acuñado un número de diferenciación de grupo (CD, "cluster of differentiation") que permite inmunofenotipar las poblaciones, ya que los CD actúan como marcadores específicos.

La técnica de la citometría de flujo fue utilizada para estudiar(165):

- la **interacción plaqueta-neutrófilo** a través de la detección de la presencia de plaquetas en las distintas poblaciones leucocitarias en muestras de sangre entera (Figura 38).

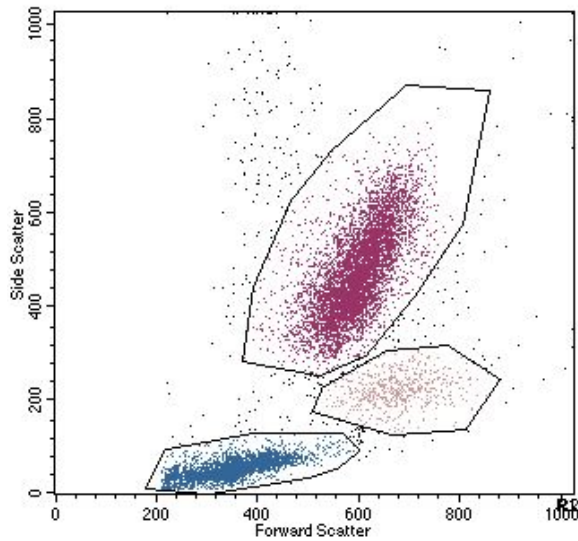


Figura 38. Histograma representativo de la población mixta leucocitaria identificada mediante citometría de flujo. En color **neutrófilos**, en **monocitos** y en **linfocitos**. La señal de la intensidad se ha representado mediante una amplificación lineal.

- la **activación plaquetaria** a través de la expresión de P-selectina y gpIIb/IIIa (molécula responsable de la agregación plaquetaria) en muestras de PRP (Figura 39).

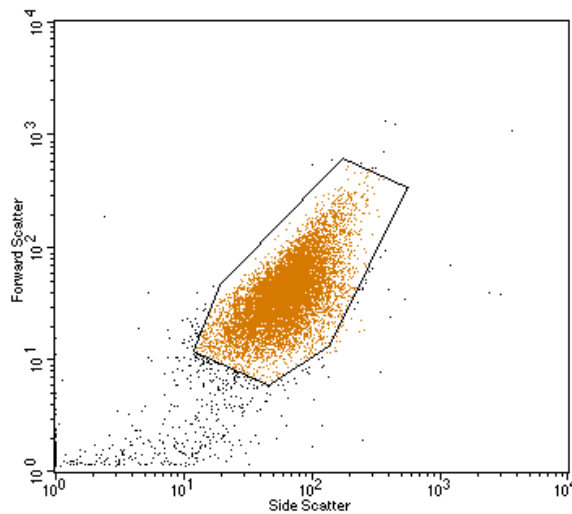


Figura 39. Histograma representativo de la población de plaquetas identificada mediante citometría de flujo. La señal de la intensidad se ha representado mediante una amplificación logarítmica.

En el caso de sangre entera, se incubó 40 μL de sangre entera con 2,5 μL de anticuerpo conjugado a un fluorocromo, durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Tras la incubación, las muestras se diluyeron con 500 μL de solución de lisis de citometría (FACS Lysing Solution) y se conservaron durante 5-10 min a 4°C, tiempo en el cual se produjo la lisis de los eritrocitos. En el caso del PRP, este primero fue extraído (véase *III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas*) y, posteriormente 10 μL del mismo se diluyó en 90 μL de HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}).

A continuación, se incubó con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo durante 10 min a 37°C en oscuridad (211). Finalizada la incubación se diluyó en 500 μ L de HBSS y 500 μ L de formalina al 10% y se conservó durante 5 min a 4°C.

Después, se analizaron las muestras (sangre entera y PRP) en el citómetro para determinar la mediana de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo a partir de 10.000 y 30.000 eventos/muestra, respectivamente (175,212).

III.B.4.1. Estudio del efecto *in vitro* de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-leucocito

El efecto *in vitro* de los ARV sobre la interacción plaqueta-leucocito analizó la intensidad de fluorescencia de CD41, molécula que marca plaquetas y permite su detección en las poblaciones de leucocitos. Así, se estudió el efecto de ABC y de otros ARV, y, en el caso particular de ABC, también, se determinó el tipo celular involucrado, las moléculas de adhesión responsables y la implicación del sistema purinérgico.

Protocolo experimental

Se trataron entre 250-500 μ L de sangre con concentraciones clínicamente relevantes de los diferentes ARV (178,179,188,189,180-187), tal y como se indica anteriormente en la [Figura 34](#). Como control positivo se utilizó ADP (5 μ M) y como control negativo los vehículos respectivos de cada fármaco. Tras el tratamiento, las muestras se analizaron por el citómetro para determinar la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD41 incubándolas con CD41-PE (197,198), tal y como se describe en previamente en [III.B.4. Citometría de flujo](#).

Con el fin de evaluar el tipo celular implicado se trataron, o los neutrófilos aislados (véase *III.B.1.2. Aislamiento de leucocitos*) y las plaquetas lavadas (véase *III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas*) conjuntamente con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o se trataron ambos tipos celulares de forma independiente, es decir, tratando un tipo u otro. Después, se mezclaron las diferentes combinaciones de poblaciones en una ratio 1:20 y se analizó de manera análoga al procedimiento descrito previamente.

Para evaluar las moléculas de adhesión responsables de la respuesta con ABC, previamente al tratamiento con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o con el vehículo, se pretrató la sangre durante 15 min a 37°C con los diferentes anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión plaquetarias o leucocitarias. Los anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión plaquetarias empleados fueron: CD62P (P-selectina, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CD42b (gpIb α , 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y JAMC (JAMC, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mientras que los anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión leucocitarias fueron: CD162 (PSGL-1, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CD11b (Mac-1, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CD18 (integrinas β_2 , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras el pre- y tratamiento, las muestras se analizaron por el citómetro para determinar la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD41 incubándolas con CD41-PE, tal y como se describe en previamente en *III.B.4. Citometría de flujo*.

Para estudiar la implicación del sistema purinérgico en la respuesta con ABC, previamente al tratamiento con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o con el vehículo, se pretrató la sangre con diversos compuestos que intervienen en diferentes puntos de la ruta de señalización purinérgica. Los antagonistas de los receptores purinérgicos leucocitarios fueron: A317491 (antagonista de los receptores P2X₂₋₃, 25 nM, 30 min) y A804598 (antagonista del receptor P2X₇, 1 μM , 30 min). Mientras que los antagonistas de los receptores purinérgicos plaquetarios fueron: NF449 (antagonista del receptor P2X₁, 100 μM , 15 min), MRS2500 (antagonista del receptor P2Y₁, 100 μM , 15 min) y clopidogrel (antagonista del receptor P2Y₁₂, 30

μM, 15 min). Tras el pre- y tratamiento, las muestras se analizaron por el citómetro para determinar la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD41 incubándolas con CD41-PE, tal y como se describe en previamente en *III.B.4. Citometría de flujo*.

III.B.4.2. Estudio del efecto *in vitro* de ARV y otros ARV sobre la activación plaquetaria

El efecto de los ARV sobre la activación plaquetaria se estudió mediante dos marcadores del propio proceso: la expresión de la molécula de adhesión P-selectina –a través de fluorescencia de CD62P-FITC (211)– y gplIbIIIa –a través de fluorescencia de PAC-1-FITC–. Ambas moléculas se evaluaron en PRP.

Expresión de la molécula de P-selectina y de GPIIbIIIa

Tras extraer el PRP (véase *III.B.1.3. Extracción de plasma rico en plaquetas y preparación de plaquetas lavadas*), se trató con concentraciones clínicamente relevantes de los diferentes ARV (178,179,188,189,180-187), tal y como se indica anteriormente en la *Figura 34*. Como control positivo se utilizó ADP (5 μmol/L) y como control negativo los vehículos de los fármacos. Tras el tratamiento, el ensayo es tal cual como se describe en *III.B.4. Citometría de flujo*, siendo el anticuerpo empleado CD62P-FITC para evaluar la expresión de P-selectina y PAC1-FITC para evaluar la expresión de GPIIbIIIa (199).

III.B.5. Agregometría

La agregación plaquetaria se evaluó mediante un agregómetro de impedancia – concretamente con el modelo Chrono-Log Model 590-2D (Figura 40)– que cuantifica la variación de la resistencia eléctrica producida como consecuencia de la agregación plaquetaria a los electrodos de platino (213).

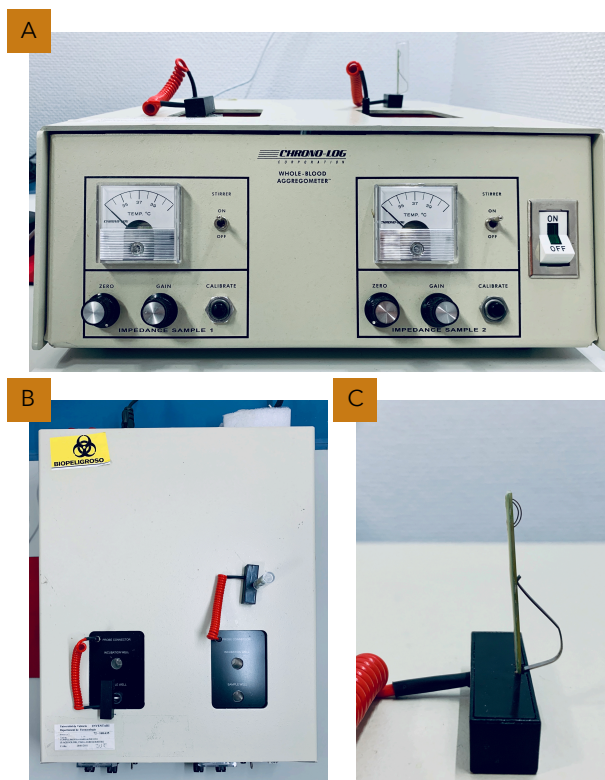


Figura 40. Agregómetro de impedancia. A. Vista frontal del agregómetro. **B.** Vista plana del agregómetro, donde se aprecian los dos canales de muestra con sus respectivas cubetas. **C.** Electrodo formado por dos alambres de platino, al cual se aglutinan los agregados plaquetarios.

El ordenador conectado al agregómetro detecta, gracias al software AggroLink®, la variación de la impedancia que la traduce y representa a través de una curva con monotonía decreciente. La curva registrada se caracteriza por los siguientes parámetros (Figura 41):

- **Pendiente:** cuantifica la velocidad de agregación plaquetaria y se mide en Ω/min .
- **Amplitud:** evalúa la respuesta máxima de agregación plaquetaria y se mide en Ω .
- **Área bajo la curva (AUC):** correlaciona la pendiente y amplitud, midiéndose en $\Omega \cdot \text{min}$.

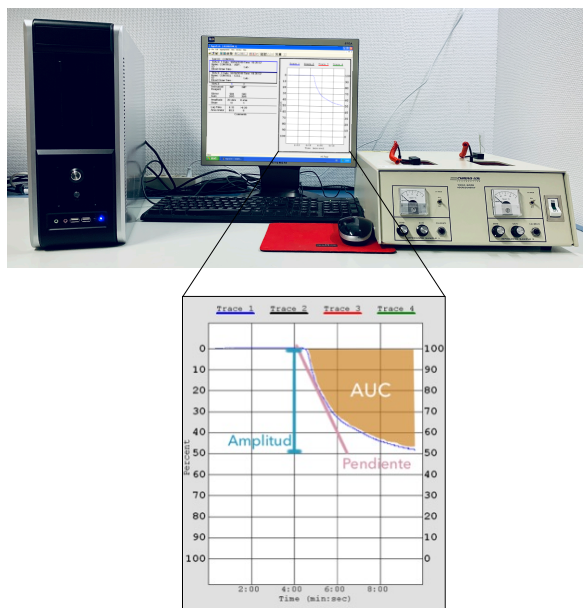


Figura 41. Equipo de agregometría y registro de una curva de agregación. En la parte superior se observa tanto el agregómetro como el ordenador al cual está conectado; en la parte inferior, se detalla de manera ampliada el registro de la curva, donde se indica la **amplitud**, la **pendiente** y el **área bajo la curva (AUC)**.

Todo ensayo de agregación plaquetaria requiere *a priori* que el equipo se calibre y se estabilice la muestra sanguínea. A continuación, se describen estos dos procesos comunes en todos los estudios.

Calibración y estabilización

Previamente al experimento, el agregómetro se calibró con la muestra sanguínea depositada en la cubeta. Este proceso consistió en ajustar la señal registrada a 0% y posteriormente se proporcionó un impulso de 20 Ω que se acopló a una señal de 50%. Tras el cese del impulso, la señal detectada regresó a un valor de 0%. Este valor hace referencia a las condiciones basales de cada muestra. Después de la calibración, la muestra se dejó durante 4 min a 37°C y en agitación constante (1200 *spin*) para que se estabilizase.

III.B.5.1. Estudio del efecto *in vitro* de ABC y otros ARV sobre la interacción plaqueta-plaqueta

El efecto de los ARV sobre la agregación plaquetaria potenciada por ADP (5 μM) se evaluó a partir del AUC.

Protocolo experimental

Una vez se calibró el equipo con la muestra (sangre diluida 1:1 con solución salina) y esta se estabilizó en las cubetas del agregómetro, donde estaban inmersos los electrodos, se adicionó el vehículo o el ARV en las concentraciones indicadas anteriormente en la [Figura 34](#). De este modo, se cuantificó el efecto agregante *per se* del ARV, durante los 5 min posteriores. A continuación, se añadió 10 μL ADP (5 μM) –que es un agregante plaquetario– y se evaluó su efecto durante los 6 min consecutivos a su adición.

III.C. MÉTODOS: TÉCNICAS *IN VIVO*

III.C.1. Protocolos experimentales de tratamiento *in vivo*

En los ensayos *in vivo* se efectuaron las mismas administraciones agudas de fármacos en los ratones que posteriormente se analizaron con las técnicas propias del ensayo. Los tratamientos fueron los siguientes (Figura 42):

- ITIAN: ABC (2,5-7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TDF (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ddi (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3TC (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y FTC (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- ITINN: NVP (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), RPV (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y EFV (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- CCR5: MRV (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- IP: LPV (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ATV (18 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DRV (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- INI: EVG (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y RAL (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

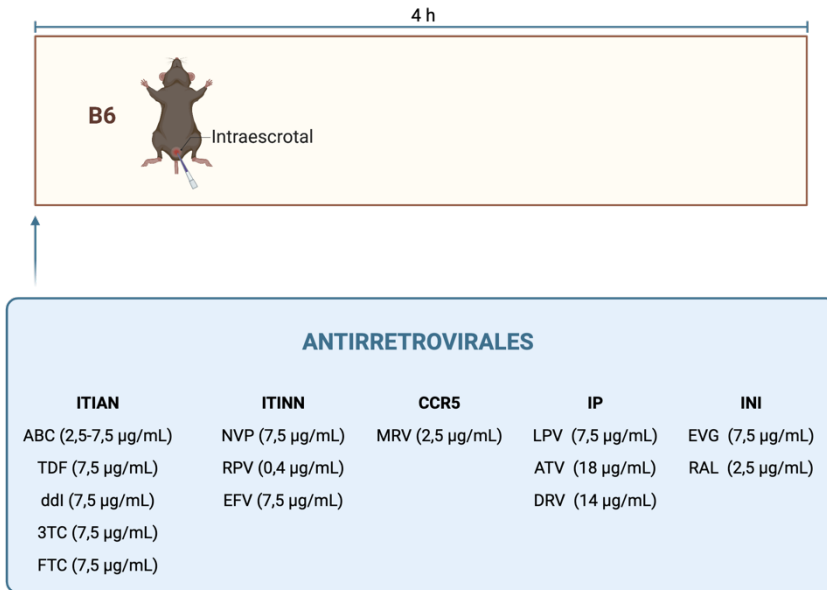


Figura 42. Protocolo experimental del tratamiento in vivo. La figura muestra tratamiento de los ratones con los diferentes antirretrovirales: abacavir (ABC, 2,5-7,5 µg/mL), tenofovir (TDF, 7,5 µg/mL), didanosina (ddI, 7,5 µg/mL), lamivudina (3TC, 7,5 µg/mL), emtricitabina (FTC, 7,5 µg/mL), nevirapina (NVP, 7,5 µg/mL), rilpivirina (RPV, 0,4 µg/mL), efavirenz (EFV, 7,5 µg/mL), maraviroc (MRV, 2,5 µg/mL), lopinavir (LPV, 7,5 µg/mL), atazanavir (ATV, 18 µg/mL), darunavir (DRV, 14 µg/mL), elvitegravir (EVG, 7,5 µg/mL) y raltegravir (RAL, 2,5 µg/mL). Todas las administraciones fueron vía intraesccrotal (i.e.)²⁰

²⁰ La vía de administración se seleccionó dado que permite el impregnar de forma directa los vasos del cremáster con los diferentes antirretrovirales.

III.C.2. Microscopía Intravital

La microscopía intravital es una técnica que permite el estudio de la fisiología celular en organismos vivos de manera *in situ*. Principalmente se utiliza para analizar la microcirculación *in vivo*.

En la presente Tesis Doctoral se hizo uso de la microscopía intravital de campo amplio de fluorescencia, donde un sistema de iluminación básico iluminó permanentemente toda la muestra (214). Concretamente se empleó un microscopio ortostático (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Nikon, Holanda) (Figura 43), con un objetivo 20X y un ocular 10X, acoplado a la videocámara (Nikon DS-Fi3) que proyecta las imágenes y los vídeos a un ordenador que los procesa gracias al software *NIS-Elements Basic Research* (147,175,215,216)



Figura 43. Sistema de microscopía intravital. La imagen muestra los diferentes componentes del sistema de microscopía intravital. De izquierda a derecha en la parte superior: Optical Doppler Velocimeter y equipo de iluminación. De izquierda a derecha en la parte inferior: ordenador donde se visualizan las imágenes y vídeos con el programa *NIS-Elements Basic Research*, microscopio con videocámara acoplada, baño termostático y bomba de infusión.

La microcirculación a estudio, el músculo cremastérico (217), se analizó mediante parámetros hemodinámicos que permitieron estudiar el efecto de los ARV sobre la generación del trombo.. Estos fueron (148):

- **Shear rate (γ , s^{-1}):** es la fuerza que ejerce la sangre sobre la pared del vaso. Esta se calcula según la siguiente definición newtoniana²¹:

$$\gamma = 8 \cdot \frac{V_{eri}}{D \cdot 1,6}$$

Donde D es el diámetro de del vaso, V_{eri} es la velocidad de los eritrocitos en el torrente sanguíneo que se calculó con la ayuda de un Optical Doppler Velocimeter (Microcirculation Research Institute).

- **Tiempo de oclusión (s):** es el tiempo transcurrido desde la adición de $FeCl_3$ hasta la formación del trombo que da lugar a la oclusión del vaso.²² El tiempo de oclusión permite medir de forma cuantitativa tanto el daño vascular como la activación y agregación plaquetaria, –parámetros relevantes para el desarrollo del proceso trombótico– (218).

Para observar el cremáster fue necesaria una intervención quirúrgica con el fin de exponerlo, que se describe a continuación al ser común a todos los estudios llevados a cabo donde se empleó la microscopia intravital.

²¹ La formula asume que el vaso es un cilindro geométrico.

²² El tiempo de oclusión máximo considerado fue 8 min. Una vez alcanzado este tiempo de oclusión se consideró que no se inducía la formación de trombo.

Microscopia intravital

La microcirugía comenzó anestesiando al ratón²³ con una mezcla de xilacina y ketamina (10/100 mg/kg) administrada vía intraperitoneal (i.p.). Una vez anestesiado se colocó al ratón en posición supina y se realizó una incisión en la zona testicular para extraer el testículo y permitir la extensión del músculo cremastérico— con la ayuda de un cauterizador, de unas pinzas y de unos enganches— sobre un pedestal translucido que permite su transiluminación y de superficie 155 mm² (Figura 44). Con el fin de garantizar la viabilidad del tejido, este se mantuvo superfundido, continuamente, con un flujo constante de 2 mL/min de solución tampón bicarbonatada (37°C, pH 7,4) gracias a una bomba de infusión y un baño termostático (147) (Figura 43).



Figura 44. Cremáster expuesto sobre el pedestal translucido. Se observan algunos microvasos.

²³ La cepa de ratón usada si no se especifica es la C57BL/6NCrc o B6.

Tras la extracción del cremáster, se buscó y seleccionó una arteria cuyo diámetro estuviera comprendido entre 20-35 μm (217) gracias a la herramienta de medición del *software*. Seguidamente, se comenzó a grabar un video de un máximo de 8 min que comienza con la adición de 80 μL de FeCl_3 (25 mM) sobre la arteria elegida y finaliza o bien cuando se ocluye el vaso o bien a los 8 min. Durante toda la grabación se anotó el "*shear rate*" en función del tiempo y el tiempo de oclusión (s), parámetros hemodinámicos.

III.C.2.1. Modelo de trombosis inducida por FeCl_3

El modelo de trombosis inducida por FeCl_3 es uno de los modelos más utilizados (219) para estudiar el efecto trombótico de los fármacos. El FeCl_3 es un agente químico que produce una liberación de ROS que provocan pérdida de funcionalidad endotelial. Asimismo, induce activación leucocitaria y activación y agregación plaquetaria (220). Este modelo se puso a punto mediante un curva dosis-respuesta con el objetivo de determinar la concentración de FeCl_3 que no es capaz de producir el trombo *per se*, pero si predispone al tejido a la formación del mismo ante otros factores externos (219).

Se extrajo el cremáster de los animales sin tratamiento (véase *III.C.2. Microscopía intravital*), y se determinó el tiempo de oclusión en función de diferentes concentraciones de FeCl_3 (25-100 mM) adicionadas sobre el cremáster.

III.C.2.2. Estudio del efecto *in vivo* de ABC y otros ARV sobre la trombogénesis

El efecto *in vivo* de los ARV sobre la trombogénesis analizó el tiempo de oclusión en el modelo de trombosis inducida por FeCl₃. Así, se estudió el efecto de ABC y de otros ARV, y, en el caso particular de ABC, también, se determinó el “*shear rate*”. Asimismo, en ABC, además, se profundizó en el papel del leucocito y en la implicación del sistema purinérgico.

Protocolo experimental

Los ratones se trataron con concentraciones clínicamente relevantes de los diferentes ARV (178,179,188,189,180-187), tal y como se indica anteriormente en la [Figura 42](#). Como controles positivos se administró diclofenaco (1 mg/kg, 2 h) y rofecoxib (0,1 mg/kg, 2h) y como control negativo los vehículos de los fármacos (4 h) vía intraperitoneal (i.p.). Tras el tratamiento se determinaron los parámetros hemostáticos en el microscopio intravital (véase [III.C.2. Microscopía intravital](#)).

Con el propósito de evaluar el papel del leucocito en los efectos de ABC en el modelo de trombosis, previamente al tratamiento con ABC 5 µg/mL, los ratones 4 días antes se pretrataron con CPM (150 mg/kg) vía i.p., generando así una depleción en el número de leucocitos gradual²⁴ (221,222). En el día 4, los ratones se trataron con ABC 5µg/mL tal y como se describe previamente, y tras este se determinaron los parámetros hemostáticos en el microscopio intravital (véase [III.C.2. Microscopía intravital](#)).

²⁴ La leucodepleción llegó al máximo al cuarto día tras un único tratamiento de CPM. Esto se comprobó mediante un conteo celular en la cámara de Neubauer.

Para estudiar la implicación de los receptores purinérgicos en los efectos de ABC en el modelo de trombosis, previamente al tratamiento con ABC 5 µg/mL, los animales fueron pretratados con diferentes antagonistas de los receptores (202,223-225). Así, se pretrataron vía i.p. con A804598 (antagonista específico del receptor P2X₇, 1µg/kg, 30 min) y A317491 (antagonista específico del receptor P2X_{2/3}, 0,1 µg/kg, 30 min). Tras el pre- y tratamiento se determinaron los parámetros hemostáticos en el microscopio intravital (véase *III.C.2. Microscopía intravital*).

Además de la aproximación farmacológica para evaluar la implicación de los receptores, también, se utilizaron ratones deficientes en el receptor P2X₇ y así comprobar su implicación en la trombosis generada por ABC (226). Para ello, los ratones P2X₇(R) KO se trataron con ABC 5µg/mL tal y como se describe previamente. Tras el tratamiento se determinaron los parámetros hemostáticos en el microscopio intravital (véase *III.C.2. Microscopía intravital*).

III.C.3. Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La medicina nuclear cuenta con diversas técnicas de imagen para el diagnóstico clínico no invasivas (227). Actualmente, en investigación preclínica las dos técnicas usualmente utilizadas son la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía axial computarizada (TAC) (228). Por un lado, la primera aprovecha la emisión de positrones, tras la administración del radiofármaco al torrente sanguíneo que se distribuye por todo el organismo, para visualizar y cuantificar los procesos fisiológicos y biológicos. Uno de los radiofármacos más utilizados es la fluorodesoxiglucosa-18F (18F-FDG) (229) que es un azúcar simple ligado a una mínima cantidad de flúor radiactivo. Las regiones del organismo donde se produce una alta captación del radiofármaco se denominan puntos calientes y son indicativas de un alto nivel de actividad bioquímica o metabólica; mientras que las

zonas donde se produce una distribución menor del mismo se conocen como puntos fríos e indican que la actividad metabólica es reducida. Por otro lado, la segunda utiliza la radiación X para obtener secciones anatómicas.

La UCIM de la UV cuenta con un equipo micro PET-TAC (Albira I, Bruker) (Figura 45) integrado que permite una adquisición multimodal de la información de ambas técnicas, fusionando las imágenes PET-TAC automáticamente. Esto permite que se cree una representación corporal completa del animal (Figura 46).

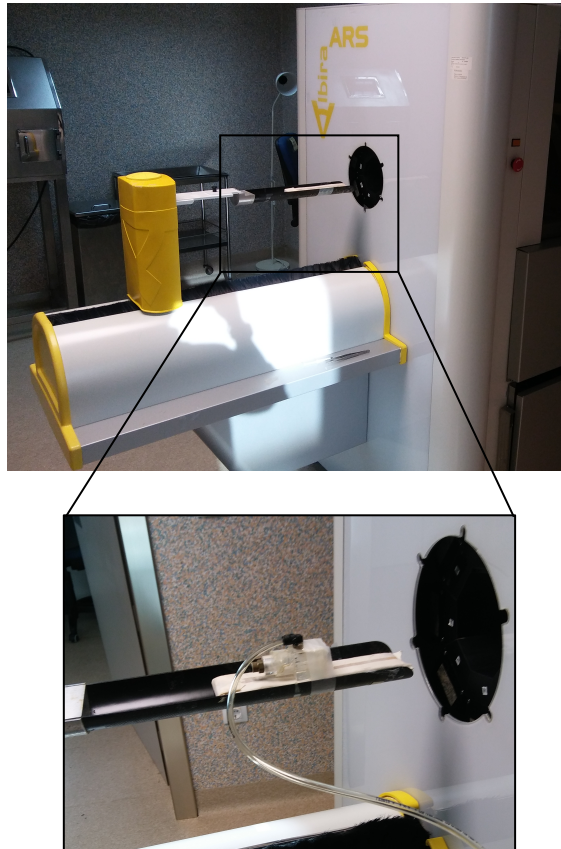


Figura 45. Equipo micro PET-TAC (Albira I, Bruker). La ampliación corresponde a la zona donde se coloca el ratón, donde se aprecia el sistema de anestesia inhalada acoplado.

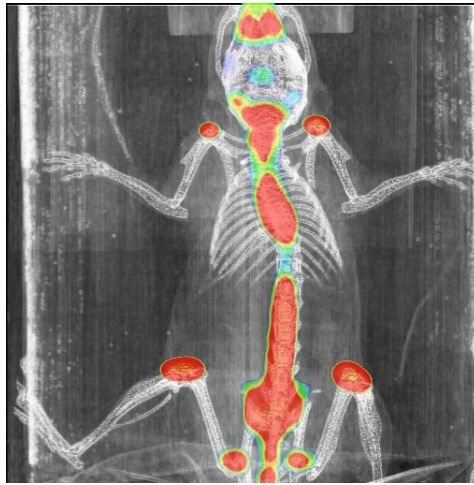


Figura 46. Imagen representativa PET-TAC del cuerpo de un ratón. Se aprecia la anatomía ósea del animal y las zonas calientes de captación del radiofármaco empleado.

A partir de la imagen de la PET obtenida se realiza una reconstrucción de la misma mediante el algoritmo MLEM (*"Maximun likelihood Expectation Maximitation"*), con corrección por decaimiento dado que la ^{18}F -FDG tiene una vida media de 109,8 min (230). Después, se determinan las regiones de interés (ROI) donde se calcula la radiactividad en esa región en kBq/cm^3 . A partir de la ROI se calcula el SUV (*"Standardized Uptake Values"*) que es la relación de la concentración de radioactividad derivada de la imagen y la concentración de todo el cuerpo de la radioactividad inyectada y tiene unidades de g/cm^3 .

$$SUV = \frac{ROI(\text{kBq}/\text{cm}^3)}{\frac{\text{actividad inyectada (kBq)}}{\text{peso del animal (g)}}} = \text{g}/\text{cm}^3$$

III.C.3.1. Estudio del efecto *in vivo* de ABC en un modelo de inflamación de placas ateroscleróticas

La captación de ^{18}F -FDG a nivel celular se emplea como marcador para evaluar la formación de placas ateroscleróticas asociadas con procesos inflamatorios donde se produce infiltración de macrófagos (231,232) y calcificación de las zonas lesionadas (233). También, se ha visto que hay diferencias en la captación dependiendo del tratamiento farmacológico, la dieta y la cepa empleada (234).

El estudio realizado persiguió determinar si había diferencias en la captación de ^{18}F -FDG en el corazón y la aorta, producida por el tratamiento con ABC y la dieta, con el fin de relacionar dicha variable con la inflamación y el desarrollo de placa aterosclerótica. Se establecieron dos grupos de ratones ApoE KO en función de la alimentación recibida: dieta normal y dieta grasa. La dieta específica se proporcionó durante tres meses y en el último mes se trataron con una concentración de ABC (3 mg/día, 200 μL) equivalente a la dosis del tratamiento humano²⁵ (235) (236) vía oral gracias a una cánula o con agua (100 μL).

Tras el tratamiento, se llevo a cabo la adquisición de la imagen PET-TAC. Inicialmente, se inyectó en el ratón ^{18}F -FDG con una actividad entre $275,4 \pm 26,81$ μCi (media \pm SD) vía i.p. en un volumen aproximadamente de 200 μL . Esta administración se realizó con el animal en ayunas durante un período de 6 a 8 horas, pero con agua *ad libitum*. Pasados 60 minutos de la administración del radiofármaco, se sedó al animal mediante anestesia inhalatoria. La sedación consistió primero en un flujo constante de 1,5 L/m de isoflurano al 5% y 100% de oxígeno durante 5 minutos aproximadamente, y una vez el ratón perdió los reflejos se mantuvo al 1,5-2% de Isoflurano + 100% de oxígeno durante toda la

²⁵ Dosis animal $\left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \text{dosis humana} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) \times \frac{\text{km humano}}{\text{km animal}}$; donde $\text{km humano} = 37$ y $\text{km ratón} = 3$

intervención. A continuación, se obtuvo la imagen de cuerpo completo durante 15 min de PET y 7 min de TAC. Por último, se calculó el valor de la SUV de las zonas de estudio, corazón y aorta.

III.D. COMITÉS ÉTICOS²⁶

Toda la experimentación plasmada en la presente Tesis Doctoral satisface las directrices de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la UV²⁷. En primer lugar, el Comité de Bioseguridad ratificó que las tareas científicas ejecutadas que implicaban el uso de agentes biológicos y químicos cumplían la normativa vigente. En segundo lugar, el Comité de Ética de Investigación en Humanos²⁸ (CEIH) junto con el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia evaluaron y aprobaron los proyectos en los cuales se encuadran los estudios que emplean muestras biológicas de origen humano y datos de carácter personal. Asimismo, todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado. En tercer lugar, y último, el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) –bajo la supervisión de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Comunitat Valenciana– certificó que la experimentación con animales incluida en los proyectos era apropiada y cumplía con la normativa vigente²⁹. Los procedimientos aceptados fueron el A1487170737866 y el A1491990878822.

²⁶ En el apartado *VIII. Certificados* se han anexoado los certificados correspondientes.

²⁷ Reglamento de la Comisión Ética del Consejo de Gobierno de la UV (ACGUV 194/2006).

²⁸ Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS)

²⁹ Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

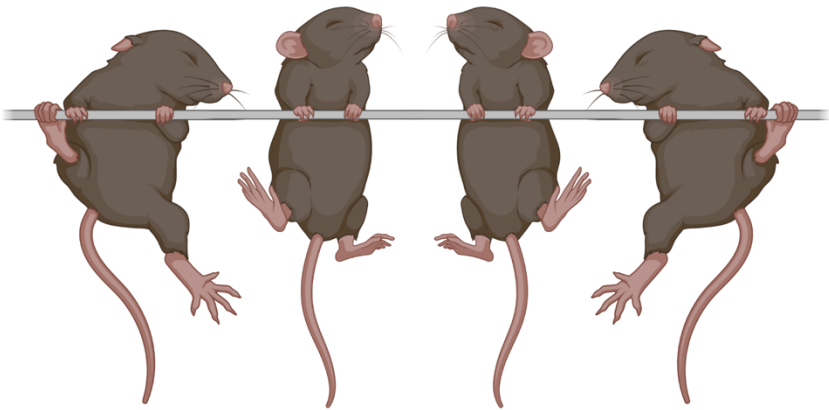
III.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Principalmente, los datos se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Sin embargo, los datos del PET como media \pm desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés). El número de experimentos independientes (n) para cada parámetro se indica en la leyenda de las figuras, siendo este siempre ≥ 4 . Además, algunos parámetros se representaron como porcentaje (%), considerando como 100% el vehículo o control negativo.

En el caso de comparar dos condiciones, se analizaron los resultados mediante un análisis test t. En el caso de comparar más de dos condiciones, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) *one-way* con la corrección *post hoc* más apropiada (indicada en los pies de figura). También, se analizaron los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA) *two-way* cuando habían involucradas dos variables independientes. La diferencia entre los grupos se considera estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$, y esta se detalla en las figuras. Estos análisis se realizaron haciendo uso de GraphPad (Prism[®], versión 9).

IV

RESULTADOS



IV.A. ESTUDIOS *IN VITRO*

IV.A.1. Estudio de los efectos de los fármacos antirretrovirales sobre las distintas fases de la formación del trombo *in vitro*.

IV.A.1.1. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la interacción plaqueta-endotelio

Empleando la adhesión dinámica en cámara paralela de flujo, se estudió el efecto de los diferentes ARV analizados sobre la interacción plaqueta-endotelio. Para ello se trataron las HUVEC y las plaquetas con diferentes concentraciones de ARV, durante 4h y 1h respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron tanto clínicamente relevantes como concentraciones inferiores y superiores con el fin de abarcar un rango amplio de diferentes concentraciones, y así trazar las respectivas curvas dosis-respuesta, garantizando así la observación del efecto en caso de que se diese.

En el caso de los ARV de tipo ITIAN, únicamente ABC (2,5-5 µg/mL) indujo un aumento significativo de la interacción plaqueta-endotelio respecto al control (vehículo) (Figura 47). El resto de ITIAN utilizados –TDF, ddi, 3TC y FTC – no causaron un incremento de la interacción plaqueta-endotelio, incluso a las concentraciones más altas que son las que se muestran en la figura (Figura 47).

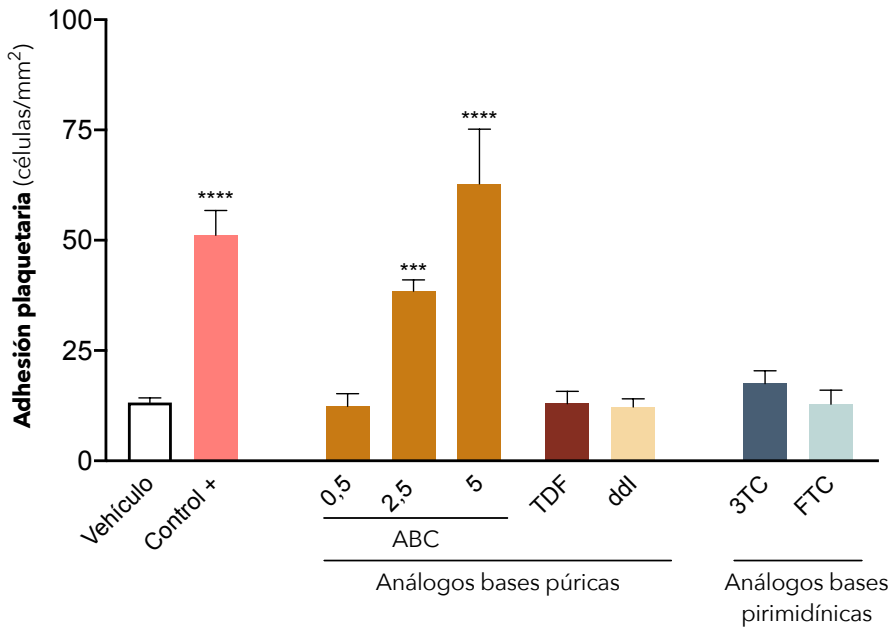


Figura 47. Efecto de ABC y otros ITIAN sobre la interacción plaqueta-endotelio. Las HUVEC (4h) y las plaquetas (1h) fueron tratadas, o bien con agua estéril (vehículo), o bien con abacavir (ABC, 0,5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tenofovir (TDF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), didanosina (ddl, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lamivudina (3TC, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y emtricitabina (FTC, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); como control positivo se utilizó TNF- α (25 ng/mL) y ADP (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) para las HUVEC y las plaquetas, respectivamente. Las plaquetas fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con Alexa 488[®] para así poder cuantificar el número de plaquetas adheridas a las células endoteliales en la cámara paralela de flujo. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm^2 de endotelio; y los resultados se expresan como media \pm SEM ($n > 4$). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

En el caso de los ARV de tipo ITINN evaluados –EFV, NVP y RPV–, todos promovieron la interacción plaqueta-endotelio (Figura 48). Sin embargo, el resto de ARV utilizados de tipo CCR5, IP e INI no provocaron ningún efecto sobre la interacción plaqueta-endotelio, incluso a las concentraciones más altas (Figura 48).

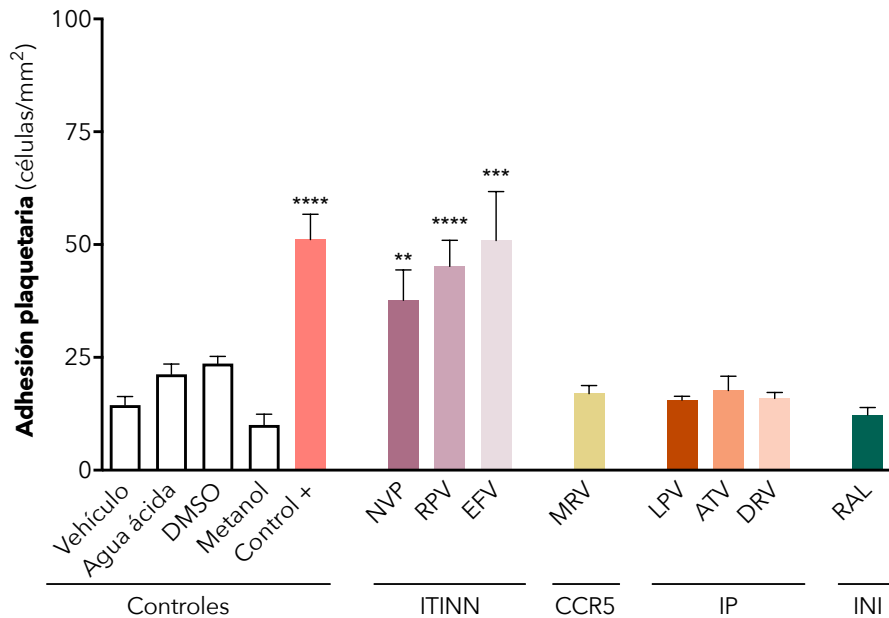


Figura 48. Efecto de los ITINN, CCR5, IP e INI sobre la interacción plaqueta-endothelio. Las HUVEC (4h) y las plaquetas (1h) fueron tratadas, o bien con los vehículos de los fármacos [agua estéril (vehículo), agua ácida (NVP), DMSO (RPV, RAL, ATV y DRV), y metanol (EFV, MVC y LPV)], o bien con nevirapina (NVP, 50 $\mu\text{g/mL}$), rilpivirina (RPV, 1 $\mu\text{g/mL}$), efavirenz (EFV, 25 $\mu\text{g/mL}$), maraviroc (MRV, 5 $\mu\text{g/mL}$), lopinavir (LPV, 25 $\mu\text{g/mL}$), atazanavir (ATV, 25 $\mu\text{g/mL}$), darunavir (DRV, 25 $\mu\text{g/mL}$), y raltegravir (RAL, 5 $\mu\text{g/mL}$); como control positivo se utilizó TNF- α (25 ng/mL) y ADP (5 $\mu\text{mol/L}$) para las HUVEC y las plaquetas, respectivamente. Las plaquetas fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con Alexa 488® para así poder cuantificar el número de plaquetas adheridas a las células endoteliales en la cámara paralela de flujo. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm^2 de endothelio; y los resultados se expresan como media \pm SEM ($n > 4$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos resultados confirman que ABC es el único ITIAN que induce la interacción plaqueta-endothelio y que los ITINN evaluados –NVP, RPV y EFV– también fueron capaces de inducirlo.

IV.A.1.2. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la interacción plaqueta-leucocito

El efecto de los ARV sobre la interacción plaqueta-leucocito se evaluó mediante citometría de flujo, caracterizando la fluorescencia de CD41 de las plaquetas unidas a la subpoblación de neutrófilos. Para ello la sangre entera se trató con concentraciones crecientes de ARV durante 1h y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-CD41-PE (30 min), previamente a la citometría.

De los ARV de tipo ITIAN, al igual que la interacción plaqueta-endotelio, únicamente ABC causó un incremento significativo de la interacción plaqueta-neutrófilo (Figura 49).

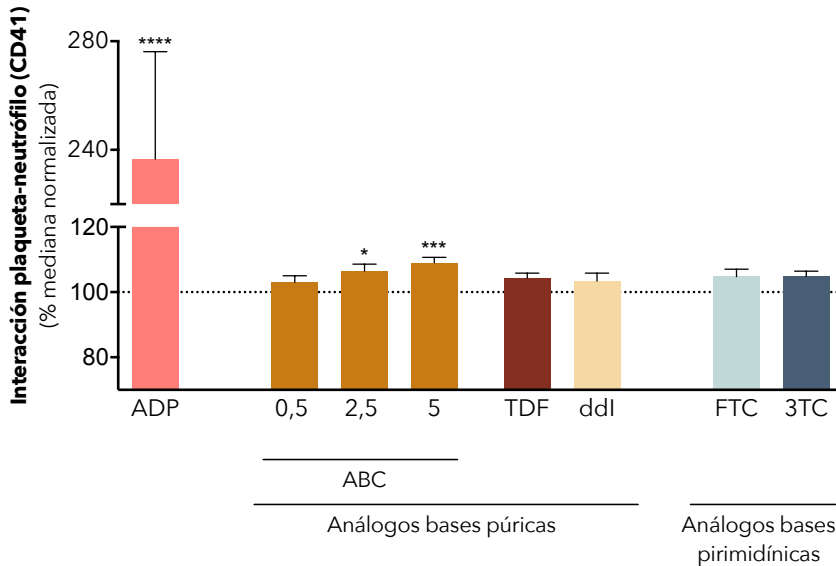


Figura 49. Efecto de ABC y otros ITIAN sobre la interacción plaqueta-neutrófilo. La sangre entera fue incubada 1h a 37° con abacavir (ABC, 0,5-5 µg/mL), tenofovir (TDF, 10 µg/mL), didanosina (ddl, 10 µg/mL), lamivudina (3TC, 10 µg/mL) y emtricitabina (FTC, 10 µg/mL) o vehículo; como control positivo se utilizó ADP (5 µmol/L). Las plaquetas se incubaron con el anticuerpo anti-CD41-PE (10 min) para así cuantificar la fluorescencia de CD41 (marcador específico de plaquetas) en la subpoblación de neutrófilos por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada respecto al vehículo (100%); y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). *p < 0,05, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. vehículo (Test Kruskal-Wallis seguido del post test Dunn).

En cuanto a los ARV de tipo ITINN, la interacción plaqueta-neutrófilo no fue promovida por los mismos (Figura 50). El resto de ARV evaluados –CCR5, IP e INI–, no indujeron la interacción plaqueta-neutrófilo (Figura 50).

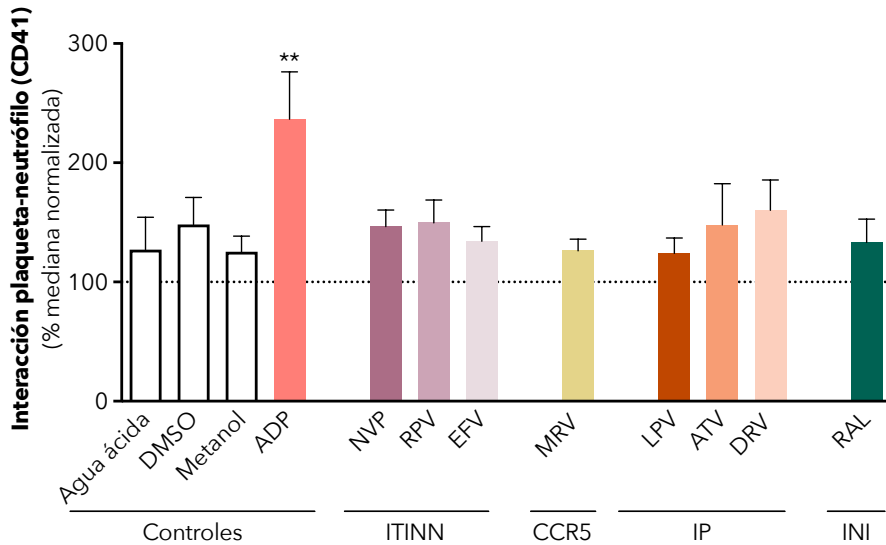


Figura 50. Efecto de los ITINN, CCR5, IP e INI sobre la interacción plaqueta-neutrófilo. La sangre fue incubada 1h a 37°, o bien con nevirapina (NVP, 50 µg/mL), rilpivirina (RPV, 1 µg/mL), efavirenz (EFV, 25 µg/mL), maraviroc (MRV, 5 µg/ml), lopinavir (LPV, 25 µg/mL), atazanavir (ATV, 25 µg/mL), darunavir (DRV, 25 µg/mL), y raltegravir (RAL, 5 µg/mL), o bien con los vehículos [agua estéril, agua ácida (NVP), DMSO (RPV, RAL, ATV y DRV), y metanol (EFV, MVC y LPV)]; como control positivo se utilizó ADP (5 µmol/L). Las plaquetas se incubaron con el anticuerpo anti-CD41-PE (10 min) para así cuantificar la fluorescencia de CD41 (marcador específico de plaquetas) en la subpoblación de neutrófilos por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada respecto al vehículo (agua estéril) (100%); y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). ****p < 0,0001 vs. vehículo (Test Kruskal-Wallis seguido del post test Dunn).

Estos resultados muestran que ABC es el único ARV evaluado que induce la interacción plaqueta-neutrófilo.

IV.A.1.3. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la agregación plaquetaria (interacción plaqueta-plaqueta)

El agregómetro permitió estudiar el efecto de los ARV sobre la agregación plaquetaria, es decir, sobre la interacción plaqueta-plaqueta. Para ello se trató la sangre entera (5 min) con los diferentes ARV y posteriormente se adicionó ADP como agente agregante.

Se determinaron los valores tanto de la pendiente, amplitud y AUC (parámetros propios de la agregación) para cada uno de los tratamientos; no obstante, se muestra AUC normalizada que es el parámetro que engloba a los otros dos, ya que correlaciona pendiente y amplitud.

Ni ABC ni el resto de ITIAN indujeron la potenciación de la agregación plaquetaria inducida por ADP (Figura 51).

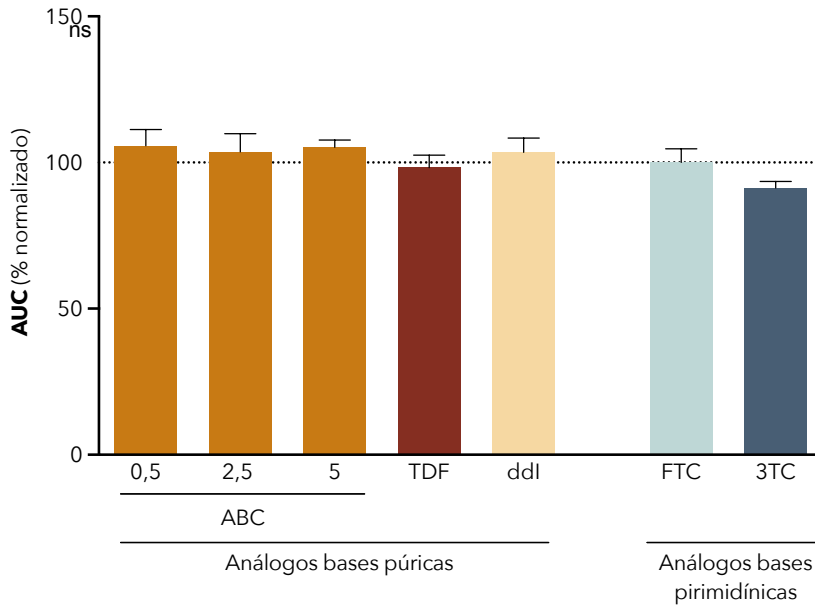


Figura 51. Efecto de ABC y otros ITIAN sobre la agregación plaquetaria inducida por un estímulo positivo. La sangre fue incubada 5 min a 37° con abacavir (ABC, 2,5-5 µg/mL), tenofovir (TDF, 10 µg/mL), didanosina (ddl, 10 µg/mL), lamivudina (3TC, 10 µg/mL) y emtricitabina (FTC, 10 µg/mL) o vehículo (representado como 100%). A continuación, se añadió ADP (5 µM). La figura muestra el AUC normalizada respecto al vehículo y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4) (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Del mismo modo, ningún fármaco del resto de grupos analizados (ITINN, CCR5 e IP) indujo la potenciación de la interacción plaqueta-plaqueta producida por ADP. Sin embargo, RAL –uno de los INI evaluados– si provocó una disminución significativa de la interacción plaqueta-plaqueta causada por ADP (Figura 52).

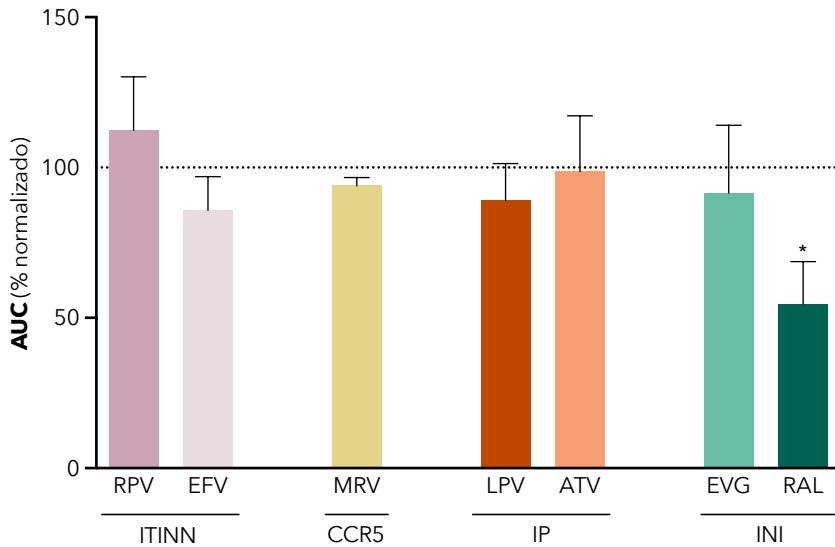


Figura 52. Efecto de los ITINN, CCR5, IP e INI sobre la agregación plaquetaria inducida por un estímulo positivo. La sangre fue incubada 5 min a 37° con rilpivirina (RPV, 1 µg/mL), efavirenz (EFV, 25 µg/mL), maraviroc (MRV, 5 µg/ml), lopinavir (LPV, 25 µg/mL), atazanavir (ATV, 25 µg/mL), elvitegravir (EVG, 10 µg/mL) y raltegravir (RAL, 5 µg/mL) o vehículo (representado como 100%). A continuación, se añadió ADP (5 µM). La figura muestra el AUC normalizada respecto al vehículo y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). *p < 0,05 vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos resultados manifiestan que ni ABC ni el resto de ARV examinados inducen un cambio sobre la agregación plaquetaria. Como excepción, RAL si que reduce la agregación producida por ADP. No obstante, RAL no mostró efecto ni en la interacción plaqueta-endotelio (Figura 48) ni en la interacción plaqueta-leucocito (Figura 50), previamente analizadas.

IV.A.1.4. Evaluación del efecto de los antirretrovirales sobre la activación plaquetaria (expresión de P-selectina y GPIIb/IIIa)

La activación plaquetaria se evaluó mediante citometría de flujo a través del estudio de la expresión de una molécula de adhesión tipo selectina, P-selectina, y de una tipo integrina, GPIIb/IIIa. Ambas son moléculas de adhesión presentes en las plaquetas activadas. Para ello las plaquetas (PRP) se trataron (1h) con los diferentes ARV y posteriormente se incubaron 10 min con el anticuerpo correspondiente. En el caso de P-selectina con el anticuerpo frente a CD62P, y para GPIIb/IIIa con el anticuerpo frente a PAC-1, en ambos casos marcados con FITC.

Los resultados mostraron que ningún ARV analizado inducía la activación plaquetaria, incluso a concentraciones elevadas, ya que ni P-selectina ni GPIIb/IIIa aumentaron en las muestras de PRP tratadas con los ARV (Figura 53 y Figura 54). Estos datos concuerdan con los previos sobre la interacción plaqueta-plaqueta, la cual no era inducida por los ARV, excepto RAL que la reducía.

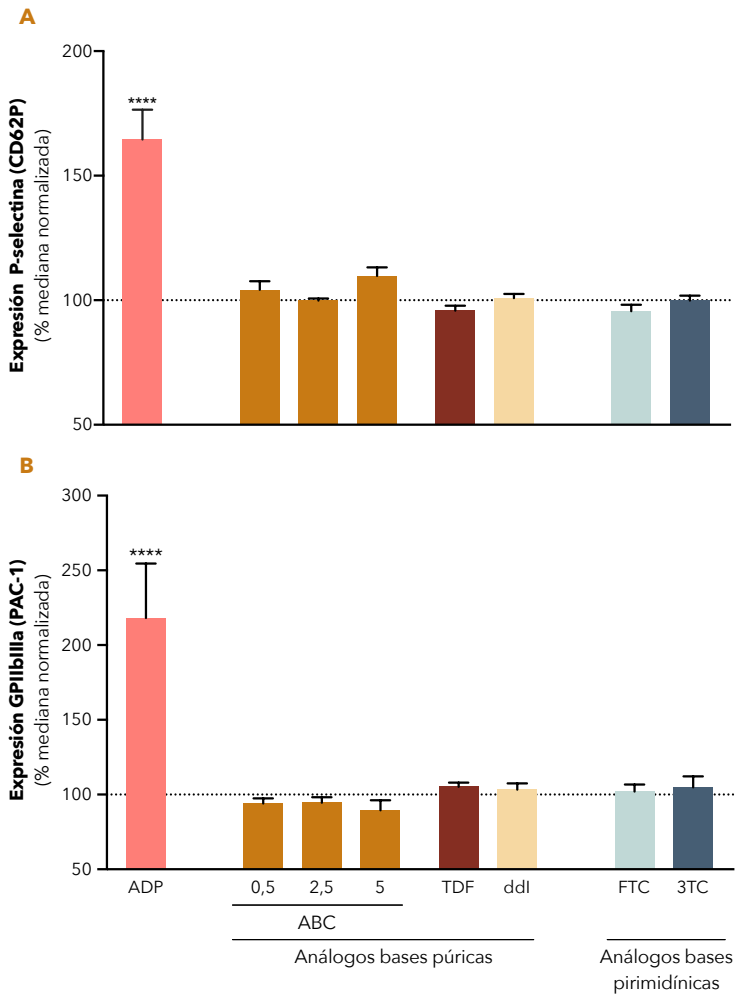


Figura 53. Efecto de ABC y otros ITIAN sobre la activación plaquetaria. El PRP fue incubado 1h a 37° con abacavir (ABC, 0,5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tenofovir (TDF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), didanosina (ddl, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lamivudina (3TC, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y emtricitabina (FTC, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo (100%); como control positivo se utilizó ADP (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Posteriormente, se añadió en oscuridad el anticuerpo correspondiente, CD62P-FITC (P-selectina) y PAC-1-FITC (GPIIb/IIIa) durante 10 min y se analizó por citometría de flujo. La figura **A** muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada de P-selectina respecto al vehículo (100%), y la figura **B**, el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada de GPIIb/IIIa respecto al vehículo (100%). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n > 4). ****p < 0,0001 vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

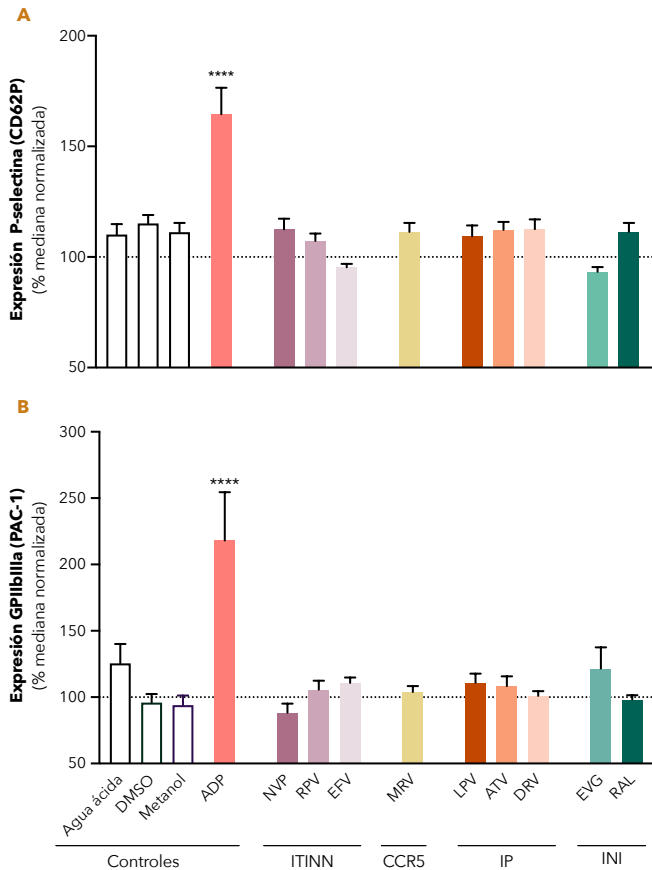


Figura 54. Efecto de los ITINN, CCR5, IP e INI sobre la activación plaquetaria. El PRP fue incubado 1h a 37° con nevirapina (NVP, 50 µg/mL), rilpivirina (RPV, 1 µg/mL), efavirenz (EFV, 25 µg/mL), maraviroc (MRV, 5 µg/ml), lopinavir (LPV, 25 µg/mL), atazanavir (ATV, 25 µg/mL), darunavir (DRV, 25 µg/mL), elvitegravir (EVG, 10 µg/mL) y raltegravir (RAL, 5 µg/mL) o vehículo (100%); como control positivo se utilizó ADP (5 µmol/L). También se incubaron con otros controles agua ácida (NVP), DMSO (RPV, EVG, RAL, ATV y DRV), y metanol (EFV, MVC y LPV), vehículos de los fármacos. Posteriormente, se añadió en oscuridad el anticuerpo correspondiente, CD62P-FITC (P-selectina) y PAC-1-FITC (GPIIb/IIIa) durante 10 min y se analizó por citometría de flujo. La figura **A** muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada de P-selectina respecto al vehículo (100%), y la figura **B**, el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada de GPIIb/IIIa respecto al vehículo (100%). Los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). ****p < 0,0001 vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos datos sugieren que ABC tiene un papel inductor de las interacciones plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito, pero no induce ni activación ni agregación plaquetaria.

IV.A.2. Estudio de los mecanismos por los que ABC tiene efecto protrombótico *in vitro*

Una vez determinado que ABC tiene un efecto sobre distintas fases de la formación del trombo, particularmente sobre la interacción plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito *in vitro*, se evaluaron los posibles mecanismos por los que ABC tiene estos efectos.

IV.A.2.1. Análisis de la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC

IV.A.2.1.1. Determinación del tipo celular implicado

Con el propósito de analizar el papel del endotelio y de la plaqueta en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC se trató de manera específica, o bien las plaquetas, o bien las HUVEC con ABC, ya que en los experimentos previos se habían tratado ambos tipos celulares simultáneamente. Los resultados mostraron que el efecto de ABC como inductor de la interacción plaqueta-endotelio se debe a su acción sobre el endotelio, ya que se observó el incremento de la interacción plaqueta-endotelio cuando se trató selectivamente el endotelio con ABC; mientras que ese efecto no se apreció cuando fueron tratadas únicamente las plaquetas (Figura 55).

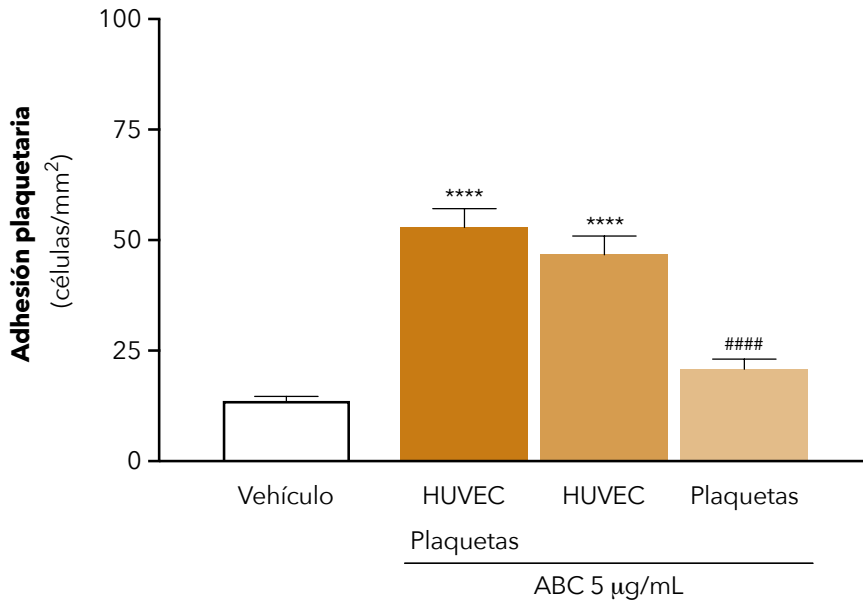


Figura 55. Estudio del tipo celular implicado en la interacción plaqueta-endothelio inducida por ABC. Las HUVEC (4h) y las plaquetas (1h) fueron tratadas, o con agua estéril (vehículo), o con abacavir (ABC, 5 µg/mL). La incubación con ABC fue, o bien de manera conjunta (HUVEC y plaquetas), o bien de manera individual solo en el endothelio o solo en las plaquetas. Las plaquetas fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con Alexa 488® para así poder cuantificar el número de plaquetas adheridas a las células endotheliales en la cámara paralela de flujo. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm² de endothelio; y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). ****p < 0,0001 vs. Vehículo y ####p < 0,0001 vs. plaquetas-HUVEC tratadas con ABC (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos resultados confirman que el efecto de ABC se debe a una acción sobre el endothelio y no sobre las plaquetas, teniendo estas un papel pasivo.

IV.A.2.1.2. Identificación de las moléculas de adhesión implicadas

Con la intención de identificar las moléculas de adhesión implicadas en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC, las HUVEC y plaquetas se pretrataron (15 min) con anticuerpos bloqueantes frente diversas moléculas de adhesión plaquetarias o de células endoteliales.

Las HUVEC fueron pretratadas con los siguientes anticuerpos bloqueantes: anti-ICAM-1, anti-P-selectina y anti-PSGL-1; mientras que las plaquetas con: anti-GPIIb/IIIa, anti-gplb α , anti-JAMC, anti-P-selectina y anti-PSGL-1. Posteriormente, se trataron con ABC (5 μ g/mL) 4h, HUVEC, y 1h, plaquetas, y se determinó la adhesión de las plaquetas al endotelio.

Los resultados mostraron que el efecto de ABC se revertió en presencia de los siguientes anticuerpos bloqueantes: anti-ICAM-1 y anti-P-selectina, en el endotelio, y anti-GPIIb/IIIa y anti-gplb α , en las plaquetas (Figura 56).

Estos datos demuestran que la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC se debe a la participación de las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina, en el endotelio, y GPIIb/IIIa y gplb α , en las plaquetas.

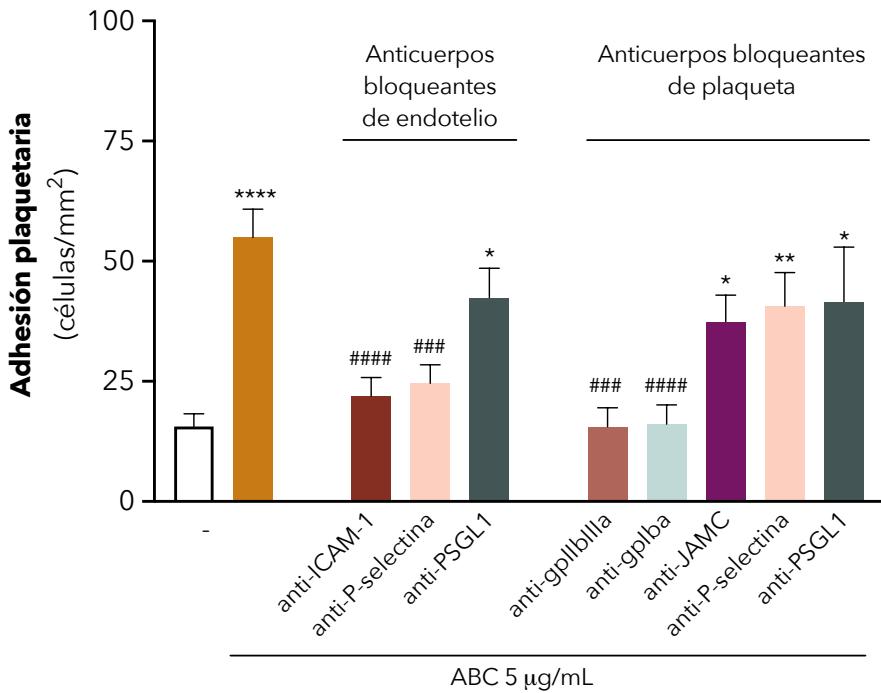


Figura 56. Papel de las moléculas de adhesión involucradas en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC. Las HUVEC y las plaquetas fueron pretratadas (15 min) con anticuerpos bloqueantes frente a diversas moléculas de adhesión. Las HUVEC fueron pretratadas con los siguientes anticuerpos bloqueantes: anti-ICAM-1 (anti-CD54, 20 µg/mL), anti-P-selectina (anti-CD62P, 25 µg/mL) y anti-PSGL-1 (anti-CD162, 5 µg/mL); mientras que las plaquetas con: anti-GPIIb/IIIa (eptifibatida, 0,65 µg/mL), anti-gpIbα (anti-CD42b, 25 µg/mL), anti-JAMC (10 µg/mL), anti-P-selectina (anti-CD62P, 25 µg/mL) y anti-PSGL-1 (anti-CD162, 5 µg/mL). Posteriormente se trataron 4h y 1h (HUVEC y plaquetas, respectivamente) con ABC (5 µg/mL). Las plaquetas fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con Alexa 488® para así poder cuantificar el número de plaquetas adheridas a las células endoteliales en la cámara paralela de flujo. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm² de endotelio; y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001 vs. vehículo (-) y ###p < 0,001 ####p < 0,0001 vs. ABC 5 µg/mL sin anticuerpo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

IV.A.2.1.3. Caracterización de la implicación del sistema purinérgico

El papel de sistema purinérgico en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC se analizó a través del pretratamiento de las HUVEC y las plaquetas con diversos antagonistas y moduladores del sistema purinérgico antes del tratamiento con ABC (5 µg/mL).

Las HUVEC fueron pretratadas con apirasa (ATPasa), suramina (antagonista no selectivo de los receptores P2 ATP), NF023 (antagonista de los receptores P2X₁₋₄), A317491 (antagonista de los receptores P2X_{2,3}) y A804598 (antagonista del receptor P2X₇); y las plaquetas con apirasa, NF449 (antagonista del receptor P2X₁), MRS2500 (antagonista del receptor P2Y₁) y clopidogrel (antagonista del receptor P2Y₁₂).

Los resultados revelaron que el efecto de ABC era revertido cuando las HUVEC eran pretratadas con apirasa, suramina o con el antagonista del receptor P2X₇ A804598, pero no cuando eran pretratadas con NF023 ni con A317491. Este efecto de ABC tampoco fue modulado cuando las plaquetas fueron pretratadas con apirasa, NF449, MRS2500 o clopidogrel ([Figura 57](#)).

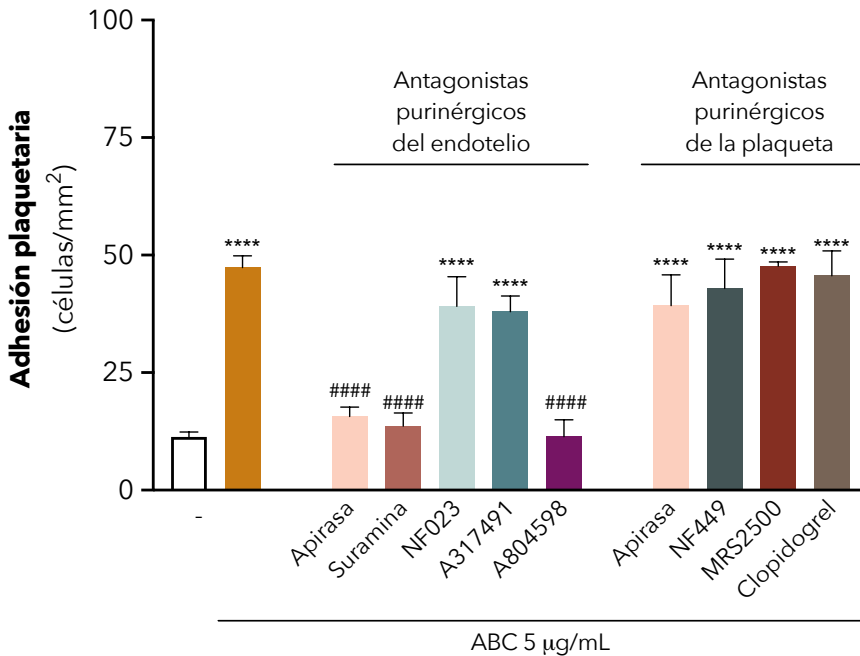


Figura 57. Implicación de los receptores purinérgicos en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC. Las HUVEC y las plaquetas fueron pretratadas con antagonistas de los receptores purinérgicos. Las HUVEC fueron pretratadas con los siguientes antagonistas: apirasa (ATPasa, 1UI/mL, 30 min), suramina (antagonista no selectivo de los receptores P2 ATP, 100 µM, 60 min), NF023 (antagonista P2X₁₋₄, 10 µM, 30 min), A317491 (antagonista P2X₂₋₃, 25 nM, 30 min) y A804598 (antagonista P2X₇, 1 µM, 30 min), antes de tratarse 4h con ABC. Las plaquetas fueron pretratadas con los siguientes antagonistas: apirasa (ATPasa, 1µM, 30 min), NF449 (antagonista P2X₁, 100 µM, 15 min), MRS2500 (antagonista P2Y₁, 100 µM, 15 min) y clopidogrel (antagonista P2Y₁₂, 30 µM, 15 min), antes de tratarse 1h con ABC (5 µg/mL). Las plaquetas fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD41 conjugado con Alexa 488® para así poder cuantificar el número de plaquetas adheridas a las células endoteliales en la cámara paralela de flujo. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm² de endotelio; y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. vehículo (-) y ####p < 0,0001 vs. ABC 5 µg/mL sin antagonista (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Por tanto, los resultados obtenidos muestran el papel clave del receptor endotelial P2X₇ en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC y refuerzan el papel pasivo de las plaquetas.

IV.A.2.2. Análisis de la interacción plaqueta-leucocito inducida por ABC

IV.A.2.2.1. Determinación del tipo celular implicado

El papel del leucocito y de la plaqueta en la interacción plaqueta-leucocito inducida por ABC se analizó mediante el tratamiento específico, o bien de las plaquetas, o bien de los leucocitos con ABC, ya que en los experimentos previos se habían tratado ambos tipos celulares simultáneamente. Los resultados mostraron que el efecto de ABC como inductor de la interacción plaqueta-leucocito involucra directamente al leucocito, ya que se observó el aumento de la interacción plaqueta-leucocito cuando solo los leucocitos fueron tratados con ABC; mientras que ese efecto no se apreció cuando únicamente fueron tratadas las plaquetas (Figura 58).

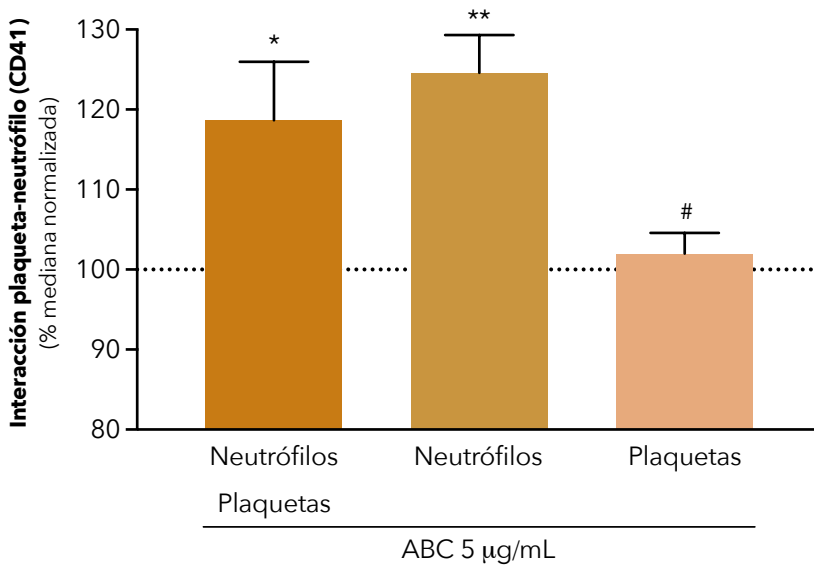


Figura 58. Estudio del tipo celular implicado en la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC. Los neutrófilos y las plaquetas fueron incubados (1h a 37°) con ABC (5 µg/mL) de manera específica o conjunta, o con el vehículo (100%). Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-CD41-PE (10 min) para así cuantificar la fluorescencia de CD41 en las plaquetas adheridas a la subpoblación de neutrófilos por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada respecto al vehículo (100%); y los resultados se expresan como media \pm SEM (n > 4). *p < 0,05, **p < 0,01 vs. vehículo y #p < 0,05 vs. plaquetas-neutrófilos tratadas con ABC (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos resultados confirman que el efecto de ABC se debe a una acción directa sobre los leucocitos y no sobre las plaquetas, teniendo de nuevo las plaquetas un papel pasivo.

IV.A.2.2.2. Identificación de las moléculas de adhesión implicadas

La identificación de las moléculas de adhesión implicadas en la interacción plaqueta-leucocito inducida por ABC se evaluó mediante el pretratamiento con anticuerpos bloqueantes frente a diversas moléculas de adhesión plaquetarias o leucocitarias.

Los leucocitos se pretrataron con los siguientes anticuerpos: anti-CD162, anti-CD11b y anti-CD18; mientras que las plaquetas con anti-CD62P, anti-CD42b y anti-JAMC. Posteriormente, tanto leucocitos como plaquetas se trataron 1h con ABC (5 µg/mL;) y en las plaquetas, además, se añadió el anticuerpo anti-CD41-PE 30 min para poder cuantificar la fluorescencia de CD41 (marcador específico de plaquetas) en la subpoblación de neutrófilos adheridos a las plaquetas.

Los resultados mostraron que el efecto de ABC se mantenía independiente del bloqueo con anti-CD18 y anti-CD11b, en el neutrófilo, y con anti-JAMC, en la plaqueta. Por ende, estas moléculas de adhesión no estarían involucradas en la adhesión plaqueta-leucocito. No obstante, el efecto de ABC sobre la interacción plaqueta-neutrófilo se revirtió al bloquear el neutrófilo con anti-CD162 (PSGL-1) y la plaqueta con anti-CP62P (P-selectina) (Figura 59).

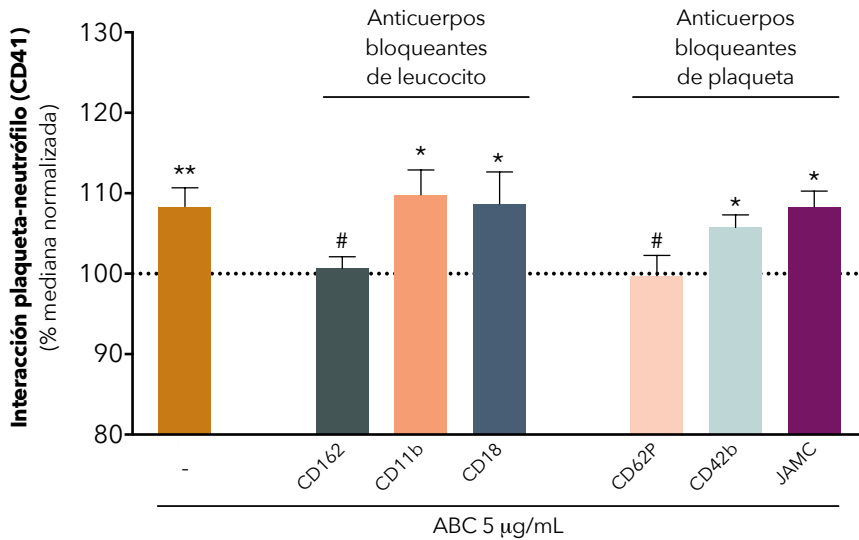


Figura 59. Papel de las moléculas de adhesión en la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC.

La sangre entera fue pretratada (15 min) con anticuerpos bloqueantes frente a diversas moléculas de adhesión antes del tratamiento de 1h con ABC (5 µg/mL) o vehículo (100%). Los anticuerpos bloqueantes frente a moléculas de adhesión presentes en los leucocitos empleados fueron anti-CD162 (PSGL-1, 5 µg/mL) y anti-CD11b/anti-CD18 (Mac-1, 20 y 10 µg/mL respectivamente); y los anticuerpos bloqueantes frente a moléculas de adhesión presentes en las plaquetas empleados fueron anti-CD62P (P-selectina, 25 µg/mL), anti-CD42b (gpIb α , 25 µg/mL) y anti- JAMC (JAMC, 10 µg/mL). La sangre entera se incubó con el anticuerpo anti-CD41-PE (10 min) para así cuantificar la fluorescencia de CD41 (marcador específico de plaquetas) en la subpoblación de neutrófilos adheridos a las plaquetas por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada respecto al vehículo (100%); y los resultados se expresan como media \pm SEM (n > 4). *p < 0,05, **p < 0,01 vs. vehículo y #p < 0,05 vs. sangre tratada con ABC y sin anticuerpo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Estos datos indican que la interacción plaqueta-leucocito inducida por ABC se debe a la molécula de adhesión leucocitaria PSGL-1 interaccionando con P-selectina plaquetaria.

IV.A.2.2.3. Caracterización de la implicación sistema purinérgico

El papel de sistema purinérgico en el efecto de ABC sobre la interacción plaqueta-leucocito se analizó a través del pretratamiento de la sangre entera con diversos antagonistas de los receptores purinérgicos, antes del tratamiento con ABC (5 µg/mL).

La sangre entera fue pretratada tanto con antagonistas purinérgicos del leucocito – A317491 (antagonista de los receptores P2X_{2,3}) y A804598 (antagonista del receptor P2X₇)– como de la plaqueta –NF449 (antagonista del receptor P2X₁), MRS2500 (antagonista del receptor P2Y₁) y clopidogrel (antagonista del receptor P2Y₁₂)–.

Los resultados revelaron que el efecto de ABC se revirtió cuando la sangre entera fue pretratada con el antagonista del receptor P2X₇ leucocitario A804598, y también con los antagonistas de los receptores P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂, plaquetarios NF449, MRS2500 y clopidogrel, respectivamente (Figura 60).

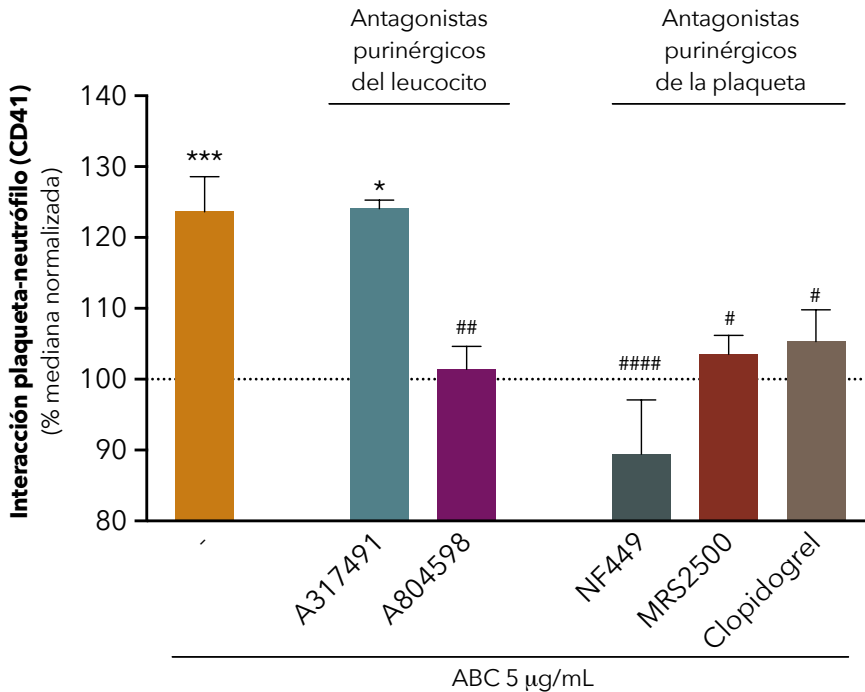


Figura 60. Implicación de los receptores purinérgicos en la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC.

La sangre entera fue pretratada con antagonistas de los receptores purinérgicos antes del tratamiento de 1h con ABC (5 µg/mL) o vehículo (100%). Los antagonistas empleados fueron A317491 (antagonista P2X_{2,3}, 25 nM, 30 min), A804598 (antagonista P2X₇, 1µM, 30 min), NF449 (antagonista P2X₁, 100 µM, 15 min), MRS2500 (antagonista P2Y₁, 100 µM, 15 min) y clopidogrel (antagonista P2Y₁₂, 30 µM, 15 min). La sangre entera se incubó con el anticuerpo anti-CD41-PE (10 min) para así cuantificar la fluorescencia de CD41 (marcador específico de plaquetas) en la subpoblación plaquetas que se encuentran adheridas a neutrófilos por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de la mediana de fluorescencia normalizada respecto al vehículo (100%); y los resultados se expresan como media ± SEM (n > 4). **p< 0,01 vs. vehículo y #p< 0,05, ##p<0,01, ####p<0,0001 vs. sangre tratada con ABC 5 µg/mL sin antagonista (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Por tanto, los resultados obtenidos revalidan el papel clave del receptor leucocitario P2X₇ en los efectos producidos por ABC. Este receptor está implicado tanto en la interacción plaqueta-endotelio como plaqueta-leucocito inducida por ABC. Asimismo, los resultados también señalan el papel de los receptores purinérgicos plaquetarios, P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂.

IV.B. ESTUDIOS *IN VIVO*

IV.B.1. Estudio del efecto de los fármacos antirretrovirales en un modelo de generación del trombo *in vivo*

IV.B.1.1. Evaluación del efecto de los antirretrovirales en el modelo de trombosis inducida por FeCl₃ *in vivo*

IV.B.1.1.1. Estandarización del modelo de trombosis inducida por FeCl₃

Antes de evaluar el efecto de los ARV, se puso a punto el modelo de trombosis inducida por FeCl₃. Para ello se emplearon concentraciones crecientes de FeCl₃ (25-100 mM), confeccionando así la curva dosis-respuesta de FeCl₃ (Figura 61). El FeCl₃ se perfundió sobre el cremáster del ratón y se determinó el tiempo de oclusión arterial a través del microscopio intravital.

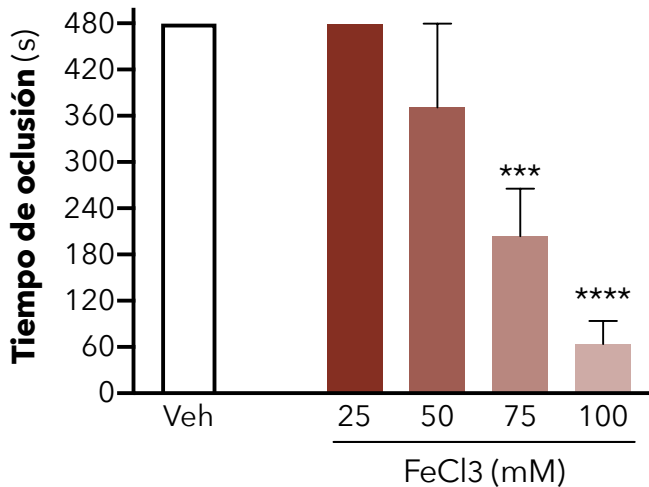


Figura 61. Curva dosis-respuesta de FeCl₃. 80 μ L de FeCl₃ a diferentes concentraciones (25-100 mM) fueron perfundidas sobre el cremáster del ratón y se determinó el tiempo necesario para que se obstruyera la arteria hasta un tiempo máximo de 8 min. A partir de los 8 min se consideró que no se producía la oclusión arterial. La figura muestra el tiempo de oclusión, equivalente al tiempo necesario para la formación del trombo; y los resultados se expresan como media \pm SEM ($n \geq 4$) *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ vs. FeCl₃ 25 mM (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Se observa que las concentraciones de 75 y 100 mM de FeCl₃ indujeron de forma significativa una reducción en el tiempo de oclusión de la arteria que no se dio para las concentraciones de 25 y 50 mM (Figura 61). Así, la concentración seleccionada para el resto de los experimentos fue la de 25 mM, ya que *per se* no indujo la trombosis, pero se considera que si que predispone a ella.

IV.B.1.1.2. Efecto de los antirretrovirales en el modelo de trombosis inducida por FeCl_3

La evaluación del efecto de los diferentes ARV sobre la trombogénesis *in vivo* se llevó a cabo mediante el tratamiento vía intraescrotal con los diferentes ARV como se describe en la [Figura 42](#) de *III.C. Métodos: técnicas in vivo*, y posterior cuantificación del tiempo de oclusión. Como estímulo positivo los ratones fueron tratados con rofecoxib (0,1 mg/kg, 2h, vía peritoneal) o con diclofenaco (1 mg/kg, 2h, vía peritoneal). Ambos fármacos son inhibidores de la COX-2.

Los ratones fueron tratados con diferentes concentraciones de ARV y posteriormente, recibieron el estímulo de FeCl_3 25 mM. Las concentraciones de ARV empleadas mimetizaron las concentraciones plasmáticas locales de los pacientes con VIH o fueron superiores. Los resultados obtenidos revelaron que el único ITIAN evaluado que fue capaz de inducir la formación del trombo fue ABC, ya que el tiempo de oclusión disminuyó significativamente respecto al vehículo, ([Figura 62](#) y [Figura 63](#)). El efecto de ABC fue similar al de otros fármacos cuyo efecto trombótico está perfectamente descrito como diclofenaco o rofecoxib.

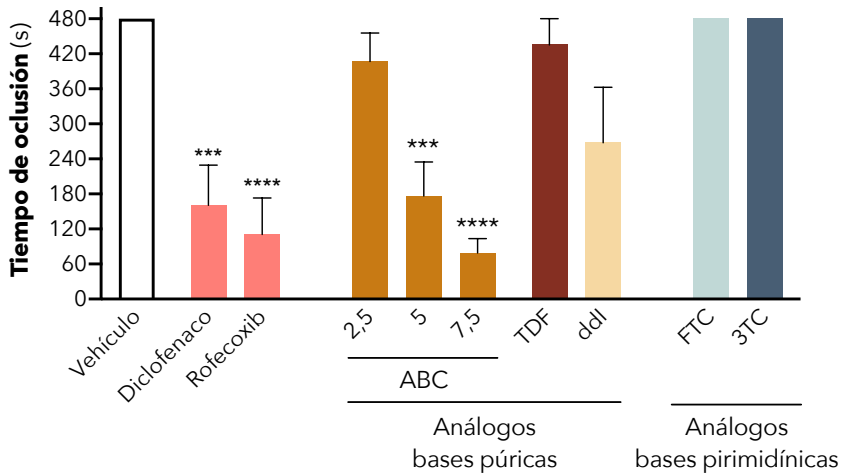


Figura 62. Efecto de ABC y otros ITIAN sobre la formación del trombo en las arteriolas cremastéricas. Los ratones fueron tratados, o bien vía intraescrotal con 100 μ L de salino (vehículo), abacavir (ABC, 2,5 - 7,5 μ g/mL), tenofovir (TDF, 7,5 μ g/mL), didanosina (ddl, 7,5 μ g/mL), emtricitabina (FTC, 7,5 μ g/mL), y lamivudina (3TC, 7,5 μ g/mL) durante 4h, o bien por vía intraperitoneal con los estímulos positivos diclofenaco (1 mg/kg) o rofecoxib (0,1 mg/kg) durante 2h. Tras el tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μ L de FeCl_3 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuvieran el flujo o hasta un máximo de 8 min. La figura muestra el tiempo de oclusión empleado. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n \geq 4$) *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. vehículo (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

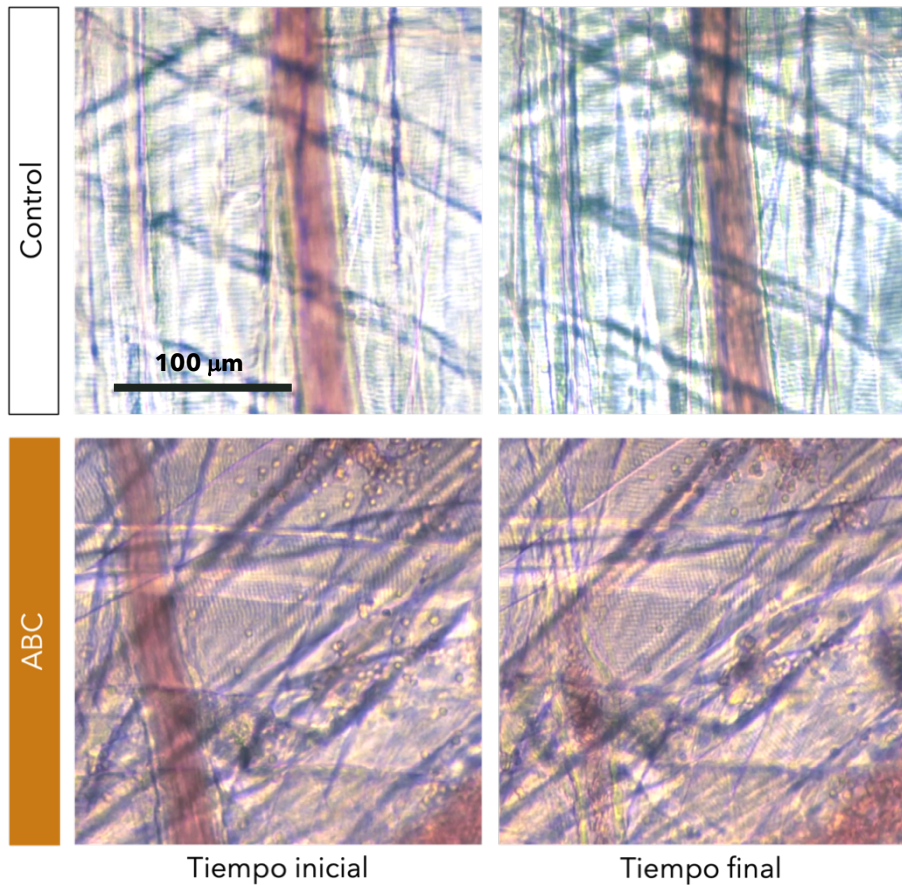


Figura 63. Imágenes representativas de la generación del trombo inducida por ABC en arteriolas del cremáster. En la parte superior se muestran dos imágenes de un ratón control a distintos tiempos (tiempo inicial = 5 s y tiempo final = 480 s); mientras que la parte inferior se muestran dos imágenes de un ratón tratado con ABC 5 mg/mL (tiempo inicial = 5 s y tiempo final = 110 s). En ambos casos, las arteriolas fueron perfundidas con FeCl_3 25 mM.

Para el resto de ARV, incluso a concentraciones elevadas, no se observó ningún efecto protrombótico (Figura 64).

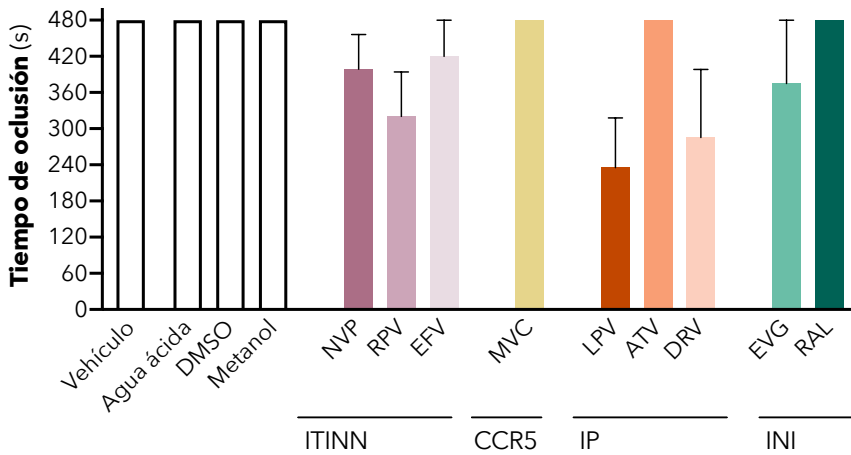


Figura 64. Efecto de los ITINN, CCR5, IP e INI sobre la formación del trombo en las arteriolas cremastéricas. Los ratones fueron tratados vía intraescrotal con 100 μ L del vehículo del fármaco [agua ácida (NVP), DMSO (RPV, ATV, DRV, EVG y RAL) y metanol (EFV, MVC y LPV)], nevirapina (NVP, 7,5 μ g/mL), rilpivirina (RPV, 0,4 μ g/mL), efavirenz (EFV, 7,5 μ g/mL), maraviroc (MVC, 2,5 μ g/mL), lopinavir (LPV, 7,5 μ g/mL), atazanavir (ATV, 18 μ g/mL), darunavir (DRV, 14 μ g/mL), elvitegravir (EVG, 7,5 μ g/mL) o raltegravir (RAL, 2,5 μ g/mL) durante 4h. Tras el tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μ L de FeCl_3 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuvieran el flujo o hasta un máximo de 8 min. La figura muestra el tiempo de oclusión. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n \geq 4$) (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Otro parámetro analizado fue la fuerza de cizallamiento (“shear rate”) que indica la presión que ejerce el flujo sobre las paredes del vaso. Los resultados mostraron como a la fuerza del flujo disminuye de forma directamente proporcional a la velocidad del flujo, es decir, conforme el flujo se iba ralentizando la fuerza disminuyó hasta tender a cero cuando se terminó de ocluir el vaso, observándose que ABC a las concentraciones de 5 y de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ consigue ocluir completamente el vaso (Figura 65).

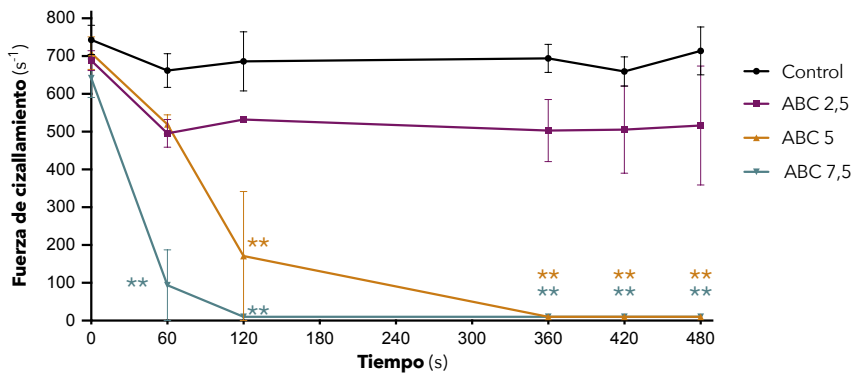


Figura 65. Efecto del ABC sobre la fuerza de cizallamiento. Los ratones fueron tratados vía intraescrotal, o bien con 100 μL de salino (vehículo), o bien con abacavir (ABC, 2,5 - 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 4h. Tras el tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μL de FeCl_3 25 mM. La figura muestra la evolución de la fuerza de cizallamiento en función del tiempo. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n \geq 4$) ** $p < 0,01$ vs control/tiempo (ANOVA- 2 vías seguido del post-test Dunnett).

IV.B.2. Estudio de los mecanismos por los que ABC tiene efecto protrombótico *in vivo*

Tras determinar que ABC tiene un efecto protrombótico *in vivo*, se estudiaron los posibles mecanismos por los que tenía ese efecto. Por un lado, se analizó el papel del leucocito; y por otro, la implicación del sistema de receptores purinérgicos, ya que ambos mecanismos tenían una implicación en los efectos de ABC *in vitro*.

IV.B.2.1. Análisis del papel leucocitario en el modelo de trombosis inducida por ABC: modelo leucopénico

Para determinar el papel del leucocito en el efecto protrombótico de ABC se estableció un modelo murino de leucopenia inducido por ciclofosfamida (CPM). La CPM es un fármaco que induce una depleción en el número de leucocitos. De este modo, 150 mg/kg de CPM se administraron vía intraperitoneal (día 1). Al cabo de 4 días, se observó que se produjo no solo una reducción de más del 80% del número total de leucocitos respecto a la cantidad inicial (Figura 66. A), sino que también se demostró una reducción significativa en cada una de las subpoblaciones leucocitarias: linfocitos (Figura 66. B), neutrófilos (Figura 66. C) y monocitos (Figura 66. D).

Resultados

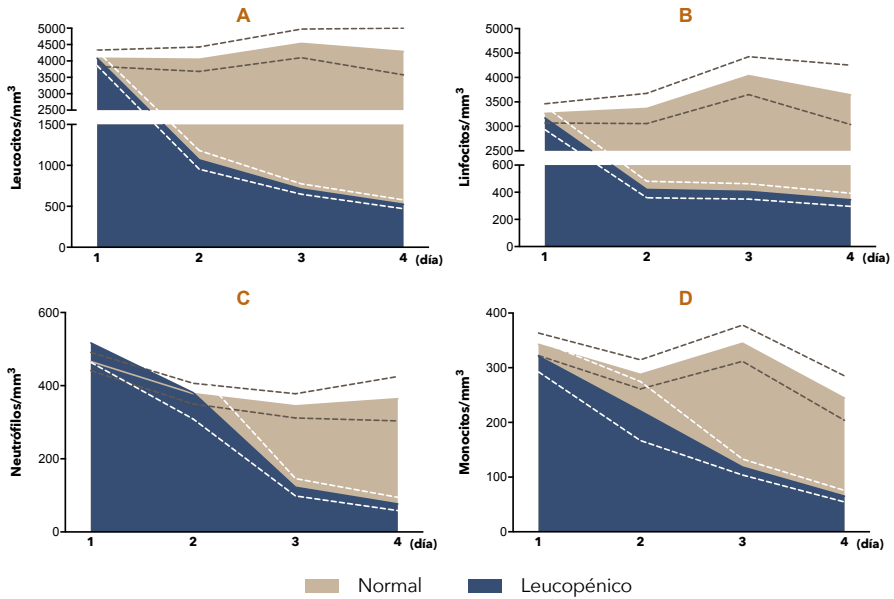


Figura 66. Generación del modelo leucopénico. Comparación evolutiva del número de leucocitos (linfocitos, monocitos y neutrófilos) tras el tratamiento por vía intraperitoneal con 150 mg/kg de ciclofosfamida. Las figuras muestran la evolución en el tiempo del número de **A.** leucocitos/mm³ de sangre, **B.** linfocitos/mm³ de sangre, **C.** neutrófilos/mm³ de sangre y **D.** monocitos/mm³ de sangre.

Una vez validado el modelo leucopénico, se llevó a cabo el modelo de trombosis inducida por FeCl₃, después del tratamiento de 4h con ABC 5 µg/mL (Figura 67).

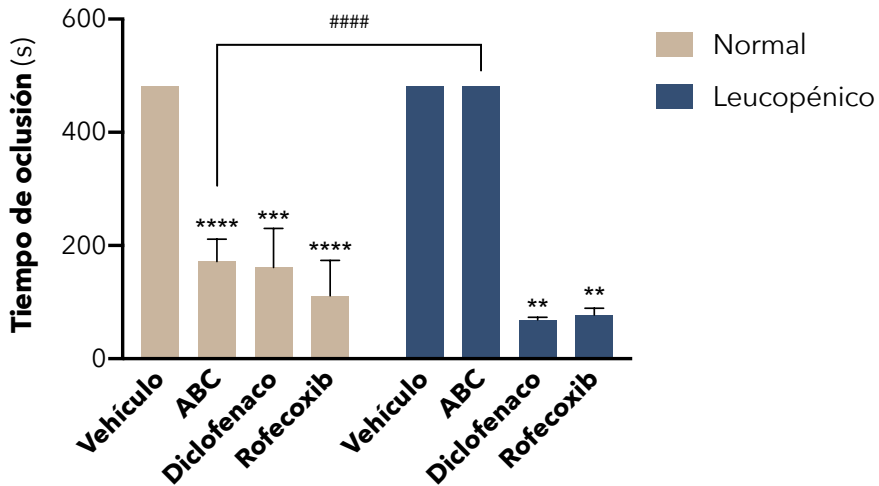


Figura 67. Determinación del papel del leucocito en el efecto protrombótico de ABC. El grupo leucopénico fue tratado con ciclofosfamida (CPM, 150 mg/kg, vía intraperitoneal) 4 días antes del tratamiento con los fármacos evaluados o con los controles. Tras los 4 días, los ratones fueron tratados 4h con salino (vehículo), con ABC (5 μ g/mL), o con rofecoxib o diclofenaco (1 mg/kg, 2h, vía intraperitoneal), –ambos inhibidores de la COX-2 (controles positivos)–. Después del tratamiento, el cremáster fue extraído y superfundido con 80 μ L de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas durante 8 min o hasta que se detuviera el flujo. La figura muestra el tiempo de oclusión. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n \geq 4$) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ vs vehículo correspondiente; #### $p < 0,0001$ vs grupo normal con ABC (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Los resultados obtenidos indicaron que el efecto protrombótico de ABC estaba mediado por los leucocitos, ya que en animales deficientes en leucocitos el efecto de ABC no se puso de manifiesto, mientras que el de otros agentes protrombóticos como rofecoxib o diclofenaco se siguió manteniendo a pesar de esta ausencia de los leucocitos.

IV.B.2.2. Análisis de la implicación del sistema purinérgico en el modelo de trombosis inducida por ABC

En primer lugar, se evaluaron los receptores purinérgicos implicados en la trombosis inducida por ABC en el modelo de FeCl₃ mediante el pretratamiento (30 min) con antagonistas específicos de los receptores P2X_{2,3} y P2X₇, A317491 y A804598, respectivamente, vía intraperitoneal, antes del tratamiento con ABC 5 µg/mL vía intraescrotal durante 4 h.

Los resultados mostraron que el pretratamiento con A317491 no modificó los efectos de ABC, mientras que el pretratamiento con A804598 fue capaz de revertir el efecto protrombótico inducido por ABC; demostrando que el receptor P2X₇ participa en este mecanismo (Figura 68).

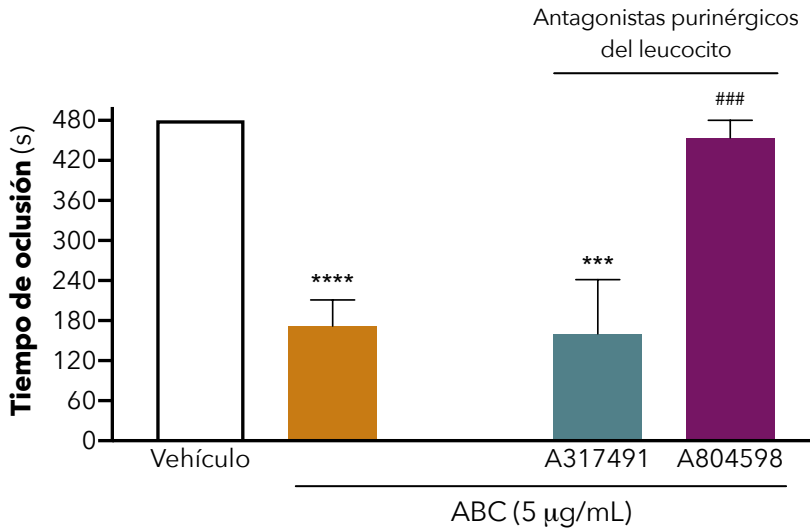


Figura 68. Implicación de los receptores purinérgicos en el efecto protrombótico de ABC. Los ratones fueron pretratados durante 30 min con los antagonistas purinérgicos A317491 (antagonista del receptor P2X₂₋₃, 0,1 µg/kg,) y A804598 (antagonista del receptor P2X₇, 1µg/kg,) antes de ser tratados con ABC 5 µg/mL. o con salino (vehículo). Tras el tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuvo el flujo durante un tiempo máximo de 8 min. La figura muestra el tiempo de oclusión. Los resultados se expresan como media ± SEM (n ≥ 4) ***p<0,001, ****p<0,0001 vs. vehículo y ###p< 0,001 vs ABC sin antagonista (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

Además, la implicación del receptor P2X₇ en esta respuesta fue también demostrada en animales deficientes en el receptor P2X₇ (Figura 69), en los que ABC no indujo efecto protrombótico, mientras que los fármacos diclofenaco y rofecoxib mantuvieron el efecto trombótico.

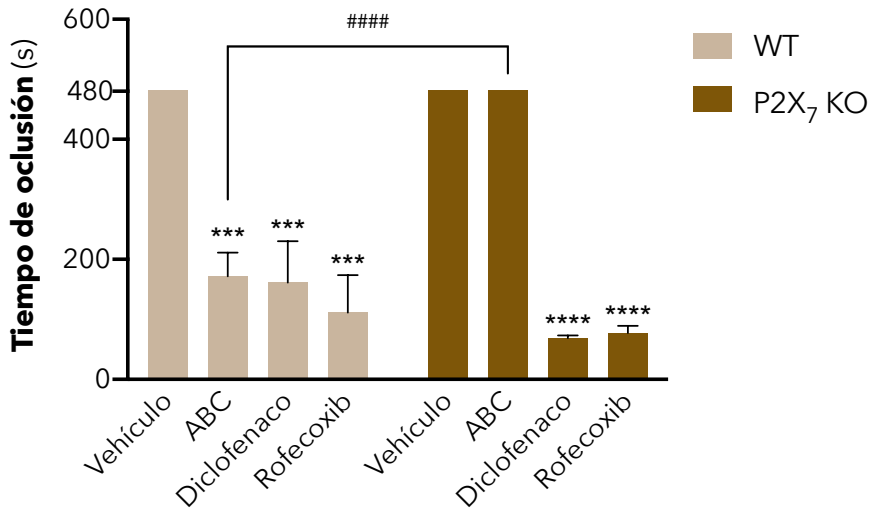


Figura 69. Implicación del receptor P2X₇ en el efecto protrombótico de ABC. Ambos grupos de ratones, cepa salvaje (WT) y cepa deficiente en el receptor P2X₇ (P2X₇ KO) fueron tratados 4h con salino (vehículo), con ABC (5 µg/mL), con diclofenaco o con rofecoxib (1 mg/kg y 0,1 mg/kg – respectivamente–, 2h, vía peritoneal), –ambos inhibidores de la COX-2 (controles positivos)–. Después del tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuvo el flujo durante un tiempo máximo de 8 min. La figura muestra el tiempo de oclusión. Los resultados se expresan como media ± SEM (n ≥ 4) ***p<0,001 y ****p<0,0001 vs vehículo correspondiente; ####p<0,0001 vs grupo WT con ABC (ANOVA seguido del post-test Dunnett).

IV.B.3. Estudio del efecto de ABC en un modelo de inflamación de placas ateroscleróticas

Con el propósito de profundizar en el papel de ABC sobre la inflamación se empleó la PET, usando ^{18}F -FDG como radiomarcador, ya que es una técnica validada que permite relacionar el estado inflamatorio de la placa aterosclerótica –esencial para la patofisiología de la placa– con la captación de ^{18}F -FDG (237-241). Esta relación se basa en la composición celular de las zonas inflamadas, donde hay una alta densidad de macrófagos que son los responsables de dicha captación. Esta captación se cuantificó mediante el SUV (g/cm^3) que es el valor estándar de captación del radiomarcador.

IV.B.3.1. Análisis del efecto de ABC en función de la dieta en el modelo de aterosclerosis: ApoE KO

La evaluación del efecto proinflamatorio de ABC se analizó utilizando un modelo murino deficiente en la apolipoproteína E (ApoE KO), modelo aterosclerótico validado (242). Además, los ratones fueron divididos en dos grupos en función de la dieta recibida; las dietas que se utilizaron fueron: dieta normal (DN) y dieta grasa (DG). Esta alimentación específica fue efectuada durante tres meses con el propósito de acrecentar el desarrollo de placas ateroscleróticas. Durante el último mes, los animales fueron tratados con ABC (3 mg/día) o con vehículo (agua) vía oral. Tras el tratamiento, se cuantificó la captación de ^{18}F -FDG en la región del miocardio y en la aorta con el fin de determinar el estado inflamatorio (Figura 71).

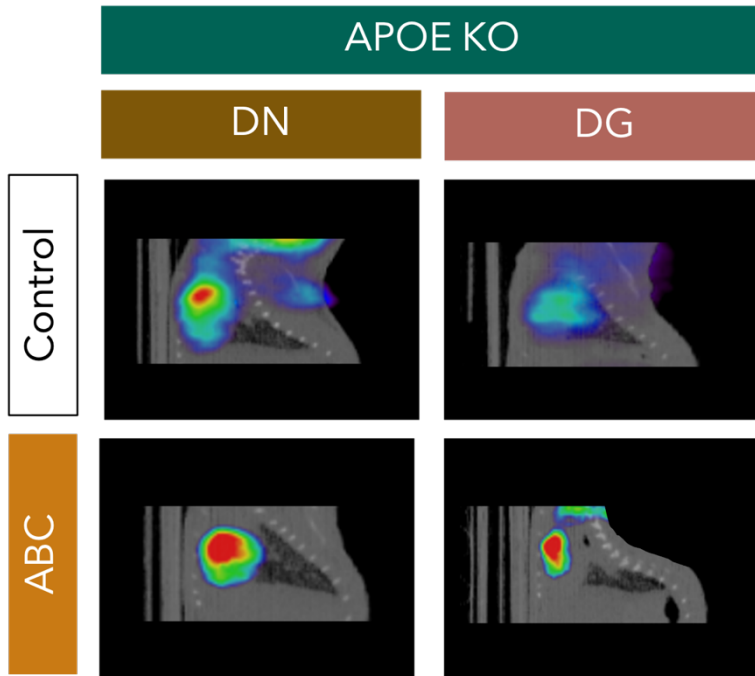


Figura 70. Imágenes representativas de la PET de la zona del corazón (vista sagital). Cada imagen representa una condición de dieta y de tratamiento [control o abacavir (ABC)]. * *Dieta normal (DN); dieta grasa (DG).*

Por un lado, los resultados mostraron que el tratamiento con ABC respecto al control causó un aumento de la captación de ^{18}F -FDG, en ambos grupos (DN y DG) (Figura 71). En el caso del grupo alimentado con DN, el incremento de la captación de ^{18}F -FDG fue significativo. Por otro lado, los resultados mostraron que la captación de ^{18}F -FDG fue menor en los animales alimentados con DG respecto a las condiciones análogas con DN (Figura 71).

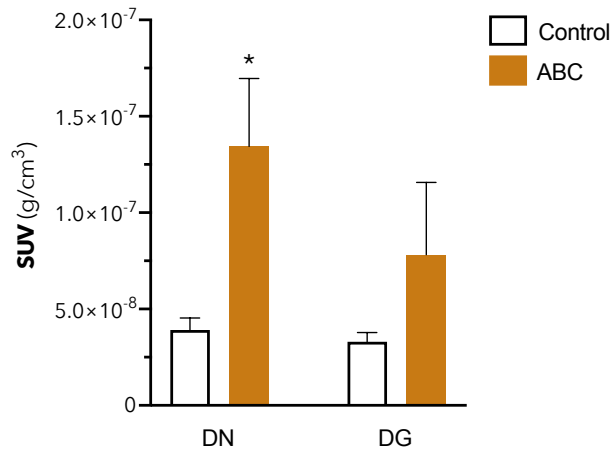


Figura 71. Efecto de la dieta y el tratamiento sobre la captación de ¹⁸F-FDG en el modelo aterosclerótico. Los ratones fueron tratados, o con ABC (3 mg/día) o con vehículo (agua) durante 3 meses vía oral. Durante el tratamiento fueron alimentados, o bien con dieta normal (DN), o bien con dieta grasa (DG). Después del tratamiento, se llevó a cabo la captación de ¹⁸F-FDG a través de la PET. La figura muestra la SUV y los resultados se expresan como media ± SEM (n≥4) *p<0,05 vs. control (Test t).

Pese a que los resultados respecto a la dieta obtenidos no fueron los esperados, ya que se presupuso que la DG conllevaría a un aumento de la captación de ¹⁸F-FDG dado que es un factor de riesgo en el desarrollo de las placas de ateroma, si que demostró que el tratamiento crónico de ABC promueve el desarrollo dependiente de la placa aterosclerótica.

V

DISCUSIÓN



En los últimos 30 años, la introducción de la TARc para el tratamiento de la infección por el VIH ha permitido considerar el SIDA como una enfermedad crónica en lugar de como enfermedad mortal. Sin embargo, el uso de la TARc ha sido asociado con la aparición de diversos efectos adversos, entre ellos las ECV (243,244). Es difícil establecer el alcance de cada uno de los fármacos de manera independiente, debido al hecho de que estos se pautan de manera combinada. ABC –que se ha empleado extensamente en las pautas posológicas de los pacientes infectados por VIH desde 1998 y que es considerado por la OMS como medicamento esencial desde 2002– ha sido asociado con el doble de riesgo de desarrollar MI (140). La relación entre ABC y la probabilidad de sufrir MI se señaló por primera vez en 2005 (137), y el estudio multicohorte D:A:D confirmó dicha relación en 2008 (138). Esta asociación fue corroborada por otras investigaciones (245–249) e incluso un estudio D:A:D posterior puntualizó que ABC podía constituir un factor de riesgo en pacientes con otros factores de riesgo CV preexistentes (139). Paralelamente a estos estudios, otros ensayos –incluidos los de la FDA– no advirtieron la correlación entre ABC y el aumento en la frecuencia de eventos CV (250–252). Esto originó la tan dilatada controversia entorno al uso de ABC en la terapéutica contra la infección por el VIH, que hoy en día sigue vigente. Tanto la falta de consenso entre los datos clínicos de diferentes grupos (253) como la ausencia de un mecanismo molecular de acción claro que justifique la cardiotoxicidad de ABC acrecientan, todavía, la polémica alrededor de este ARV.

Clínicamente se ha asociado a ABC con una respuesta inflamatoria vascular aguda (138). En este sentido, se relacionó a ABC con los procesos iniciales de la inflamación vascular y la disfunción plaquetaria a consecuencia de la disminución de la enzima NOS (144). Además, nuestro grupo demostró que ABC, a concentraciones clínicamente relevantes (5 µg/mL), tiene un efecto proinflamatorio ya que promueve el aumento de la interacción leucocito-endotelio tanto *in vitro* como *in vivo* (146,254). Esta interacción constituye el primer paso en el desarrollo

de las ECV con componente inflamatorio (255). También, se estableció que dicha interacción está mediada por las moléculas de adhesión Mac-1 leucocitaria e ICAM-1 endotelial (146). Asimismo, nuestro grupo observó que únicamente ABC y ddl favorecían esa interacción; mientras que AZT, 3TC, FTC y TDF no fueron capaces de inducirla (256). Este hecho se correlacionó con la estructura química de los ARV, ya que –a pesar de que todos son ITIAN– ABC y ddl son análogos de purina, AZT, 3TC y FTC son análogos de pirimidina, y TDF es análogo de nucleótido y no de nucleósido como el resto (Figura 18). Consecuentemente, nuestro grupo se planteó la participación del sistema purinérgico en los efectos CV desencadenados por ABC, debido a su similitud estructural con la guanina y las purinas endógenas (ATP, ADP, AMP, etc.), y logró establecer el papel del receptor P2X₇ leucocitario como mediador de la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC (257).

Las purinas endógenas son moléculas esenciales ya que participan en las principales vías de señalización celular paracrina, interactuando con los receptores vasculares de nucleótidos P₂, que a su vez desencadenan tanto procesos proinflamatorios como protrombóticos (258,259). Esto se traduce en la activación y la acumulación de leucocitos sobre el endotelio, en la activación plaquetaria, culminando en la formación de la placa aterosclerótica. El papel de la plaqueta es fundamental para pasar de un proceso inflamatorio a un proceso trombótico (260). Hay estudios que señalan el papel ABC sobre la función plaquetaria (145,261-263); no obstante, estos ensayos abarcan exclusivamente la agregación o la activación plaquetaria, y no contemplan la interacción de la plaqueta con otras células vasculares y sanguíneas (como las células endoteliales y/o leucocitos).

En la presente Tesis Doctoral se ha perseguido profundizar en los efectos de ABC y de otros fármacos antirretrovirales sobre la función plaquetaria analizando su efecto sobre la reactividad plaquetaria (activación y agregación) y sobre la adhesión

plaquetaria a otras células vasculares –concretamente a las endoteliales y a los leucocitos–, procesos fundamentales durante la trombogénesis (149). Para ello, se evaluó el tipo celular, las moléculas de adhesión y los receptores purinérgicos involucrados en dichas interacciones *in vitro*. Del mismo modo, se ha tratado de perfilar el efecto proinflamatorio y protrombótico de ABC y de otros antirretrovirales *in vivo*. Así, se ha demostrado que ABC no induce activación ni agregación plaquetaria, pero sí que es capaz de provocar interacciones plaqueta-endotelio e interacciones plaqueta-leucocito a concentraciones clínicamente relevantes. Además, *in vivo* es capaz de promover la generación del trombo en el modelo de trombosis inducido por FeCl₃ y de agravar el estado inflamatorio en el modelo murino de aterosclerosis ApoE KO. Por el contrario, el resto de ARV analizados (TDF, ddi, FTC, 3TC, NVP, RPV, EFV, MRV, LPV, ATV, DRV, EVG y RAL) no indujeron ni *in vitro* ni *in vivo* ninguna de estas respuestas protrombóticas. Únicamente los ITININ NVP, RPV y EFV causaron un aumento en las interacciones de las plaquetas con el endotelio y el INI RAL produjo un descenso de la agregación plaquetaria inducida por ADP.

La reactividad plaquetaria involucra tanto la activación como la agregación plaquetaria. En ciertas condiciones patológicas se promueve una reactividad permanente y exacerbada desarrollando lo que se conoce como reactividad plaquetaria alta (HPR) o hiperreactividad plaquetaria (264). Esta condición es considerada factor de riesgo tanto de trombosis como de MI (265). En cuanto a la activación plaquetaria (medida como expresión de P-selectina y GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo), nuestros resultados señalaron que tanto ABC como el resto de ARV evaluados no fueron capaces de inducirla en PRP (Figura 53 y Figura 54). Esto concuerda con otros estudios donde se observó que la administración *ex vivo* de ABC en la sangre de donantes sanos no suscitaba la expresión de marcadores propios de la activación plaquetaria, incluso a concentraciones elevadas (80 µg/mL); excepto en un estudio donde se reportó que ABC inducía una potenciación

de la agregación plaquetaria inducida por ADP (145). En este sentido, otros ensayos donde se evalúa la sangre de pacientes con VIH, cuya pauta incluye ABC, concluyen la existencia de una hiperactividad plaquetaria (261-263). Respecto al efecto sobre la agregación plaquetaria –evaluada con un agregómetro de impedancia–, nuestros resultados demostraron que ABC no fue capaz de inducirla ni de potenciar el efecto agregante de ADP. Estos resultados estarían en concordancia con el hecho de que ABC tampoco fue capaz de inducir la expresión en plaquetas de la molécula de adhesión responsable de la agregación plaquetaria GPIIb/IIIa. El resto de los fármacos evaluados, tampoco tuvieron efecto sobre la agregación a excepción de RAL (ARV tipo INI) que produjo una reducción de la agregación inducida por ADP (5 μ M) (Figura 51 y Figura 52). Esto concuerda con otros estudios donde se ha visto que los pacientes con un régimen basado en RAL presentan una reducción en la hiperreactividad plaquetaria y en la adhesión plaqueta-monocito (266). En definitiva, nuestros resultados sugieren que ABC no produce ningún efecto directo sobre las plaquetas (estimulación) o sobre la interacción de las plaquetas con otras plaquetas.

A pesar de que ABC no tuvo efecto sobre la agregación entre plaquetas, para la formación del trombo también son importantes otros procesos en los que las plaquetas interactúan con otras células vasculares como el endotelio o los leucocitos. En el proceso de adhesión plaqueta-endotelio determinada mediante la cámara paralela de flujo, el único ITIAN evaluado que favoreció significativamente esta interacción fue ABC (Figura 47). El efecto de ABC fue dosis dependiente y, concretamente, la concentración clínicamente relevante (5 μ g/mL) produjo un efecto similar al estímulo positivo. Esto está en línea con los resultados previos del grupo sobre el reclutamiento de los leucocitos por parte del endotelio, con la salvedad de la ddl que no causó interacción plaqueta-endotelio pero sí la interacción de leucocitos con el endotelio (256,267,268). Asimismo, todos los ITINN

evaluados (NVP, RPV y EFV) si indujeron la interacción plaqueta-endotelio; mientras que el resto de ARV evaluados no (Figura 48). Estos resultados están en consonancia con el efecto de estos fármacos sobre la interacción leucocito-endotelio (148). De hecho, a EFV y RPV se les ha asociado mayor riesgo de desarrollar arritmias cardíacas (111).

Con el propósito de profundizar en el tipo celular sobre el que actúa ABC para inducir la interacción de las plaquetas con el endotelio, se trató selectivamente las células endoteliales y/o las plaquetas con ABC para así determinar la contribución de cada tipo celular. Cuando fueron tratadas únicamente las células endoteliales y no las plaquetas con ABC, se observó un efecto similar en la interacción plaqueta-endotelio a cuando se trataron ambos tipos celulares. Por el contrario, cuando fueron tratadas las plaquetas y no las células endoteliales no se observó la adhesión plaquetaria sobre el endotelio (Figura 55). Estos resultados demuestran que ABC promueve la unión de las plaquetas al endotelio, paso crucial en la trombogénesis, y subrayan que la principal diana de acción de ABC son las células endoteliales, mientras que las plaquetas desempeñan un papel pasivo. No obstante, a pesar de que ha demostrado que ABC no induce directamente la activación o la agregación plaquetaria *in vitro*, no se puede descartar que la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC, promueva a *posteriori* la activación y la agregación plaquetaria. Ello estaría en concordancia con que la hiperactividad plaquetaria inducida por ABC y señalada anteriormente en estudios clínicos realizados en pacientes infectados por VIH y en tratamiento con ABC que es secundaria a una acción previa *in vivo* de ABC sobre el endotelio o sobre otros elementos vasculares que indirectamente activarían a las plaquetas (269).

Una vez ABC estimula el endotelio, la interacción con las plaquetas circulantes está mediada por moléculas de adhesión específicas de cada tipo celular (Figura 72). En este sentido, se observó que las moléculas implicadas en esta adhesión fueron, por

un lado, la P-selectina e ICAM-1 endoteliales que son inducibles interaccionando con GPIb α y GPIIb/IIIa plaquetarias constitutivas, respectivamente (Figura 56) (270,271), ya que el bloqueo de otras moléculas de adhesión como PSGL-1 endotelial o JAMC, PSGL-1 y P-selectina plaquetarias no alteró los efectos de ABC. Estos resultados sugieren que el fármaco estaría mediando el rodamiento de plaquetas a través de la interacción de P-selectina endotelial (inducible) con GPIb α plaquetaria (constitutiva), mientras que la unión de ICAM-1 endotelial (inducible) con GPIIb/IIIa (constitutiva) sería responsable del proceso de adhesión (260).

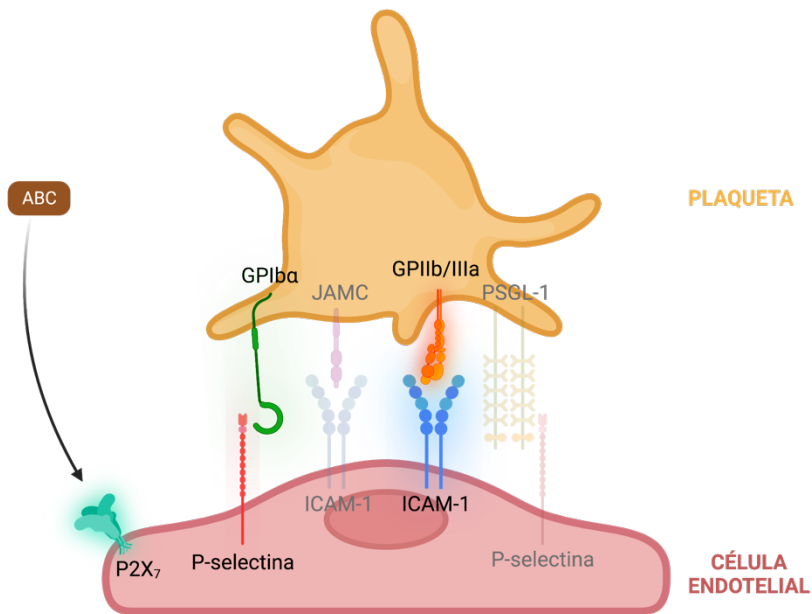


Figura 72. Interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC. La interacción plaqueta-endotelio está mediada por diferentes moléculas de adhesión (todas ellas indicadas). Las moléculas de adhesión que están involucradas en el efecto de ABC están marcadas sin transparencia, siendo GPIb α plaquetaria con P-selectina endotelial y GPIIb/IIIa plaquetaria con ICAM-1 endotelial. Asimismo, se indica que el receptor purinérgico implicado es el P2X₇ presente en el endotelio.

Al analizar la participación del sistema purinérgico en la interacción plaqueta-endotelio producida por ABC, se demostró la implicación del receptor P2X₇ – receptor expresado en leucocitos y en células endoteliales, pero no en plaquetas– en esta respuesta (Figura 72). En primer lugar, el pretratamiento del endotelio con apirasa o con suramina, que son una ATPasa que degrada el ATP y un antagonista no selectivo de los receptores P2, respectivamente, bloqueó el efecto de ABC (Figura 57). Además, el efecto de ABC no se observó con el pretratamiento de las células endoteliales con A804598, antagonista selectivo del receptor P2X₇ (Figura 57). Pero, por el contrario, no se apreció la reversión del efecto de ABC con el pretratamiento de las células endoteliales con otros antagonistas como NF023 y A317491, que bloquean los receptores P2X₁₋₄ y P2X₂₋₃, respectivamente (Figura 57). Del mismo modo, el pretratamiento de las plaquetas con clopidogrel (P2Y₁₂), MRS2500 (P2Y₁) y NF449 (P2X₁), antagonistas de los receptores P2 plaquetarios (67), no tuvo ningún efecto sobre la acción de ABC en la adhesión plaqueta-endotelio (Figura 57). El hecho de que la apirasa bloqueara el efecto de ABC y otros resultados del grupo en los que la apirasa no fue capaz de hidrolizar ABC, pero sí ATP, demostró el papel del ATP de forma indirecta en esta respuesta y fue la base para demostrar que el ABC actúa como modulador alostérico del receptor P2X₇ (272).

Por otro lado, en la interacción de las plaquetas con los leucocitos –paso importante en el desarrollo del trombo– evaluada por citometría de flujo a través de la expresión del marcador de plaquetas en la población leucocitaria de neutrófilos, se observó que el único ARV que, a concentraciones clínicamente relevantes, indujo específicamente esta interacción fue ABC de forma concentración-dependiente (Figura 49). El resto de ARV no promovieron la adhesión plaqueta-leucocito incluso a concentraciones elevadas (Figura 50).

Al igual que en la interacción plaqueta-endotelio, también se determinó la trascendencia del tipo celular en la adhesión plaqueta-leucocito inducida por ABC tratando selectivamente un tipo celular. Cuando fueron tratados los neutrófilos y no las plaquetas, se observó un efecto similar en la interacción plaqueta-neutrófilo al observado cuando se trataron ambos tipos celulares. Por el contrario, cuando fueron tratadas las plaquetas y no los neutrófilos, no se advirtió la adhesión plaquetaria sobre el leucocito (Figura 58). En esta ocasión, se determinó que el papel de ABC recae sobre el neutrófilo, siendo este la célula diana de ABC. Esto remarca de nuevo el papel pasivo que tienen las plaquetas en los efectos inducidos por ABC.

En referencia a las moléculas de adhesión específicas involucradas en la interacción plaqueta-neutrófilo (Figura 73), se determinó la implicación de PSGL-1 del neutrófilo (expresada constitutivamente) y de P-selectina de la plaqueta, ya que cuando se pretrató cada uno de estos tipos celulares con anticuerpos frente a estas moléculas, la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC fue revertida. También, se demostró que el efecto de ABC sobre la adhesión plaquetaria al neutrófilo es independiente de la molécula de adhesión leucocitaria, Mac-1, y de las moléculas de adhesión plaquetarias, GPIIb α y JAMC (Figura 59).

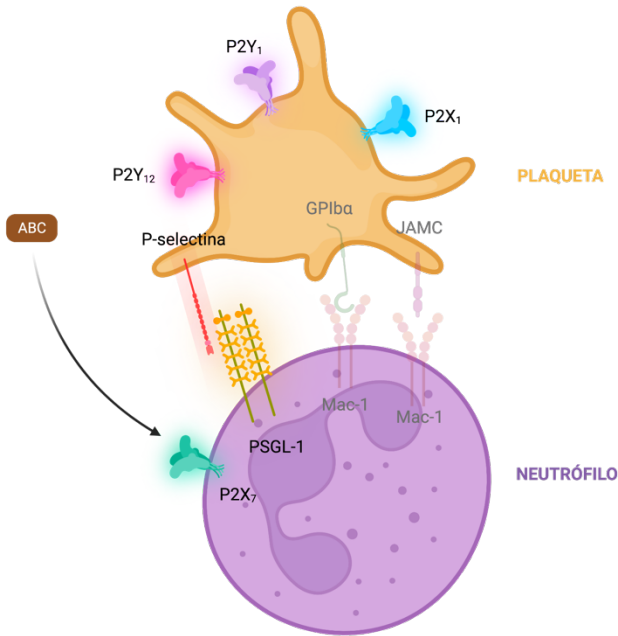


Figura 73. Interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC. La interacción plaqueta-neutrófilo está mediada por diferentes moléculas de adhesión (todas ellas indicadas). Las moléculas de adhesión que están involucradas en el efecto de ABC están marcadas sin transparencia, siendo P-selectina plaquetaria con PSGL-1 leucocitaria. Asimismo, se indican los receptores purinérgicos implicados en esta respuesta: P2X₇ leucocitario y P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂ plaquetarios.

Asimismo, la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC está mediada por el receptor P2X₇ leucocitario (Figura 73), ya que esta fue revertida cuando los leucocitos fueron pretratados con el antagonista selectivo del receptor P2X₇, A804598, y no con A317491, antagonista selectivo del receptor P2X₂₋₃. Además, el efecto de ABC también fue prevenido con el pretratamiento de las plaquetas con clopidogrel (P2Y₁₂), MRS2500 (P2Y₁) y NF449 (P2X₁), antagonistas de los receptores P2 plaquetarios (67), demostrando que estos receptores purinérgicos también tienen un papel en esta respuesta (Figura 60 y Figura 73).

Estos resultados están en sintonía con los previos en los que la plaqueta tenía un papel pasivo, pero algunos de los datos obtenidos en esta tesis podrían ser contradictorios con esta afirmación. Así, P-selectina participa en la interacción plaqueta-neutrófilo inducida por ABC y, para ello, su expresión se tendría que inducir y, en nuestras condiciones, ABC no induce la expresión de P-selectina. Además, los receptores plaquetarios P2Y₁₂, P2Y₁ y P2X₁, también, participan en esta respuesta. Nuestra hipótesis sería que al activarse el receptor P2X₇ leucocitario, el leucocito liberaría algún mediador que fuera capaz de activar los receptores purinérgicos plaquetarios –P2Y₁₂, P2Y₁ y P2X₁– (273), y, como consecuencia, inducir la expresión de P-selectina plaquetaria que se uniría a PSGL-1 leucocitaria estableciendo la interacción entre ambos tipos celulares. Estudios adicionales serían necesarios estudios adicionales a este nivel para determinar si es correcta esta hipótesis.

En lo referente al efecto protrombótico de los ARV evaluados *in vivo*, se empleó el modelo validado de trombosis inducida por FeCl₃. Se ha demostrado que es una herramienta efectiva para el estudio de las vías implicadas en la trombogénesis y que permite analizar los efectos pro- y antitrombóticos de los fármacos (220). El FeCl₃ es un agente químico que provoca daño endotelial a concentraciones lo suficientemente altas que da lugar directamente a la inducción de trombosis; sin embargo, a concentraciones bajas predispone a las arteriolas a los efectos trombogénicos de otros agentes potencialmente nocivos administrados conjuntamente. En nuestro caso, se perfundió FeCl₃ a una concentración 25 mM, concentración que *per se* no indujo la oclusión de las arteriolas del cremáster (Figura 61). Nuestros ensayos demostraron que el único ARV administrado localmente, vía intraescrotal, que promovió la formación de los trombos arteriales fue ABC a concentraciones clínicamente relevantes (257,274). Este efecto es dosis dependiente y específico de ABC, ya que ningún otro ARV lo reprodujo, incluso a

concentraciones altas (Figura 62 y Figura 64). Además, sus efectos fueron similares en magnitud a los de otros fármacos que se han relacionado con el riesgo de MI como diclofenaco o rofecoxib y que actúan a través de la inhibición de COX-2, mecanismo de acción distinto al ABC. Estos resultados son compatibles con los resultados *in vitro* e *in vivo* previos, donde se expone que ABC es un agente inflamatorio capaz de desencadenar procesos precursores de la trombogénesis como la interacción plaqueta-endotelio o leucocito-endotelio (146,256,267).

Posteriormente, se identificó que el efecto de ABC *in vivo* está mediado por los leucocitos y por el receptor P2X₇. En cuanto al papel del leucocito, este se puso de relevancia gracias al modelo leucopénico inducido por CPM (221,275). La administración de este compuesto provoca una depleción en el número de leucocitos en los ratones. En el grupo de ratones deficientes en leucocitos, ABC no fue capaz de inducir un efecto protrombótico (Figura 67). Por tanto, estos datos confirman el papel angular de los leucocitos en el efecto protrombótico de ABC. Estos resultados fueron validados por el hecho de que el efecto protrombótico de otros agentes trombóticos como diclofenaco o rofecoxib persistió en los animales leucopénicos. Ambos fármacos están correlacionados claramente con un mayor riesgo de MI (276,277) y, además, se conoce su mecanismo de acción, el cual conlleva la inhibición de la producción de prostaciclina endotelial tras la inhibición de la COX-2. También se atribuyó un papel al receptor P2X₇ en el efecto protrombótico *in vivo* de ABC, ya que dicho efecto se revirtió cuando los ratones fueron pretratados con A804598, antagonista específico del receptor P2X₇, y no con A317491, antagonista específico del receptor P2X_{2,3} (Figura 68). Estos resultados fueron validados en los ratones deficientes en el receptor P2X₇, en los que ABC no provocó ningún efecto protrombótico, mientras que los fármacos diclofenaco y rofecoxib sí (Figura 69). Estos resultados están en consonancia con la bien conocida conexión entre el receptor purinérgico P2X₇ y las respuestas inflamatorias vasculares (259), y, también, con la más reciente asociación entre este receptor y

patologías cardiovasculares como la trombosis. Asimismo, resaltar que este receptor es objeto de estudio en muchas otras investigaciones actuales debido a sus particularidades estructurales y funcionales. Se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, etc.), enfermedades renales (enfermedad renal poliquística, nefritis, etc.), enfermedades pulmonares (síndrome de distrés respiratorio agudo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), gota y cáncer (278). Estos resultados *in vivo* también están en línea con los resultados previos *in vitro* descritos en la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, con el propósito de ir un paso hacia delante en el ámbito clínico, concretamente en dirección a la aterosclerosis se utilizó un modelo murino deficiente en la Apo E. Esta proteína presenta un interés particular en el desarrollo de la aterosclerosis por sus propiedades ateroprotectoras, al unirse a LDL y mediar así la eliminación de estas últimas (279). Asimismo, se ha visto, recientemente, que la Apo E puede controlar la liberación de microvesículas que modulan la inflamación y, por ende, la propia aterosclerosis (280). Por tanto, la deficiencia de esta proteína está asociada a una mayor probabilidad de aterosclerosis (281,282). En este sentido, los ratones deficientes en la Apo E presentan una mayor predisposición a desarrollar ateromas. Para realizar los experimentos, los ratones fueron alimentados con dos dietas diferentes, normal y grasa, para ver también como influía este factor en el efecto de ABC. En cuanto al efecto *per se* de ABC, los resultados que se obtuvieron señalaron que el tratamiento crónico durante un mes tiene un efecto proinflamatorio (Figura 71). Esto concuerda con el carácter proinflamatorio de ABC y remarca a ABC como factor de riesgo ante unas condiciones CV comprometidas preexistentes (139). No obstante, los resultados obtenidos en función de la dieta no fueron los esperados inicialmente, ya que se esperaba observar una mayor inflamación en los ratones alimentados con dieta

grasa. Una posible explicación de este hallazgo se debe al ayuno previo al cual son sometidos los animales para llevar a cabo la técnica. Este ayuno provocaría una inhibición del metabolismo de la glucosa en el miocardio debido a que el metabolismo que está inducido es el de los ácidos grasos (ciclo de Randle), a diferencia de otros órganos que solo pueden emplear como fuente de energía la glucosa (283).

En resumen, a pesar de que ABC no induce ni la activación ni la agregación plaquetaria, si promueve pasos previos como son la interacción plaqueta-endotelio o la interacción plaqueta-neutrófilo. Esto se debe fundamentalmente a la activación endotelial o leucocitaria a través de la activación de los receptores P2X₇ que posteriormente desencadenarían la adhesión de las plaquetas sobre ambos tipos celulares gracias a la interacción de diferentes moléculas de adhesión. En el caso de la interacción plaqueta-endotelio, interacciona la P-selectina e ICAM-1 del endotelio con GPIIb/IIIa y GPIb α de las plaquetas. En el caso de la interacción plaqueta-neutrófilo, interacciona PSGL-1 del neutrófilo con P-selectina de la plaqueta. Estas interacciones constituyen etapas claves de la trombogénesis (Figura 74). Por último, ABC no solo induce las etapas pretrombóticas sino que también tiene la capacidad de generar las condiciones que promueven la formación del trombo *in vivo* a través de una acción en la que participa el receptor purinérgico P2X₇.

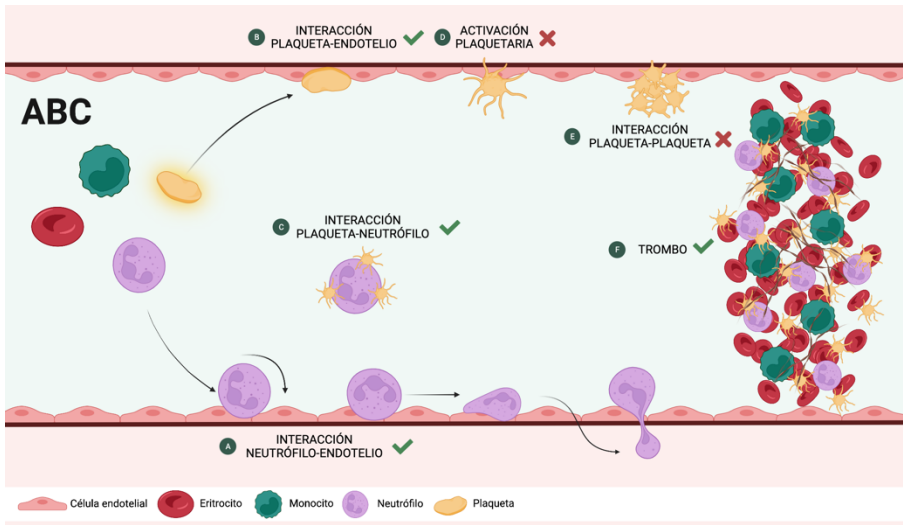


Figura 74. Diagrama del efecto de ABC en los diferentes procesos involucrados en la trombogénesis. ABC induce las interacciones neutrófilo-endotelio (A), plaqueta-endotelio (B) y plaqueta-neutrófilo (C); mientras que no tiene un efecto directo sobre la activación (D) y agregación plaquetaria (E). Finalmente, todas estas interacciones desencadenan en la formación del trombo (F).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral contribuyen a esbozar el perfil de acciones de protrombóticas de ABC que es compatible con la inducción de inflamación vascular y apuntan a una posible explicación farmacológica para la asociación de ABC con las enfermedades vasculares. No obstante, se ha de tener precaución al extrapolar datos experimentales a un entorno clínico, ya que es posible que no reflejen completamente lo que sucede en los seres humanos. Estudios similares en muestras de pacientes infectados por VIH y en tratamiento con ABC o con otros antirretrovirales serían necesarios para poder caracterizar completamente esta respuesta.

VI

CONCLUSIONES



1. Abacavir no induce activación ni agregación plaquetaria, pero sí que es capaz de provocar interacciones plaqueta-endotelio e interacciones plaqueta-leucocito a concentraciones clínicamente relevantes. Además, *in vivo* es capaz de promover la generación del trombo en el modelo de trombosis inducido por FeCl₃ y de agravar el estado inflamatorio en el modelo murino de aterosclerosis ApoE KO.
2. El resto de ARV analizados (TDF, ddl, FTC, 3TC, NVP, RPV, EFV, MRV, LPV, ATV, DRV, EVG y RAL) no indujeron ni *in vitro* ni *in vivo* ninguna de estas respuestas protrombóticas. Únicamente los ITININ NVP, RPV y EFV causaron un aumento en las interacciones de las plaquetas con el endotelio y el INI RAL produjo un descenso de la agregación plaquetaria inducida por ADP.
3. Las interacciones plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito inducidas por ABC se deben a la acción de ABC sobre el endotelio y sobre el leucocito, respectivamente; teniendo la plaqueta en ambas respuestas un papel pasivo.
4. Las interacciones plaqueta-endotelio causadas por ABC se deben a la activación del receptor endotelial P2X₇ y a la interacción de las moléculas de adhesión endoteliales P-selectina e ICAM-1 con las plaquetarias gpIIb/IIIa y gpIb α .
5. Las interacciones plaqueta-neutrófilo producidas por ABC son consecuencia de la activación del receptor leucocitario P2X₇ y de los receptores plaquetarios P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂. Este proceso también necesita la interacción de la molécula de adhesión leucocitaria PSGL-1 con la plaquetaria P-selectina.
6. El efecto protrombótico de abacavir *in vivo* depende de la acción de ABC sobre los leucocitos y sobre los receptores P2X₇.

VII

REFERENCIAS



Referencias

1. Kitchens CS, Konkle BA, Kessler CM. Consultative Hemostasis and Thrombosis: Third Edition. Third Edition. Elsevier Inc.; 2013. 1-822 p.
2. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci* 2019
3. Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Circ* 2014
4. Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Tipos celulares. Endotelial. 2019
5. Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* 2011
6. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays*. 1994;16(12):901-6.
7. Sumbria R, Fisher M. Endothelium. En: *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition*. Second Edition. Academic Press; 2017. p. 47-51.
8. ME W, DD G. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(6):1517-30.
9. M M, A G, A L, H S. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012;23(4):222-31.
10. Murakami M, Simons M. Regulation of Vascular Integrity. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(6):571.
11. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 54; 5(4):261-70.
12. SM W, DA C. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437(7058):497-504.

Referencias

13. Iyer S, Ferreri DM, DeCocco NC, Minnear FL, Vincent PA. VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. 2004; 286(6 30-6):1143-53.
14. Taha AA, Schnittler H-J. Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: Novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions. *Cell Adh Migr* 2014;8(2):125.
15. Y W, F C, F C, C W, S S, I V, et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 2007;26(7):1067-77.
16. MD P, S B, DA C. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 2005;280(36):31906-12.
17. R N, G P, A R, S K, U S, G F, et al. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* 2002; 21(18):4885-95.
18. Baumeister U, Funke R, Ebnet K, Vorschmitt H, Koch S, Vestweber D. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 2005 ;24(9):1686.
19. U F, WC S. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33(7).
20. Shimokawa H, Godo S. Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;67(5):361.
21. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol* 2015;7(11):719.

Referencias

22. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2015;16(7):15918-53.
23. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int* 2014
24. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2014;15(7):11324-49.
25. Castellon X, Bogdanova V. Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis* 2016;7(1):81.
26. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Medica* 2012;22(1):49.
27. Talamonti G, D'Aliberti G, Cenzato M. Aulus Cornelius Celsus and the Head Injuries. *World Neurosurg* 2020;133:127-34.
28. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008 ;454(7203):428-35.
29. Pahwa R, Goyal A, Bansal P, Jialal I. Chronic Inflammation. *En Treasure Island (FL)*; 2021.
30. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet world* 2018 ;11(5):627-35.
31. Askenase MH, Sansing LH. Stages of the Inflammatory Response in Pathology and Tissue Repair after Intracerebral Hemorrhage. *Semin Neurol* 2016;36(3):288.
32. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 1994;55.

Referencias

33. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014;41(5):694-707.
34. Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol* 2013 50(1):7.
35. Muller WA. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Lab Investig* 2002 825;82(5):521-34.
36. Mcever RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. 2019
37. PrabhuDas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, et al. Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. *J Immunol* 2014;192(5):1997.
38. Patten DA, Shetty S. More Than Just a Removal Service: Scavenger Receptors in Leukocyte Trafficking. *Front Immunol* 2018;9:2904.
39. LaPelusa A, Dave HD. Physiology, Hemostasis. *StatPearls* 2021.
40. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, et al. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice.;86(3):1106-14.
41. Pérez-Gómez F, Bover R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. *Rev Esp Cardiol* 2007;60(12):1217-9.
42. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, et al. Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* 2005;122(3):379-91
43. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12(5):261-73.

Referencias

44. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol* 2016;99(1):153-62
45. Frenette PS, Cécile §, Denis V, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, et al. P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions In Vivo Vol. 191, *J. Exp. Med.* 2000
46. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008;111(11):5271-81.
47. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol J, Plow E, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987;70(2):475-83.
48. Quach ME, Li R. Structure-function of platelet glycoprotein Ib-IX. *J Thromb Haemost* 2020;18(12):3131-41.
49. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;58(5):515-23.
50. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(1):34-45.
51. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. 2019
52. Gardiner EE, De Luca M, McNally T, Michelson AD, Andrews RK, Berndt MC. Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G. *Blood* 2001 ;98(5):1440-7.

Referencias

53. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
54. Rossaint J, Margraf A, Zarbock A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol* 2018;9:2712.
55. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* septiembre de 1972;24(3):509-81.
56. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* septiembre de 1998;50(3):413-92.
57. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* 2007;220(1):60-81.
58. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 2017;8.
59. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994;64(3):445-75.
60. Ralevic V, Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci Basic Clin* 2015;191:48-66.
61. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011;11(3):201-12.
62. Kennedy C. The P2Y/P2X divide: How it began. Vol. 187, *Biochemical Pharmacology.* Elsevier; 2021. p. 114408.
63. Burnstock G, Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol* 2009; 195(4):415-47.

Referencias

64. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996;272(5262):735-8
65. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol* 2018;151:234-44.
66. Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Front Pharmacol.* 2013;4.
67. Hechler B, Gachet C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(11):2307-15.
68. Furlan-Freguía C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest* 2011;121(7):2932-44.
69. World Health Organization. The top 10 causes of death 2021
70. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2020.
71. Lobos Bejarano JM, Brotons Cuixart C. Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Atención Primaria* 2011;43(12):668-77.
72. Ruparelía N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies HHS Public Access. *Nat Rev Cardiol* 2017;14(3):133-44.

Referencias

73. Zakai NA, Katz R, Jenny NS, Psaty BM, Reiner AP, Schwartz SM, et al. Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost* 2007;5(6):1128-35.
74. Murray CJL, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* (London, England) 1997;349(9063):1436-42.
75. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6(7):508-19.
76. Le NA. Lipoprotein-associated oxidative stress: a new twist to the postprandial hypothesis. *Int J Mol Sci* 2014;16(1):401-19.
77. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler An Off J Am Hear Assoc Inc* 1986;6(2):131-8.
78. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK. Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J Clin Invest* 1985;76(1):125-31.
79. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011;12(3):204-12.
80. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis: A Chronic Inflammatory Disease with an Autoimmune Component. *Circ Res* 2018;123(10):1118.
81. Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine* 2019;122.
82. Borissoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364(18):1746-60.

Referencias

83. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
84. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002;8(11):1257-62.
85. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3378-84.
86. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV Taxonomy history: Human immunodeficiency virus 1 [Internet] Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201855030
87. Dilley KA, Ni N, Nikolaitchik OA, Chen J, Galli A, Hu W-S. Determining the frequency and mechanisms of HIV-1 and HIV-2 RNA copackaging by single-virion analysis. *J Virol* 2011;85(20):10499-508.
88. Los Alamos National Laboratory. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs) 2019.
89. Baltimore D. Expression of Animal Virus Genomes Vol. 35, BACTERIOLOGICAL REVIEWS. 1971
90. Wen AM, Steinmetz NF. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem Soc Rev* 2016;45(15):4074.
91. National Center for biotechnology Information. HIV-1, complete genome - Nucleotide - NCBI [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF033819>
92. German Advisory Committee Blood. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy* 2016;43(3):203-22.
93. Bennett JE (John E, Dolin R, Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Vol. 1 Churchill Livingstone Elsevier; 2010. 1904 p.

Referencias

94. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection - Disease primer article. *Nat Rev Dis Prim* 2015;;:15035.
95. NIH: U.S. National Library of Medicine. Las fases de la infección por el VIH | El VIH/SIDA | infoSIDA [Internet].]. Disponible en: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/46/las-fases-de-la-infeccion-por-el-vih>
96. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012;18(3):182-92.
97. Yusim K, Peeters M, Pybus OG, Bhattacharya T, Delaporte E, Mulanga C, et al. Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. 2019.
98. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N Engl J Med* 1981;305(24):1425-31.
99. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):868-71.
100. Gallo R, Sarin P, Gelmann E, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman V, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 20 1983:865-7.
101. Global HIV & AIDS statistics – 2019 fact sheet | UNAIDS [Internet] Disponible en: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
102. España | ONUSIDA [Internet]. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/spain>

Referencias

103. 2018 GLOBAL HIV STATISTICS [Internet]. Disponible en: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf
104. Ezzell C. AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. *Nature* 1987;326(6112):430-430.
105. Bailey AC, Fisher M. Current use of antiretroviral treatment. *Br Med Bull* 2008;87(1):175-92
106. Ribera E, Tuset M, Martín M, del Cacho E. Características de los fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(5):362-91.
107. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 1998;4(11):1302-7.
108. Iacob SA, Iacob DG. Ibalizumab Targeting CD4 Receptors, An Emerging Molecule in HIV Therapy. *Front Microbiol* 2017;8:2323.
109. Piliero PJ. Pharmacokinetic Properties of Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37(Supplement 1):S2-12.
110. Molina JAP. COMITÉ DE REDACCIÓN REDACTORES GENERALES [Internet]. Disponible en: http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2019/02/Guia_Tar_Gesida_Ene_2019.pdf
111. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. 2021; Disponible en: <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/guidelines/documents/>
112. Database. NC for BIP. Abacavir [Internet]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Abacavir>

Referencias

113. Barbarino JM, Kroetz DL, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: abacavir pathway. 2014
114. Chittick GE, Gillotin C, McDowell JA, Lou Y, Edwards KD, Prince WT, et al. Abacavir: Absolute Bioavailability, Bioequivalence of Three Oral Formulations, and Effect of Food. *Pharmacotherapy* 1999;19(8):932-42.
115. Yuen GJ, Weller S, Pakes GE. A Review of the Pharmacokinetics of Abacavir. *Clin Pharmacokinet* 2008;47(6):351-71.
116. Kumar PN, Sweet DE, McDowell JA, Symonds W, Lou Y, Hetherington S, et al. Safety and pharmacokinetics of abacavir (1592U89) following oral administration of escalating single doses in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(3):603-8.
117. Wang LH, Chittick GE, Mcdowell JA. Single-Dose Pharmacokinetics and Safety of Abacavir (1592U89), Zidovudine, and Lamivudine Administered Alone and in Combination in Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection Vol. 43, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1999
118. Foster RH, Faulds D. Abacavir. *Drugs* 1998;55(5):729-36.
119. Mcdowell JA, Chittick GE, Ravitch JR, Polk RE, Kerkering TM, Stein DS. Pharmacokinetics of [¹⁴C]Abacavir, a Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase Inhibitor, Administered in a Single Oral Dose to HIV-1-Infected Adults: a Mass Balance Study Vol. 43. 1999
120. Miller WH, Daluge SM, Garvey EP, Hopkins S, Reardon JE, Boyd FL, et al. Phosphorylation of carbovir enantiomers by cellular enzymes determines the stereoselectivity of antiviral activity. *J Biol Chem* 1992;267(29):21220-4.

Referencias

121. Faletto MB, Miller WH, Garvey EP, Clair MHS, Daluge SM, Good SS. Unique Intracellular Activation of the Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Agent 1592U89 Vol. 41, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1997
122. Daluge SM, Good SS, Faletto MB, Miller WH, St Clair MH, Boone LR, et al. 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(5):1082-93.
123. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina J-M, Workman C, Tomažič J, et al. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. *N Engl J Med* 2008;358(6):568-79.
124. Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, Harndahl M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(25):9959-64.
125. Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 2012;486(7404):554-8.
126. Norcross MA, Luo S, Lu L, Boyne MT, Gomarteli M, Rennels AD, et al. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57. *AIDS* 2012;26(11):F21-9.
127. Martin AM, Almeida C-A, Cameron P, Purcell AW, Nolan D, James I, et al. Immune responses to abacavir in antigen-presenting cells from hypersensitive patients. *AIDS* 2007;21(10):1233-44.
128. Reust CE. Common Adverse Effects of Antiretroviral Therapy for HIV Disease Vol. 83. 2011

Referencias

129. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* 2014;384(9939):258-71.
130. Zicari S, Sessa L, Cotugno N, Ruggiero A, Morrocchi E, Concato C, et al. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* 2019;11(3).
131. Triant VA. Cardiovascular Disease and HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 2013;10(3):199.
132. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet (London, England)* 1999;353(9170):2093-9.
133. Smith KY, Patel P, Fine D, Bellos N, Sloan L, Lackey P, et al. Randomized, double-blind, placebo-matched, multicenter trial of abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with lopinavir/ritonavir for initial HIV treatment. *AIDS* 2009;23(12):1547-56.
134. Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, et al. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet (London, England)* 2011;378(9787):238-46.
135. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, DeJesus E, Suleiman JMAH, Miller MD, et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* 2004;292(2):191-201.
136. Ryom L, Lundgren JD, El-Sadr WM, Reiss P, Phillips A, Kirk O, et al. Association between cardiovascular disease and contemporarily used protease inhibitors. En: *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 15*. Seattle.; 2017.

Referencias

137. Sanz E. Abacavir - myocardial infarction. WHO Signal. 2005.
138. Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, et al. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet* 2008;371(9622):1417.
139. Maggi P, Biagio A Di, Rusconi S, Cicalini S, D'Abbraccio M, d'Ettorre G, et al. Cardiovascular risk and dyslipidemia among persons living with HIV: a review. *BMC Infect Dis* 2017;17(1).
140. Cutrell A, Brothers C, Yeo J, Hernandez J, Lapierre D. Abacavir and the potential risk of myocardial infarction. *Lancet*. 2008;371(9622):1413.
141. Brothers CH, Hernandez JE, Cutrell AG, Curtis L, Ait-Khaled M, Bowlin SJ, et al. Risk of myocardial infarction and abacavir therapy: No increased risk across 52 glaxosmithkline-sponsored clinical trials in adult subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;51(1):20-8.
142. Bedimo RJ, Westfall AO, Drechsler H, Vidiella G, Tebas P. Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular events in the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis*. 2011;53(1):84-91.
143. Alvarez A, Orden S, Andujar I, Collado-Diaz V, Núñez-Delgado S, Galindo M, et al. Cardiovascular toxicity of abacavir: a clinical controversy in need of a pharmacological explanation. *AIDS* 2017;31(13):1781-95.
144. Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009;174(3):771-81.

Referencias

145. Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. *AIDS* 2011;25(18):2243-8.
146. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues J V, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010;24(9):1.
147. De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues J V., Álvarez Á. Profile of Leukocyte-Endothelial Cell Interactions Induced in Venules and Arterioles by Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitors In Vivo. *J Infect Dis* 2013;208(9):1448-53.
148. Orden S, De Pablo C, Rios-Navarro C, Angeles Martinez-Cuesta M, Peris JE, Barrachina MD, et al. Efavirenz induces interactions between leucocytes and endothelium through the activation of Mac-1 and gp150,95. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):995-1004.
149. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J.* 2017 Mar 14;38(11):785-791.
150. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 2001;276(1):125-32.
151. Charles River. C57BL/6 Mouse | Charles River [Internet]. Disponible en: <https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=3661>
152. Åhlgren J, Voikar V. Experiments done in Black-6 mice: what does it mean? *Lab Anim (NY)* 2019;48(6):171-80.
153. THE JACKSON LABORATORY. The Jackson Laboratory [Internet]. Disponible en: <https://www.jax.org/>

Referencias

154. The Jackson Laboratory. 005576 - B6.129P2-P2rx7/J [Internet]. Disponible en: <https://www.jax.org/strain/005576>
155. The Jackson Laboratory. 002052 - B6.129P2-Apoe/J [Internet]. Disponible en: <https://www.jax.org/strain/002052>
156. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin* 2010;26(7):1715-31.
157. CJ H. COX-1 and COX-2 Inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15(5):801-20.
158. Soto F, Lambrecht G, Nickel P, Stühmer W, Busch AE. Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 1999;38(1):141-9.
159. Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, et al. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17179.
160. DL D-R, MT N, B S, SX V, A P-M, Y W, et al. [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) Is a Novel, Potent, and Selective Antagonist Radioligand for P2X7 Receptors. *Neuropharmacology* 2009;56(1):223-9.
161. Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave J-P, Lanza F, et al. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):556-63.

Referencias

162. Wang D, Yang X-H, Zhang J-D, Li R-B, Jia M, Cui X-R. Compared efficacy of clopidogrel and ticagrelor in treating acute coronary syndrome: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* 2018;18.
163. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
164. Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J ultrasound Med* 2012;15(3):97-102.
165. Ibiza S, Álvarez Á, Romero W, Barrachina MD, Esplugues JV, Calatayud S. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Physiol* 2009;297(6):C1588-95.
166. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology* 2013;65(1):1-14.
167. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdoille M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2007;2(3):481-5.
168. Kuhns DB, Priel DAL, Chu J, Zarembek KA. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr Protoc Immunol* 2015;111:7.23.1.
169. Neu B, Wenby R, Meiselman HJ. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophys J* 2008;95(6):3059.
170. Quach A, Ferrante A. The Application of Dextran Sedimentation as an Initial Step in Neutrophil Purification Promotes Their Stimulation, due to the Presence of Monocytes. *J Immunol Res* 2017;10.

Referencias

171. M R, S M. An Improved Method for Washing of Human Platelets With Prostacyclin. *Thromb Res* 1983;30(4).
172. DG H, JS O, KR B. The Aggregation of Isolated Human Platelets in the Presence of Lipoproteins and Prostacyclin. *Biochem J* 1983;216(1).
173. Alvarez A, Rios-Navarro C, Blanch-Ruiz MA, Collado-Diaz V, Andujar I, Martinez-Cuesta MA, et al. Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis. *Antiviral Res* 2017;141:179-85.
174. Zhou Y, Kucik DF, Szalai AJ, Edberg JC. Human Neutrophil Flow Chamber Adhesion Assay. *J Vis Exp* 2014;(89).
175. Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004;104(2):402-8.
176. Goetz DJ, Greif DM, Shen J, Luscinskas FW. Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods Mol Biol* 1999;96:137-45.
177. Cai YH, Alvarez A, Alcaide P, Duramad P, Lim Y-C, Jarolim P, et al. Abrogation of Functional Selectin-Ligand Expression Reduces Migration of Pathogenic CD8 + T Cells into Heart . *J Immunol* 2006;176(11):6568-75.
178. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard J-P, et al. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007;12(4):489-500.

Referencias

179. G M, M B, C F, C H, PE H, IH S, et al. Steady-state Pharmacokinetics of Abacavir in Plasma and Intracellular Carbovir Triphosphate Following Administration of Abacavir at 600 Milligrams Once Daily and 300 Milligrams Twice Daily in Human Immunodeficiency Virus-Infected Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4).
180. DA P, HC J, CW T, EP A. Pharmacokinetics of Once-Daily Tenofovir, Emtricitabine, Ritonavir and Fosamprenavir in HIV-infected Subjects. *AIDS* 2007;21(10).
181. M B, A J, A A, D B, S K, C H, et al. Pharmacokinetics of Once-Daily Darunavir-Ritonavir and Atazanavir-Ritonavir Over 72 Hours Following Drug Cessation. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(9)
182. Waters L, Jackson A, Else L, Rockwood N, Newell S, Back D, et al. Switching safely: pharmacokinetics, efficacy and safety of switching efavirenz to maraviroc twice daily in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2015;20(2):157-63.
183. Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, et al. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61(2):148-54.
184. Cooper CL, van Heeswijk RPG. Once-daily nevirapine dosing: a pharmacokinetics, efficacy and safety review. *HIV Med* 2007;8(1):1-7.
185. M M-R, A M, I P, S H, M B, M L, et al. Pharmacokinetic Study of Dual Therapy With Raltegravir 400 Mg Twice Daily and Darunavir/Ritonavir 800/100 Mg Once Daily in HIV-1-infected Patients. *Ther Drug Monit* 2013;35(4).

Referencias

186. A L, E M, M S, Y L, J M, E DL, et al. Impact of Steady-State Lopinavir Plasma Levels on Plasma Lipids and Body Composition After 24 Weeks of Lopinavir/Ritonavir-Containing Therapy Free of Thymidine Analogues. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(4).
187. IU, V M, JE P. Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors: A Review on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Tolerability. *J Int AIDS Soc* 2013;16(1).
188. Blas-García A, Polo M, Alegre F, Funes HA, Martínez E, Apostolova N, et al. Lack of mitochondrial toxicity of darunavir, raltegravir and rilpivirine in neurons and hepatocytes: a comparison with efavirenz. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(11):2995-3000.
189. Jamaluddin MS, Lin PH, Yao Q, Chen C. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2010;208(1):104-11.
190. Tamatani T, Kotani M, Miyasaka M. Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1991;21(3):627-33.
191. Tamatani T, Miyasaka M. Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int Immunol* 1990;2(2):165-71.
192. Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *Am J Pathol* 1997;150(3):971-9.
193. Heit B, Colarusso P, Kubes P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 22):5205-20.

Referencias

194. E P, NM W, D S, CM B, DA S, DI S, et al. Expression, Activation, and Function of Integrin α M β 2 (Mac-1) on Neutrophil-Derived Microparticles. *Blood* 2008;112(6).
195. Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, Hensley K, Garcia-Martinez LF, Simon SI, et al. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol* 2007;81(6):1395-403.
196. Arndt S, Melle C, Mondal K, Klein G, von Eggeling F, Bosserhoff A-K. Interactions of TANGO and leukocyte integrin CD11c/CD18 regulate the migration of human monocytes. *J Leukoc Biol* 2007;82(6):1466-72.
197. Kuckleburg CJ, Yates CM, Kalia N, Zhao Y, Nash GB, Watson SP, et al. Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2011;14;91(1):134-41.
198. Åsberg AE, Videm V. Inhibition of platelet receptors involved in neutrophil-platelet interaction in model cardiopulmonary bypass. *Artif Organs* 2007;31(8):617-26.
199. Liu Y, Zhao F, Gu W, Yang H, Meng Q, Zhang Y, et al. The roles of platelet GPIIb/IIIa and α v β 3 integrins during HeLa cells adhesion, migration, and invasion to monolayer endothelium under static and dynamic shear flow. *J Biomed Biotechnol* 2009.
200. Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, Coutinho-Silva R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* 2011;216(1-2):1-11.
201. M H, R H-M, A V, A A, M K, N M, et al. ATP Release Due to Thy-1-integrin Binding Induces P2X7-mediated Calcium Entry Required for Focal Adhesion Formation. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 9).

Referencias

202. Coddou C, Stojilkovic SS, Huidobro-Toro JP. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci* 2011;22(3):335-54.
203. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 2011;63(3):641-83.
204. Neelands TR, Burgard EC, Uchic ME, McDonald HA, Niforatos W, Faltynek CR, et al. 2', 3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor. *Br J Pharmacol* 2003;140(1):202.
205. Hechler B, Magnenat S, Zighetti ML, Kassack MU, Ullmann H, Cazenave JP, et al. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314(1):232-43.
206. Weber AA, Reimann S, Schrör K. Specific inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol* 1999;126(2):415-20.
207. Givan AL. Flow Cytometry: An Introduction. En: S. Hawley T, G. Hawley R, editores. *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* Springer Science; 2011 p. 1-29.
208. Mckinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2019;120(5.1):1-11.
209. Becton D and C. *BD FACSCalibur Instructions For Use* 2007 238 p.
210. Becton D and C. *BD CellQuest Pro Software User's Guide* 2002 258 p.

Referencias

211. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost.* 1998;79(5):885-96.
212. Alvarez A, Ibiza MS, Andrade MM, Blas-García A, Calatayud S. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of CCK-2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323(1):406-13.
213. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 2017;18(8).
214. Allan-Rahill NH, Lamont MRE, Chilian WM, Nishimura N, Small DM. Intravital Microscopy of the Beating Murine Heart to Understand Cardiac Leukocyte Dynamics. *Front Immunol* 2020;11.
215. Álvarez Á, Hermenegildo C, Issekutz AC, Esplugues J V., Sanz MJ. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circ Res.* 2002;91(12):1142-50.
216. A A, S I, C H, A A-B, J V E, S C. Gastrin Induces Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Vivo and Contributes to the Inflammation Caused by *Helicobacter Pylori*. *FASEB J* 2006;20(13).
217. MJ H, DN G, P K. Molecular Mechanisms Underlying IL-4-induced Leukocyte Recruitment in Vivo: A Critical Role for the Alpha 4 Integrin. *J Immunol* 1999;163(6).
218. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol* 2012;92(6):1167-75.

Referencias

219. Li W, Nieman M, Sen Gupta A. Ferric Chloride-induced Murine Thrombosis Models. *J Vis Exp* 2016;(115).
220. RJ W, ME W, DT E. Murine Models of Vascular Thrombosis (Eitzman Series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(10).
221. Morley A, Stohlman F. Cyclophosphamide-induced cyclical neutropenia. An animal model of a human periodic disease. *N Engl J Med* 1970;282.
222. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O, et al. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis* 2006;6(1):55.
223. Brandely M, Lagrange PH, Hurtrel B. Effects of suramin on the in vivo antimicrobial resistance against *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *Clin Exp Immunol* 1986;63(1):118-26.
224. M D-H, M D-Z, J S-N, R G-V, JM C, J A, et al. Altered P2X7-receptor Level and Function in Mouse Models of Huntington's Disease and Therapeutic Efficacy of Antagonist Administration. *FASEB J* 2009;23(6).
225. Neelands TR, Burgard EC, Uchic ME, McDonald HA, Niforatos W, Faltynek CR, et al. 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor. *Br J Pharmacol* 2003;140(1):202-10.
226. Collado-Diaz V, Andujar I, Sanchez-Lopez A, Orden S, Blanch-Ruiz MA, Martinez-Cuesta MA, et al. Abacavir Induces Arterial Thrombosis in a Murine Model. *J Infect Dis* 2018;218(2):228-33.
227. Zelmer A, Ward TH. Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *J Microsc* 2013;252(1):8-15.

Referencias

228. Cuadrado I, Saura M, Castejón B, Martín AM, Herruzo I, Balatsos N, et al. Preclinical models of atherosclerosis. The future of Hybrid PET/MR technology for the early detection of vulnerable plaque. *Expert Rev Mol Med* 2016;18:e6.
229. Chierichetti F, Pizzolato G. 18F-FDG-PET/CT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012;56(2):138-50.
230. Gaitanis A, Kontaxakis G, Spyrou G, Panayiotakis G, Tzanakos G. PET image reconstruction: A stopping rule for the MLEM algorithm based on properties of the updating coefficients. *Comput Med Imaging Graph* 2010;34(2):131-41.
231. Hellberg S, Sippola S, Liljenbäck H, Virta J, Silvola JMU, Ståhle M, et al. Effects of atorvastatin and diet interventions on atherosclerotic plaque inflammation and [18F]FDG uptake in Ldlr-/-Apob100/100 mice. *Atherosclerosis* 2017;263:369-76.
232. Ye Y-X, Calcagno C, Binderup T, Courties G, Keliher EJ, Wojtkiewicz GR, et al. Imaging Macrophage and Hematopoietic Progenitor Proliferation in Atherosclerosis. *Circ Res* 2015;117(10):835-45.
233. Laitinen I, Marjamäki P, Haaparanta M, Savisto N, Laine VJO, Soini SL, et al. Non-specific binding of [18F]FDG to calcifications in atherosclerotic plaques: experimental study of mouse and human arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33(12):1461-7.
234. Silvola JMU, Saraste A, Laitinen I, Savisto N, Laine VJO, Heinonen SE, et al. Effects of Age, Diet, and Type 2 Diabetes on the Development and FDG Uptake of Atherosclerotic Plaques. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4(12):1294-301.
235. S R-S, M N, N A. Dose Translation From Animal to Human Studies Revisited. *FASEB J* 2008;22(3).

Referencias

236. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J basic Clin Pharm* 2016;7(2):27-31
237. Kelly PJ, Camps-Renom P, Giannotti N, Martí-Fàbregas J, Murphy S, McNulty J, et al. Carotid Plaque Inflammation Imaged by 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography and Risk of Early Recurrent Stroke. *Stroke* 2019;50(7):1766-73.
238. Rudd JHF, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* 2002;105(23):2708-11.
239. Ogawa M, Ishino S, Mukai T, Asano D, Teramoto N, Watabe H, et al. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. *J Nucl Med* 2004;45(7):1245-50.
240. Tawakol A, Migrino RQ, Hoffmann U, Abbara S, Houser S, Gewirtz H, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Nucl Cardiol* 2005;12(3):294-301.
241. Masteling MG, Zeebregts CJ, Tio RA, Breek J-C, Tietge UJF, de Boer JF, et al. High-resolution imaging of human atherosclerotic carotid plaques with micro 18F-FDG PET scanning exploring plaque vulnerability. *J Nucl Cardiol* 2011;18(6):1066-75.
242. Toczek J, Broisat A, Perret P, Desruet M-D, Fagret D, Riou LM, et al. Periaortic brown adipose tissue as a major determinant of [18F]-fluorodeoxyglucose vascular uptake in atherosclerosis-prone, apoE-/- mice. *PLoS One* 2014;9(7):e99441.

Referencias

243. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular Risk and Body-Fat Abnormalities in HIV-Infected Adults. <http://dx.doi.org/101056/NEJMra041811> 2009 2021;352(1):48-62.
244. Chastain DB, Henderson H, Stover KR. Epidemiology and management of antiretroviral-associated cardiovascular disease. *Open AIDS J* 2015;9(1):23-37.
245. Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, Gilquin J, Partisani M, Simon A, et al. Impact of Individual Antiretroviral Drugs on the Risk of Myocardial Infarction in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: A Case-Control Study Nested Within the French Hospital Database on HIV ANRS Cohort CO4. *Arch Intern Med* 2010;170(14):1228-38.
246. Worm SW, Sabin C, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, et al. Risk of Myocardial Infarction in Patients with HIV Infection Exposed to Specific Individual Antiretroviral Drugs from the 3 Major Drug Classes: The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study. *J Infect Dis* 2010;201(3):318-30.
247. Sabin CA, Reiss P, Ryom L, Phillips AN, Weber R, Law M, et al. Is there continued evidence for an association between abacavir usage and myocardial infarction risk in individuals with HIV? A cohort collaboration. *BMC Med* 2016;14(1).
248. Obel N, Farkas DK, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Riis A, et al. Abacavir and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: a population-based nationwide cohort study. *HIV Med* 2010;11(2):130-6.
249. Marcus JL, Neugebauer RS, Leyden WA, Chao CR, Xu L, Quesenberry CP, et al. Use of Abacavir and Risk of Cardiovascular Disease Among HIV-Infected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;71(4):413-9.

Referencias

250. Ribaudó HJ, Benson CA, Zheng Y, Koletar SL, Collier AC, Lok JJ, et al. No risk of myocardial infarction associated with initial antiretroviral treatment containing abacavir: Short and long-term results from ACTG A5001/ALLRT. *Clin Infect Dis*. 2011;52(7):929-40.
251. Brothers CH, Hernandez JE, Cutrell AG, Curtis L, Ait-Khaled M, Bowlin SJ, et al. Risk of Myocardial Infarction and Abacavir Therapy: No Increased Risk Across 52 GlaxoSmithKline-Sponsored Clinical Trials in Adult Subjects. *JAIDS* 2009
252. Ding X, Andraca-Carrera E, Cooper C, Miele P, Kornegay C, Soukup M, et al. No association of abacavir use with myocardial infarction: findings of an FDA meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;61(4):441-7.
253. Llibre JM, Hill A. Abacavir and cardiovascular disease: A critical look at the data. *Antiviral Res*. 2016;132:116-21.
254. De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues J V, Alvarez A. Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. *J Infect Dis* 2013;208(9):1448-53.
255. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.
256. De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Martí-Cabrera M, Esplugues J V., Álvarez Á. Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antivir Ther* 2012;17(8):1615-9.
257. Esplugues JV, De Pablo C, Collado-Díaz V, Hernández C, Orden S, Álvarez Á. Interference with purinergic signalling: an explanation for the cardiovascular effect of abacavir? *AIDS*. 2016 1;30(9):1341-51.

Referencias

258. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(5):673-94.
259. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014;509(7500):310-7.
260. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circ Res* 2007;100(12):1673-85.
261. Satchell CS, O'Halloran JA, Cotter AG, Peace AJ, O'Connor EF, Tedesco AF, et al. Increased platelet reactivity in HIV-1-infected patients receiving abacavir-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011;204(8):1202-10.
262. Falcinelli E, Francisci D, Belfiori B, Petito E, Guglielmini G, Malincarne L, et al. In vivo platelet activation and platelet hyperreactivity in abacavir-treated HIV-infected patients. *Thromb Haemost.* 2013;110(2):349-57.
263. Muñoz RP, González-Correa JA, Ruiz J, Nuño E, Márquez M, Cruz JP de la, et al. Whole blood platelet aggregometry in HIV-infected patients on treatment with abacavir. *Open J Intern Med* 2012;2(2):62-6.
264. Bray PF. Platelet Hyperreactivity: Predictive and intrinsic properties. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21(4):633.
265. Adamski P, Buszko K, Sikora J, Niezgoda P, Fabiszak T, Ostrowska M, et al. Determinants of high platelet reactivity in patients with acute coronary syndromes treated with ticagrelor. *Sci Reports* 2019;9(1):1-8.
266. Tunjungputri RN, Van Der Ven AJ, Schonsberg A, Mathan TS, Koopmans P, Roest M, et al. Reduced platelet hyperreactivity and platelet-monocyte aggregation in HIV-infected individuals receiving a raltegravir-based regimen. *AIDS* 2014;28(14):2091-6.

Referencias

267. De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues J V., Álvarez Á. Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. *J Infect Dis*. 2013;208(9):1448-53.
268. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues J V., Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010;24(9):1259-66.
269. Satchell CS, O'Halloran JA, Cotter AG, Peace AJ, O'Connor EF, Tedesco AF, et al. Increased Platelet Reactivity in HIV-1-Infected Patients Receiving Abacavir-Containing Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* 2011;204(8):1202-10.
270. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100(12):1673-85.
271. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 200699(12):1293-304.
272. Collado-Díaz V, Martínez-Cuesta MÁ, Blanch-Ruiz MA, Sánchez-López A, García-Martínez P, Peris JE, et al. Abacavir Increases Purinergic P2X7 Receptor Activation by ATP: Does a Pro-inflammatory Synergism Underlie Its Cardiovascular Toxicity? *Front Pharmacol* 2021;12:613449.
273. Blanch-Ruiz MA, Ortega-Luna R, Martínez-Cuesta MÁ, Álvarez Á. The Neutrophil Secretome as a Crucial Link between Inflammation and Thrombosis. *Int J Mol Sci* 2021;22(8).
274. Alvarez A, Rios-Navarro C, Blanch-Ruiz MA, Collado-Diaz V, Andujar I, Martínez-Cuesta MA, et al. Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis. *Antiviral Res*. 1 de mayo de 2017;141:179-85.

Referencias

275. Hayes FD, Short RD, Gibson JE. A Correlation Between Cyclophosphamide Induced Leukopenia in Mice and the Presence of Alkylating Metabolites. *Exp Biol Med* 1972;139(2):417-21.
276. Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, Lanas A, Morton DG, Riddell R, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *Lancet (London, England)* 2008;372(9651):1756-64.
277. Sondergaard KB, Weeke P, Wissenberg M, Schjerning Olsen AM, Fosbol EL, Lippert FK, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use is associated with increased risk of out-of-hospital cardiac arrest: a nationwide case-time-control study. *Eur Hear journal Cardiovasc Pharmacother* 2017;3(2):100-7.
278. Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):1-20.
279. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. Vol. 51, *Pathology*. Pathology; 2019 p. 165-76.
280. Bouchareychas L, Raffai R. Apolipoprotein E and Atherosclerosis: From Lipoprotein Metabolism to MicroRNA Control of Inflammation. *J Cardiovasc Dev Dis* 2018;5(2):30.
281. Park J-G, Yoo J-Y, Jeong S-J, Choi J-H, Lee M-R, Lee M-N, et al. Peroxiredoxin 2 Deficiency Exacerbates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circ Res* 2011;109(7):739-49.
282. Du M, Wang X, Tan X, Li X, Huang D, Huang K, et al. Nkx2-5 Is Expressed in Atherosclerotic Plaques and Attenuates Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Heart Assoc* 2016;5(12).

Referencias

283. Camici P, Ferrannini E, Opie LH. Myocardial metabolism in ischemic heart disease: basic principles and application to imaging by positron emission tomography. *Prog Cardiovasc Dis* 1989;32(3):217-38.
284. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol* 2013;35(3):254-61.
285. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as Immune Cells. *Circ Res* 2007;100(1):27-40.

VIII

CERTIFICADOS



M^a Dolores Simó Piara, Técnica Superior de Prevención de Riesgos Laborales, especialidad de Higiene Industrial, y Secretaria del Comité de Bioseguridad, de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité de Bioseguridad de la Universitat de València, el día 14 de marzo de 2016, y estudiado el proyecto de investigación titulado: *"Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de Abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito/endotelio/plaqueta"* cuyos investigadores principales son Juan Vicente Esplugues Mota y Ángeles Álvarez Ribelles, ha acordado emitir

INFORME FAVORABLE

- Sobre las medidas de contención aplicadas (según RD 664/1997)
- En el cumplimiento de los principios aplicados de Seguridad e Higiene en el trabajo establecidos en la normativa vigente.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a 21 de marzo de 2016



Este certificado se emite de acuerdo a la información aportada por el/la investigador/a principal. Cualquier cambio en las condiciones de trabajo deberá comunicarse previamente a este Comité que, en su caso, emitirá un nuevo certificado.



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE
VALENCIA

Dña. Cristina Gomis Gozalbo, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 26 de noviembre de 2015, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito/endotelio/plaqueta

Mismo que será llevado a cabo en la Facultad de Medicina en el Departamento de Farmacología y cuyos investigadores principales son la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles y el Dr. Juan Vicente Esplugues Mota, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la *Declaración de Helsinki* (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Scmerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la *Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO* y los acuerdos del *Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina* (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación de Retos de la Sociedad 2015.

Valencia, 26 de noviembre de 2015.

Fdo. : Dra. Dña. Cristina Gomis Gozalbo
Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica



CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE,
CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL
DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00083

Vista la solicitud realizada en fecha **09/05/17** con nº reg. entrada **20848** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES460250001003**, para realizar el procedimiento:

“Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de Abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito/endotelio/plaqueta.”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00083** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Angeles Alvarez Ribelles**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



Signat per Rogelio Llanes Ribas el
29/05/2017 19:05:20

GENERALITAT
VALENCIANA



Ernest Cano Cano, Vicerrector de Ordenación Académica y Profesorado, de la Universidad de Valencia, CERTIFICA que ITZIAR AINHOA SANCHEZ LOPEZ, Invest formacion vali+d, con D.N.I. 75757308T, de acuerdo con la documentación existente en esta universidad, ha desempeñado la actividad docente que se especifica a continuación,

Curso Académico: 2017 - 2018

Categoría	Cuatr.	Titulación	Tipo Tit.	Módulo/Asignatura/Grupo	Idioma	Núm. horas	
						Teoría	Práct.
Invest formacion vali+d	2	Grado de farmacia Pdg farmacia-nutrición humana y dietética	G	34087 / Farmacología I (B4)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	2	Grado de farmacia Pdg farmacia-nutrición humana y dietética	G	34087 / Farmacología I (B5)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	2	Grado de farmacia Pdg farmacia-nutrición humana y dietética	G	34087 / Farmacología I (D4)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	1	Grado de podología	G	34329 / Farmacología (A3)	C	0,00	2,00
	1		G				
Invest formacion vali+d	1	Grado de podología	G	34329 / Farmacología (A4)	C	0,00	2,00
	1		G				
Invest formacion vali+d	1	Grado de podología	G	34329 / Farmacología (A2)	C	0,00	2,00
	A		G				
Invest formacion vali+d	A	Grado de odontología	G	34712 / Farmacología, anestesia y reanimación (A4)	V	0,00	7,50
			G				
Invest formacion vali+d	A	Grado de odontología	G	34712 / Farmacología, anestesia y reanimación (A2)	C	0,00	1,50
			G				
Total						0,0	60,0

Curso Académico: 2018 - 2019

Categoría	Cuatr.	Titulación	Tipo Tit.	Módulo/Asignatura/Grupo	Idioma	Núm. horas	
						Teoría	Práct.
Invest formacion vali+d	2	Grado de Farmacia PDG Farmacia-Nutrición Humana y Dietética	G	34087 / Farmacología I (B1)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	2	Grado de Farmacia PDG Farmacia-Nutrición Humana y Dietética	G	34087 / Farmacología I (B5)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	2	Grado de Farmacia PDG Farmacia-Nutrición Humana y Dietética	G	34087 / Farmacología I (B3)	C	0,00	15,00
	2		G				
Invest formacion vali+d	2	Grado de Farmacia PDG Farmacia-Nutrición Humana y Dietética	G	34087 / Farmacología I (D3)	C	0,00	15,00
	2		G				
Total						0,0	60,0

Lunes, 22 noviembre 2021.

Fdo: Ernest Cano Cano.
Vicerrector de Ordenación Académica y Profesorado.

p. 1

Firmat digitalment per
ERNEST CANO CANO
Càrrec: Vicerrector d'Ordenació Acadèmica i Professorat
Data: 22/11/2021 14:46:50 CET

Id: UV-REDFirma-1917861

Cod. Verificació: S7YBXEOZABITDB9

URL Verif: <https://webges.uv.es/uv/EntreuWeb/>

Información: Documento aportado por el usuario.



Cardiovascular Research Center
Massachusetts General Hospital
149 Thirteenth Street
Charlestown, MA 02129-2060
Tel: 617 643-2290
Fax: 617 726-5806
Email: atochin@cvrc.mgh.harvard.edu

Dmitriy N. Atochin, M.D., Ph.D.
Assistant Professor of Medicine

November 27, 2017

Dear Itziar Ainhoa Sanchez Lopez,

I am pleased to accept you to my laboratory at Cardiovascular Research Center (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) as a predoctoral Student for a short term stay next summer (2018). Our project study the role that cGKI plays in platelets and smooth muscle cells modulating the vascular reactivity and stroke outcome.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dmitriy N. Atochin".

Dmitriy N. Atochin, M.D., Ph. D.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AMPARO PÉREZ CARBONELL, Directora del Servei d'Extensió Universitària de la Universitat de València,
 AMPARO PÉREZ CARBONELL, Directora del Servei d'Extensió Universitària de la Universitat de València

CERTIFIQUE:
CERTIFICO:

Que d'acord amb els antecedents que hi ha en aquesta Universitat,
 Que de acuerdo con los antecedentes que obran en esta Universidad,

SANCHEZ LOPEZ, ITZIAR AINHOA

amb DNI Núm: **75757308T** va intervenir en les següents activitats:
 con DNI Num: ha intervenido en la siguientes actividades:

EXTENSIÓ UNIVERSITÀRIA
EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Activitat:
Actividad:

CURS MÓDUL 1: CATEGORIA A + B: FUNCIO DE CURA DELS ANIMALS. EUTANÀSIA DELS ANIMALS

CURSO MODULO 1: CATEGORIA A + B: FUNCION DE CUIDADO DE LOS ANIMALES. EUTANASIA DE LOS ANIMALES

Aprovat per resolució de:

Aprobado por resolución de: VICERECTORAT DE FORMACIÓ I QUALITAT

De data

De fecha 20/10/2016

Celebrat a:

Celebrado en: VALENCIA Del 03/02/2017 Al 24/03/2017

Funció: ALUMNE **Duració:** HORES **Crèdits** **Qualificació:** APTÉ
Función: ALUMNO **Duración:** HORAS **3.0** **Créditos** **Calificación:** APTO

I perquè conste, a petició de la persona interessada, i als efectes prevists en la legislació vigent, es lliura aquest CERTIFICAT en València, a 24/03/2017

Y para que conste, a petición de la persona interesada, y a los efectos previstos en la legislación vigente, se expide este CERTIFICADO en València, a 24/03/2017



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AMPARO PÉREZ CARBONELL, Directora del Servei d'Extensió Universitària de la Universitat de València,
AMPARO PÉREZ CARBONELL, Directora del Servei d'Extensió Universitària de la Universitat de València

CERTIFIQUE:
CERTIFICO:

Que d'acord amb els antecedents que hi ha en aquesta Universitat,
Que de acuerdo con los antecedentes que obran en esta Universidad,

SANCHEZ LOPEZ, ITZIAR AINHOA

amb DNI Núm: 75757308T va intervenir en les següents activitats:
con DNI Num: ha intervenido en la siguientes actividades:

EXTENSIÓ UNIVERSITÀRIA
EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Activitat:
Actividad:

CURS MODUL 2: CATEGORIA C: FUNCIO REALITZACIO DELS PROCEDIMENT
CURSO MODULO 2: CATEGORIA C: FUNCION REALIZACION DE LOS PROCEDIMIENTOS

Aprobat per resolució de: VICERECTORAT DE FORMACIÓ I QUALITAT De data: 20/10/2016
Aprobado por resolución de: De fecha: 20/10/2016

Celebrat a: VALENCIA Del 03/02/2017 Al 31/03/2017
Celebrado en: Del Al

Funció: ALUMNE Duració: HORES 4.0 Crèdits Qualificació: APTÉ
Función: ALUMNO Duración: HORAS 4.0 Créditos Calificación: APTO

I perquè conste, a petició de la persona interessada, i als efectes prevists en la legislació vigent, es lliura aquest CERTIFICAT en València, a 31/03/2017

Y para que conste, a petición de la persona interesada, y a los efectos previstos en la legislación vigente, se expide este CERTIFICADO en València, a 31/03/2017

27/04/2017



Página 74

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

ISABEL VÁZQUEZ NAVARRO, VICERECTORA D'ESTUDIS I POLÍTICA LINGÜÍSTICA

CERTIFIQUE:

Que d'acord amb els antecedents que hi ha en aquesta Universitat,

ITZIAR AINHUA SANCHEZ LOPEZ

amb document d'identitat 75757308T va intervenir en la següent activitat de POSTGRAU:

Activitat:

**Certificat Universitari en Formació en Experimentació amb Animals - Funció D
(1ª Edició)**

En aquesta activitat 1 Crèdit ECTS equival a 25 hores. L'activitat completa suposa 75.0 hores de treball de l'estudiant, de les quals 24.0 són de docència.

Celebrat en aquesta Universitat en el curs acadèmic 2017/2018

Qualificació: APTE

Duració: 3.0 Crèdits Europeus

MATÈRIES IMPARTIDES

62299 - Disseny de projectes i procediments amb animals d'experimentació

3.0 Crèd

I perquè conste, a petició de la persona interessada, i als efectes prevists en la legislació vigent, es lliura aquest CERTIFICAT a València, a 06/06/2018.





RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN DEL PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA.

Vista la solicitud con número de registro de entrada 16107 de fecha 22/06/2018 perteneciente a **ITZIAR SANCHEZ LOPEZ**, con DNI **75757308R** solicitando la acreditación como personal de funciones a), b), c), d) a efectos de lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013, expediente nº **2762**.

Dado que la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca, ha reconocido el curso de **Cuidado de los Animales, Eutanasia, Realización de los Procedimientos y Diseño de los Procedimientos y Proyectos de Investigación en Animales de Experimentación respectivamente en las funciones a), b), c), y d)** con nº de expediente **2017/CEA/A-B-C-D/0001** en el marco de la Orden ECC/566/ 2015 de 20 de marzo en fecha 6 de marzo de 2017, y vista la documentación aportada por el titular, donde consta que ha superado el curso de experimentación animal, función/es **a), b), c) y d)**, impartido por la **UNIVERSITAT DE VALENCIA** y el periodo de trabajo en el Animalario Facultad de Medicina y Odontología, habiendo acreditado su capacitación el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE).

CERTIFICO

Que **ITZIAR SANCHEZ LOPEZ**, DNI **75757308R**

ha acreditado ante la dirección general de Agricultura, Ganadería y Pesca, de acuerdo con el DECRETO 13/2007, de 26 de enero, del Consell, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en la Comunitat Valenciana, reunir los requisitos necesarios para el reconocimiento de la capacitación para la realización de la/s función/es:

- a) cuidado de los animales
- b) eutanasia de los animales
- c) realización de los procedimientos
- d) diseño de los proyectos y procedimientos

en especie/s: **roedores**

Valencia, a fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmat per Rogelio Llanes Ribas el
26/07/2018 12:11:56
Càrrec: Direcció General

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



AREA de PROTECCION RADIOLOGICA
de LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA SPR/V-0007

AREA de PROTECCIO RADIOLOGICA
de la UNIVERSIDAD DE VALÈNCIA SPR/V-0007

CERTIFIQUE:
CERTIFICA:

SÁNCHEZ LÓPEZ, ITZIAR AINHOA

Amb document d'identitat: 75757308T va intervenir en les activitats següents:
Con documento de identidad: ha intervenido en las siguientes actividades:

CURS: PROTECCIÓ RADIOLÒGICA EN RADIOFARMÀCIA
CURSO: PROTECCIÓN RADIOLÓGICA EN RADIOFARMACIA

Celebrado en:	València	Del:	04/06/2018	al:	12/06/2018
Celebrado en:	Valencia				
Funció:	ALUMNE	QUALIFICACIÓ	ASSISTÈNCIA		
Función:	ALUMNO	CALIFICACIÓN	ASISTENCIA		
Duració:	13 HORES				
Duración:	13 HORAS				

I porque conste, a petició de la persona interessada, i l'efecte previst en la legislació vigent, es lliura aquest CERTIFICAT a València, a vint i cinc de juliol de dos mil diuit.

Y para que conste, a petición de la persona interesada, y a los efectos previstos en la legislación vigente, se expide este CERTIFICADO en Valencia, a veinticinco de julio de dos mil dieciocho

Àrea de Protec
Radiològica

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

ANA SAN MATÍAS
TÉCNICO DE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

MUSTAFA HASSAN EZZ EDDIN,
TÉCNICO UNIDAD CENTRAL INVESTIGACIÓN DE MEDICINA

SÁNCHEZ LÓPEZ, ITZIAR AINHOA

PR EN RADIOFARMACIA JUNIO 2018

