



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**Estudio de la toxicidad cardiovascular de
abacavir en pacientes infectados por VIH
e implicación del secretoma liberado
por los neutrófilos**



Mariam Blanch Ruiz



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Universitat de València

Estudio de la toxicidad cardiovascular de Abacavir
en pacientes infectados por VIH e implicación del secretoma
liberado por los neutrófilos

Tesis Doctoral

María Amparo Blanch Ruiz

Directores

Ángeles Álvarez Ribelles

Juan V Esplugues Mota

María Ángeles Martínez Cuesta

Valencia, 2023

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

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

Dña. **María Ángeles Martínez Cuesta**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por **María Amparo Blanch Ruiz**, titulado “**Estudio de la toxicidad cardiovascular de abacavir en pacientes infectados por VIH e implicación del secretoma liberado por los neutrófilos**” para obtener el grado de Doctor ha sido realizado bajo nuestra supervisión y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de la presente Tesis Doctoral, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, firmamos en Valencia, a 19 de junio de 2023.

ANGELES ALVAREZ RIBELLES | Firmado digitalmente por ANGELES ALVAREZ RIBELLES
Fecha: 2023.06.19 14:28:02 +02'00'

Ángeles Álvarez Ribelles

JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA | Firmado digitalmente por JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA
Fecha: 2023.06.20 14:17:39 +02'00'

Juan V Esplugues Mota

MARIA ANGELES MARTINEZ CUESTA | Firmado digitalmente por MARIA ANGELES MARTINEZ CUESTA
Fecha: 2023.06.19 18:12:20 +02'00'

María Ángeles Martínez Cuesta

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.

RT2018-94436-B-I00. Receptores P2X7 y respuesta inflamatoria vascular: desde la evidencia obtenida con abacavir hasta la caracterización de nuevos mediadores protombóticos. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Investigadores principales: Juan V Esplugues Mota y Ángeles Álvarez Ribelles.

PROMETEO 2018/141. 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

Becas de iniciación a la actividad investigadora. Fundación Juan Esplugues.

FPU17/04249. Ayudas para la formación de profesorado universitario. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Becas de movilidad internacional para estudiantes de doctorado. Vicerrectorado de Internacionalización y Cooperación, Universitat de València.

EMBO Scientific Exchange Grant 9546. European Molecular Biology Organization.

ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ABC-MP	Abacavir monofosfato
ADA	Desaminasa de adenosina
ADAM	Desintegrinas y metaloproteinasas
ADAMTS13	Desintegrina y metaloproteinasa con el dominio 13 para la trombospondina-1
ADH	Alcohol deshidrogenasa citosólica
ADK	Adenosina fosfotransferasa
ADP	Adenosina difosfato
AGE	Productos finales de glicación avanzada
AM	Acetoximetil éster
ATP	Adenosina trifosfato
ATZ	Atazanavir
AUC	Área bajo la curva
BIC	Bictegravir
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Proteína de la cápside interna
CBV-DP	Carbovir difosfato
CBV-MP	Carbovir monofosfato
CBV-TP	Carbovir trifosfato
CCR5	Receptor de quimiocinas C-C 5
CDA	Desaminasa de citidina
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CK	Creatín quinasa
CRP	Proteína C reactiva
CXCR4	Receptor de quimiocinas C-X-C 4
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DAVID	Base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado
DESC	Desconocido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOR	Doravirina
DPBS+	Solución salina tampona de Dulbecco con Ca ²⁺ y Mg ²⁺
DPBS-	Solución salina tampona de Dulbecco sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺
DRV	Darunavir
DRV/c	Darunavir potenciado con cobicistat
DTG	Dolutegravir
EBM-2	Medio basal de células endoteliales
EDF1	Factor 1 relacionado con la diferenciación endotelial
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ESL-1	Ligando 1 de E-selectina
EVG	Elvitegravir
EVG/c	Elvitegravir potenciado con cobicistat

FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FSC	<i>Forward scatter</i>
FTC	Emtricitabina
GA-1000	Sulfato de gentamicina y anfotericina B
GO	<i>Gene ontology</i>
gp	Glicoproteína
GUK1	Guanilato quinasa
HBSS	Solución salina de Hanks equilibrada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEMO	Hematológico
HMGB1	Caja 1 del grupo de alta movilidad
HO/BI	Homosexual / Bisexual
HSP	Proteína de choque térmico
HTSX	Heterosexual
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IDU	Usuario de drogas inyectadas
IL	Interleucina
INP	Inosina fosfotransferasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido
LC-MS/MS	Cromatógrafo líquido acoplado a dos espectrómetros de masas
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA-1	Antígeno-1 asociado a la función leucocitaria
LOX-1	Receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacáridos
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MA	Proteína de la matriz
Mac-1	Antígeno-1 de macrófagos
MPO	Mieloperoxidasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NC	Proteína de la nucleocápside
NE	Elastasa de neutrófilos
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
NGAL	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos
NLRP3	Receptor 3 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, repeticiones ricas en leucina y el dominio de pirina
NME	Nucleósido difosfato quinasa
OMS	Organización mundial de la salud
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
PAD4	Peptidil arginina deaminasa 4
PAF	Factor activador de plaquetas

PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAR	Receptores activados por proteasas
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón de fosfato salino
PC1	Componente principal 1
PC2	Componente principal 2
PCA	Análisis de componentes principales
PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula de adhesión-1 de células endoteliales y plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PGK1	Fosfoglicerato quinasa
PK	Piruvato quinasa
PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales
PMA	Forbol miristato acetato
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PolyP	Polifosfatos
PRP	Plasma rico en plaquetas
PS	Fosfatidilserina
PSGL-1	Ligando 1 de P-selectina
PSMD9	Subunidad reguladora 9 no ATPasa del proteosoma 26S
Rab-11A	Proteína 11A relacionada con Ras
RAGE	Receptor de productos terminales de glicación avanzada
RAL	Raltegravir
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
sLOX-1	Receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada soluble
SN_{ABC}	Secretoma liberado por neutrófilos en tratamiento con ABC
SN_{ATP}	Secretoma liberado por neutrófilos en tratamiento con ATP
SR	<i>Scavenger receptors</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
SU	Proteína de superficie
TAF	Tenofovir alafenamida
TDF	Tenofovir disoproxilo fumarato
TFPI	Inhibidores de la vía del factor tisular
TFV	Tenofovir
TFV-DP	Tenofovir difosfato
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Proteína transmembrana
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TPa	Receptor T prostanoide a
TXA₂	Tromboxano A ₂
UGT	Uridina difosfato glucoroniltransferasa
VATE1	Subunidad E1 de la ATPasa de tipo V

VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia de simios
VLA-4	Antígeno muy tardío 4
vWF	Factor von Willebrand

RESUMEN

Abacavir (ABC) es un fármaco antirretroviral perteneciente al grupo de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido, que se emplea en el tratamiento frente a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Durante las últimas décadas este fármaco ha sido uno de los más empleados frente al VIH, sin embargo, su uso se ha asociado con la aparición de eventos cardiovasculares y concretamente con un mayor riesgo de padecer infarto de miocardio. En este sentido, se ha descrito que ABC induce las primeras fases del proceso inflamatorio (interacciones leucocito-endotelio) y también las primeras interacciones celulares que dan lugar a la formación de trombos (interacciones plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito), que a su vez pueden desencadenar eventualmente en el infarto de miocardio. Además, en un modelo murino de trombosis, se demostró que ABC era capaz de inducir la formación de trombos en presencia de otro factor de riesgo. El efecto de ABC sobre estas interacciones ha sido analizado *in vitro* con muestras de donantes sin infección por VIH. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron evaluar estas interacciones en muestras de pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC, y también profundizar en los mecanismos responsables de estos efectos en muestras de donantes sin infección por VIH.

Por un lado, se utilizaron muestras de sangre obtenidas de pacientes en tratamiento con ABC, de las que se aislaron leucocitos y plaquetas, que se emplearon para analizar las diferentes interacciones. Las células endoteliales empleadas se obtuvieron de cordones umbilicales obtenidos de donantes sin infección por VIH. En estos pacientes se analizaron las interacciones de leucocitos y plaquetas con células endoteliales mediante una cámara de flujo, la agregación plaquetaria con un agregómetro de impedancia, y por citometría de flujo la adhesión de plaquetas sobre leucocitos y la expresión de diferentes moléculas de adhesión tanto en leucocitos como en plaquetas, con el fin de analizar la activación de estas células. Así, se observó que los pacientes en tratamiento con ABC presentaban un incremento en las interacciones leucocito-endotelio (tanto de leucocitos polimorfonucleares como mononucleares), en las interacciones plaqueta-endotelio y en las interacciones de las

plaquetas tanto con los neutrófilos como con los monocitos, con respecto a otros pacientes en tratamiento con tenofovir (TFV) y con respecto a los donantes control. También se demostró, un aumento de la agregación plaquetaria en los pacientes en tratamiento con ABC en comparación con aquellos en tratamiento con TFV. En cuanto a la expresión de las moléculas de adhesión se observó un incremento de la molécula de adhesión Mac-1 en leucocitos, y GPIIb/IIIa en plaquetas, en los pacientes en tratamiento con ABC en comparación con aquellos en tratamiento con TFV y con los donantes control.

Por otro lado, se analizaron los mecanismos por los que ABC inducía los efectos adversos cardiovasculares, y concretamente el estudio se centró en los mecanismos responsables de la inducción de las interacciones plaqueta-neutrófilo. Se observó que el secretoma de los neutrófilos tratados con ABC era esencial para inducir estas interacciones. Además, se demostró que la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos se producía por un mecanismo dependiente del receptor P2X₇ en neutrófilos, la liberación de la forma soluble del receptor LOX-1 (sLOX-1) en el secretoma por la escisión producida por ADAM10 y ADAM17, la proteína HSP70, y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ en plaquetas.

Por último, también se comprobó que este mecanismo se podía extrapolar a procesos fisiopatológicos, en particular, al agonista endógeno del receptor P2X₇, la adenosina trifosfato (ATP) que reprodujo los efectos de ABC. Así, se demostró que el secretoma liberado por los neutrófilos tratados con ATP inducía la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos. El mecanismo por el que ATP induce estas interacciones también es dependiente de la escisión - por parte de ADAM10 y ADAM17 - de LOX-1 y de su liberación en el secretoma. Además, en plaquetas la proteína HSP70, y los receptores P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ también serían responsables de estos efectos.

Todos estos resultados ponen de manifiesto el perfil cardiotóxico de ABC, y permiten esclarecer el mecanismo por el que ABC podría ejercer esta toxicidad, siendo el receptor P2X₇ y sLOX-1 liberado por neutrófilos los responsables de dicha toxicidad.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Four decades after acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) was first described and human immunodeficiency virus (HIV) identified, it is estimated by the United Nations program on HIV/AIDS (UNAIDS), that 38.4 million people are currently infected with the virus, and that approximately 39 million have died to date. However, the number of deaths associated with HIV infection has decreased substantially over the years, despite the fact that the number of people living with HIV has been increasing. This is because this once terminal disease is now a manageable chronic illness thanks to the development of antiretroviral therapy. In this sense, 1987 saw the first drug approved for the treatment of the infection: zidovudine. Nevertheless, a decrease in mortality was not achieved until combined antiretroviral therapy was introduced in 1996. Combined antiretroviral therapy consists of the use of 3 or more drugs that act against at least two different targets of the biological cycle of the virus, thus blocking or inhibiting some phase of the biological cycle of the virus. In this sense, there are 5 groups of antiretroviral drugs: entry inhibitors, nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, integrase inhibitors, and protease inhibitors.

Combined antiretroviral therapy is currently being used for the treatment of HIV infection, allowing viraemia levels to be reduced to the point of being undetectable. Hence, this antiretroviral therapy is effective in restoring patients' health and minimizing secondary transmission of the virus, but it does not eradicate HIV. In fact, today HIV infection is the second leading cause of death, after traffic accidents, among young people (aged 25-49) globally. This reality highlights the need to develop an effective cure capable of completely eradicating the virus. However, despite the growing research and the accumulation of scientific evidence for the cure of HIV, such therapy is not yet close to being established.

According to the recommendations of the International Antiviral Society, all HIV-infected patients with a detectable viral load, regardless of their CD4⁺ cell count, should start antiretroviral therapy as soon as possible after diagnosis. In 2012, Truvada® (a combination of tenofovir disoproxil fumarate [TDF] and emtricitabine [FTC]), was the first drug approved for use in pre-exposure prophylaxis and in the prevention of new HIV infections.

The aforementioned recommendations include a set of preferential guidelines for the majority of HIV-infected patients. These combinations have the highest rates of viral suppression, minimal toxicity, few drug interactions, and reduced pill burden. Combinations that are less likely to be associated with the emergence of HIV resistance are also favored, even when adherence to the treatment is not optimal. The recommended regimens are based on the combination of 3 drugs (2 NRTIs + 1 integrase inhibitor), or a combination of 2 drugs (1 NRTI + 1 integrase inhibitor). Specifically, the preferred regimens are: tenofovir alafenamide (TAF) and FTC plus bictegravir (BIC), raltegravir (RAL), or dolutegravir (DTG); or ABC and lamivudine (3TC) plus dolutegravir (DTG); or ABC and 3TC.

Antiretroviral therapy has been administered to more than 27.5 million people to date, has saved millions of lives, and has dramatically improved life expectancy and quality of life for HIV-infected patients. However, it has historically been related to different adverse effects; in addition, as patients age previous pathologies can be aggravated by antiretroviral therapy. All this means that the scientific community is currently focusing on the study of the toxicity of these drugs due to various factors: first, because eradication of HIV seems unlikely with current therapy, and therefore treatment must be chronic to maintain clinical benefits; and second, because the severity of the HIV epidemic led to an acceleration in the approval process of many antiretroviral agents, even though little known was often known about their long-term safety. In this sense, data obtained from a prospective cohort study show that up to 44% of patients with antiretroviral therapy suffer adverse reactions related to therapy, and these reactions

are moderate to severe in 20% of cases. In addition, 23% of these patients display abnormal blood test values that require direct medical attention or intervention.

Regarding the association of antiretroviral therapy and cardiovascular diseases, in 2003 it was described in patients with HIV infection that a longer exposure time to combined antiretroviral therapy was associated with a greater risk of suffering cardiovascular events, and specifically myocardial infarction. In this sense, protease inhibitors were first targeted, as they induce dyslipidemia. However, in 2005, a study conducted by the World Health Organization (WHO) analyzed 34 HIV-infected patients who had suffered a myocardial infarction, all of whom were receiving ABC as part of their treatment, though with different combinations, and it was observed that protease inhibitors were not included in the regimens of 9 of these patients. Based on these data, it was concluded that the association between ABC and myocardial infarction could not be ruled out and that further studies were required. In the following years, different research was published analyzing this association. In 2008, a study by the HIV Drug Adverse Events and Data Collection (D:A:D) group, which included a large number of patients, reported an association of ABC - both on current treatment and in the last 6 months - with an increased risk of myocardial infarction that disappeared 6 months after discontinuing treatment. Nevertheless, a longer period of drug use did not induce an increased risk of myocardial infarction. That same year, an observational study named SMART/INSIGHT also showed that the risk of cardiovascular disease doubled in patients treated with ABC than in those on TDF treatment. Nevertheless, other studies refuting the association of ABC with cardiovascular disease were also published. Among the studies that did not support this association, some showed the incidence of cardiovascular events to be similar in patients treated with ABC/3TC or TDF/FTC. However, the mean age of patients in these studies was significantly lower (over 40 years) than in the D:A:D group study (50 years). On the other hand, the other study that found no association between ABC and cardiovascular events reported a marginal increase in the risk of myocardial infarction

in patients treated with ABC, which was not confirmed after adjusting for age and predisposing cardiovascular factors.

The aforementioned studies generated one of the greatest controversies in the area of HIV therapy, which prompted a change in clinical guidelines; namely, ABC was no longer recommended in patients with cardiovascular risk. However, research continued to be carried out in order to clarify the association of ABC with cardiovascular risk. In this sense, in 2010, the D:A:D group once again published a study in which they evaluated the vascular profile of all the NRTIs available to that date, confirming that the increased risk of myocardial infarction was associated with the use of ABC, and not with other NRTIs widely used in treatment, such as TDF. In addition, this study matched the characteristics of the patients from the different groups, such as cholesterol and triglyceride levels, blood pressure, or diabetes mellitus. Likewise, analyzing the evolution of this same cohort, the D:A:D group published a new study in 2016, which included the changes produced in clinical practice due to the reduction in ABC prescriptions in patients with increased cardiovascular risk. Similarly, they showed that recent ABC use was associated with a 1.98 increase in the risk of myocardial infarction.

All these results have confirmed that ABC's cardiotoxicity is associated with the existence of comorbidities or other additional risk factors. However, these studies did not examine the possible mechanisms by which ABC causes this cardiovascular toxicity. It was initially shown that the drug has a neutral lipid profile and does not interfere with insulin sensitivity. Later, studies analyzed the levels of different cardiovascular biomarkers in the blood of patients receiving treatment with ABC, but did not obtain clear results (in some cases results were contradictory; for example, regarding the levels of interleukin (IL)-6 or D-dimer), which fueled the controversy surrounding this drug. On the other hand, most studies suggest that ABC has a vascular profile of acute inflammation. In this line, different studies have been carried out *in vitro* with human cells from non-HIV-infected donors, *ex vivo* with samples from

HIV-infected patients on different treatments, or *in vivo* with animal models to analyze the effects of ABC on platelet activation, leukocyte accumulation and endothelial function.

The research group with which I have been collaborating in recent years has focused on the study of the mechanisms by which ABC produces vascular toxicity. In this sense, we observed that clinically relevant concentrations of ABC induce an increase in leukocyte-endothelium interactions (decreasing rolling velocity and thus increasing the rolling and adhesion of leukocytes along the vascular endothelium). It was also observed that ABC induces an increase in the expression of the adhesion molecules macrophage antigen 1 (Mac-1) in leukocytes and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in endothelial cells, and that the interactions between these adhesion molecules is responsible for the aforementioned interactions. Due to the structural similarity of the drug with the physiological ligands of these receptors (the endogenous purines adenosine triphosphate [ATP], adenosine diphosphate [ADP], etc.), the possible involvement of purinergic receptors in the effects of ABC was explored. During inflammatory and thrombotic processes, vascular cells release adenosine and ATP into the extracellular medium. Adenosine exerts anti-inflammatory actions, while ATP participates in the development of inflammation, since it modulates the production and release of cytokines, and the activation, migration and proliferation of immune cells; therefore, it is considered a molecule of communication between different cells that is capable of warning of some danger in the organism (considering it a DAMP). In this sense, ATP is found almost exclusively inside the cells (~mM) in healthy tissues, while concentrations at the extracellular level are very low (~nM). On the contrary, in response to tissue injury, immune cells release ATP, which reaches high concentrations (~100µM) in the extracellular medium. ATP acts as an extracellular signaling molecule through purinergic signaling receptors. Different families of receptors have been described for adenosine (P1) and for ATP and ADP (P2). The P1 family is made up of 4 G protein-coupled receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) that act via the adenylate cyclase pathway. In the P2 family, 7 P2X receptors (P2X₁, P2X₂,

P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) and 8 P2Y receptors (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) have been described.

Our research group has been the first to show that the already reported effect of ABC on leukocyte-endothelium interactions was due to the action of this drug on P2X₇ receptors, ruling out other receptors such as P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2Y₂, P2Y₆ and P2Y₁₁. The P2X₇ receptor has been the last characterized receptor of the P2X family, and was originally named P2Z, since it has a unique structure and requires unusually high ATP concentrations for activation (with a 50 effective concentration of ~500μM) compared to the rest of the receptors of this family. In fact, the ATP concentrations that are required for its activation are not found in physiological conditions, and are even difficult to achieve in pathological processes. This suggests the existence of allosteric modulators - which are ligands that bind to a receptor site that is spatially separate from the orthosteric binding site and which is capable of modulating the binding affinity, potency or efficacy of the orthosteric ligands - make the receptor more sensitive to low concentrations of ATP. In this regard, a significant number of endogenous allosteric modulators have been described, both positive (nicotinamide adenine dinucleotide [NAD], phosphoinositides, lysophosphatidylcholine, lipopolysaccharides [LPS]) and negative (Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺), as well as other exogenous molecules. In this regard, our research group has demonstrated, by analyzing in detail the activation of the P2X₇ receptor by ABC, that the drug acts as an allosteric modulator of this receptor, making it more sensitive to low ATP concentrations that facilitate the leukocyte-endothelial interactions through the P2X₇ receptor.

Regarding the effects of ABC on endothelial cells, it has been described that, in addition to an increase in the adhesion molecule ICAM-1, ABC induces a decrease in the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), thus augmenting oxidative stress. In addition, an increase in the levels of tissue factor after stimulation with tumor necrosis factor α (TNF- α) has been reported, both in the cells themselves and in the microparticles released by them.

Following our studies, it was shown that ABC induces platelet-endothelium interactions mediated by the adhesion molecules ICAM-1 and P-selectin on the endothelium and GPIIb/IIIa and GPIb α on platelets. Likewise, these interactions are due to the effect of ABC on endothelial cells - not a direct effect on platelets - and specifically through the P2X₇ receptor on endothelial cells.

These interactions can eventually trigger thrombosis. Thrombosis is a pathological process that occurs as a consequence of an imbalance in hemostasis, producing the formation of clots (or thrombi) in the lumen of blood vessels. One of the physiological functions of hemostasis is to prevent blood loss when tissue injury occurs. However, thrombosis is the consequence of an excess of hemostatic processes in response to certain pathologies that cause endothelial damage, lipid deposition, and the formation of atherosclerotic plaques in the arterial wall, as well as hyperactivity of coagulation factors. In fact, thrombosis is a critical event in arterial diseases associated with myocardial infarction and stroke, as well as in venous thromboembolism, which determine the highest morbidity and mortality rates in developed countries. The coagulation process begins when a rupture occurs in the wall of a blood vessel or in the endothelium. This lesion triggers the release of collagen - located in the subendothelial layer - and tissue factor - by endothelial cells and leukocytes - into the blood flow. In this way, platelets can be activated through two different routes. In one of these pathways, platelets bind to collagen via the adhesion molecule GPVI, and this binding triggers the activation of another platelet collagen receptor, α 2 β 1 (GPIa/IIa), which is involved in the firm adhesion of platelets to collagen. In addition, these interactions generate a series of intracellular signals that produce platelet activation and degranulation. This degranulation releases a series of platelet agonists that induce the activation and degranulation of the surrounding platelets, thereby amplifying the process. In this regard, platelet activation occurs when one of the ligands for receptors on the surface of platelets binds to them. The main inducers of platelet activation are thrombin, thromboxane, epinephrine, collagen, and ADP. Platelet activation induces both a change in the shape of platelets and the release of

the content of their granules. In this sense, platelets basically contain three types of granules: α granules, dense granules and lysosomes. α granules are reservoirs of different platelet adhesion molecules, including P-selectin, GPIb α (CD42b) and GPIIb/IIIa (α IIb/ β 3, CD41/CD61), cytokines and also different growth factors. The release of dense granules produces the release of ADP, ATP, polyphosphates, serotonin and Ca²⁺, among others. ADP is essential as a cofactor of platelet activation and aggregation, and it acts by interacting with two G protein-coupled receptors on the surface of platelets: the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors. Both receptors act synergistically on platelet activation. The P2Y₁ receptor is probably the one that causes the initial activation, which can be reversible, whereas the P2Y₁₂ is necessary for prolonged activation. On the other hand, in addition to ADP, dense granules also release large amounts of ATP, which can activate P2X₁ receptors. Activation of this receptor produces an influx of Ca²⁺, which leads to a conformational change of platelets and a second release of granules, but does not induce platelet aggregation. Therefore, the signaling of the P2X₁ receptors is not considered key to aggregation, while it is key to the modulation of the platelet response. In this sense, it is important to consider that the response generated by the P2X₁ receptors is not maintained for a long time, due to the rapid and continuous desensitization of these receptors. Lastly, platelet lysosomes contain different proteases that facilitate the degradation of the extracellular matrix.

Platelet aggregation begins after platelet activation and occurs as a result of the activation of the adhesion molecule GPIIb/IIIa (α IIb/ β 3, CD41/CD61). This is the most abundant adhesion molecule in platelets and is constitutively expressed on their platelet surface. When platelets are in a quiescent state, GPIIb/IIIa is in an inactivated state; however, the activation of certain platelet receptors coupled to the G protein induces a series of conformational changes in this glycoprotein, triggering its activation. Upon activation, GPIIb/IIIa binds to extracellular adhesion molecules, such as von Willebrand factor (vWF), fibrinogen, fibronectin, and thrombospondin.

Additionally, this adhesion molecule forms fibrin bridges between different platelets, thereby participating in the cohesion and growth of the thrombus.

In this sense, regarding the studies referring to the effects of ABC on platelet function, a distinction must be made between those carried out *ex vivo* with samples from patients receiving treatment with the drug and those carried out *in vitro* with samples from non-HIV-infected donors. On the one hand, in *ex vivo* studies, an increase in platelet aggregation was observed after stimulation with different platelet agonists (ADP, collagen, epinephrine, TRAP, or the thromboxane A₂ receptor agonist) in patients undergoing treatment with ABC compared with those on other treatments, mainly TDF. However, these studies have shown contradictory results regarding the effects produced after stimulation with the different agonists. Likewise, in *ex vivo* studies, it was observed that platelets obtained from patients treated with ABC presented a higher expression of P-selectin and CD40L and a decrease in intraplatelet cyclic guanosine monophosphate (cGMP) compared to patients treated with TDF, in addition to an increase in the expression of GPIIb/IIIa compared to patients without treatment. On the other hand, in our studies carried out *in vitro*, in which we analyzed the effects of ABC *per se*, no changes were observed in the aggregation or in the expression of P-selectin and GPIIb/IIIa, nor in the mobilization of calcium in platelets. Neither were changes in platelet aggregation observed when it was stimulated with agonists such as ADP, collagen or TRAP after treatment with ABC. However, in other studies, the drug induced an increase in the expression of P-selectin and CD63 after collagen stimulation.

Platelets play a crucial role in thrombotic processes; however, although they can perform some of their functions individually, their interactions with other vascular cells are essential for many others. In this context, the role of neutrophils in thrombosis has acquired special importance in recent years. Although the presence of neutrophils in thrombi was first described years ago, the mechanisms by which these leukocytes participate in the thrombotic process have not been fully characterized. Because

neutrophils are key players in innate immunity and inflammation, and because of their ability to interact with other vascular cells, there may be a link between inflammation and the initiation of thrombus formation. In this sense, neutrophils are secretory cells that release a large number of soluble mediators and other complex cellular structures - such as extracellular vesicles and neutrophil extracellular traps (NETs) - that can trigger the activation of other vascular cells - such as platelets - and, therefore, promote the process of immunothrombosis.

In fact, one of the latest studies by our research group has concluded that ABC induces an increase in platelet-neutrophil interactions, and that this interaction is due to an effect of the drug on neutrophils, and not on platelets. The adhesion molecules involved in these interactions are P-selectin in platelets and P-selectin ligand 1 (PSGL-1) in neutrophils. All of this could explain the findings of our research showing that ABC is capable of inducing thrombus formation in a murine model of thrombosis induced by FeCl₃, an effect that is also dependent on the P2X₇ receptor.

In brief, our previous studies suggest that ABC induces vascular inflammation by acting on leukocytes and the endothelium - through the P2X₇ receptor in both cell types - and promoting the adhesion of leukocytes to endothelial cells. In addition, the activation of these two cell types would also appear to lead to the adhesion of platelets to both. All these processes can lead to thrombus formation, despite the fact that ABC does not induce platelet aggregation.

The described effects of ABC on vascular inflammation parameters (leukocyte-endothelium interactions), as well as on processes prior to thrombus formation (platelet-leukocyte and platelet-endothelium interactions), have been obtained using blood samples from donors without HIV infection. Nevertheless, infection, or the presence of the virus itself, is an additional parameter to consider, since it could potentiate the pro-inflammatory effects of ABC already described *in vitro* in the blood of healthy donors. Therefore, complementary studies carried out in blood from HIV

patients are necessary and form part of the present research. This objective is all the more important given the fact that HIV patients take other antiviral agents which could interact with and/or condition the effects of ABC. For this reason, we consider the analysis of the effects of ABC on these parameters to be of special relevance, as a simulation of what happens in clinical practice, as we have performed the analysis in samples from HIV-infected patients on chronic treatment with the drug. However, because patients do not receive just one drug (antiretroviral therapy consists of a combination of three drugs), effects cannot be directly attributed to ABC. For this reason, the analysis of these parameters in samples from HIV-infected patients to which ABC is added *in vitro* is also essential.

On the other hand, there is a lack of studies concerning the mechanism by which ABC is capable of inducing platelet activation and platelet-neutrophil interactions. Although it has been observed that these interactions are due to the effect of ABC on neutrophils rather than a direct effect on platelets, and that direct contact between these two cell types is not required to produce platelet activation, the possible involvement of the secretome released by drug-treated neutrophils in such effects has not been determined.

In our investigations about ABC's toxicity, we have discovered the importance of the allosteric modulation of the P2X₇ receptor by ABC, which points to a physiological role of this receptor in cellular homeostasis at physiological and non-pathogenic ATP concentrations. The endogenous allosteric modulator responsible for this action is yet to be discovered, but such knowledge would change the biological significance of the P2X₇ receptor.

AIMS

The main aim of this Doctoral Thesis has two aspects, on the one hand, to evaluate the inflammatory and/or prothrombotic effect of the antiretroviral drug Abacavir (ABC) in samples from HIV-infected patients; and, on the other hand, to analyze the mechanism by which ABC induces platelet activation.

In particular, the following specific objectives were established:

1. Study the inflammatory and thrombogenic status in samples from HIV-infected patients in whom ABC or Tenofovir, is part of antiretroviral therapy.
2. Evaluate the effect of ABC on inflammatory and thrombogenic processes when added *in vitro* to samples from HIV-infected patients
3. Analyze the mechanism by which ABC induces platelet activation. To this end, the following objectives were addressed:
 - 3.1. Study the possible release of an active secretome by neutrophils in response to ABC.
 - 3.2. Determine the involvement of the P2X₇ purinergic receptor of neutrophils in the release of the secretome.
 - 3.3. Evaluate the composition of the secretome and the involvement of its proteins in the effects of ABC.
 - 3.4. Determine the signaling mechanisms of the secretome on platelets.
4. Check if the effects of ABC can be extrapolated to the endogenous agonist of purinergic receptors, ATP.
5. Evaluate the effects of ABC and ATP on the release of NETs.

METHODOLOGY

COMPARATIVE STUDY OF HIV PATIENTS ON TREATMENT WITH ABACAVIR OR TENOFOVIR

In order to carry out the first objective, which was to evaluate the inflammatory and thrombogenic state in patients receiving treatment with ABC and compare it with that in patients treated with TFV or with non-HIV-infected donors (henceforth referred to as control donors). HIV-infected patients were recruited from the Infectious Diseases Service of the Hospital Clínico Universitario de Valencia when they met the following criteria: diagnosed with HIV infection and not co-infected with hepatitis B or C; over 18 years of age; undetectable plasma viral load (less than 50 copies/mL), continuous antiretroviral treatment for at least 6 months; and no history of cardiovascular risk. Healthy (control) donors were recruited from the Centro de Transfusiones de la Comunidad Valencia when they met the following requirements: over 18 years of age; no anti-inflammatory medication in the 14 days prior to the samples being taken.

Whole blood samples were obtained from these patients, and polymorphonuclear leukocytes (PMNs), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and platelet-rich plasma (PRP) were obtained. PMNs and PBMCs were isolated by density gradient while platelet-rich plasma (PRP) by means of centrifugation, and in some cases washed platelets were also obtained from PRP.

The endothelial cells used in this study were obtained from human umbilical cord veins (HUVEC) from control donors at Hospital Clínico Universitario de Valencia. A portion of the fresh umbilical cord from donors without HIV infection (control donors) was used for the extraction of cells (from the only vein present in the umbilical cords) by enzymatic disintegration with collagenase.

The interactions of leukocytes or platelets with endothelial cells were evaluated using a parallel flow chamber, which allowed us to simulate the flow in the body's blood vessels by exposing a monolayer of endothelial cells to a constant and homogeneous flow of leukocytes or platelets. To assess the **interactions of leukocytes with endothelial cells**, confluent HUVEC cultured on circular plastic coverslips were used. The leukocytes used in this technique (both PMNs and PBMCs) were placed in Dulbecco's buffered saline solution (at a rate of $1 \cdot 10^6$ cells/mL and $0.5 \cdot 10^6$ cells/mL, respectively).

To evaluate these interactions, the flow of leukocytes over the endothelial cells was recorded. These recordings of the same field lasted for 4 min, and leukocyte rolling velocity and rolling flux parameters were subsequently analyzed. After the 4 min, 5-6 additional fields were recorded in order to analyze leukocyte adhesion parameters. The aforementioned parameters were analyzed as follows:

- **Rolling velocity:** the time required for a leukocyte in the rolling phase to travel along 100 μm of the endothelial cell monolayer. This value is obtained by calculating the mean of 20 consecutive leukocytes, and is measured in $\mu\text{m/s}$.
- **Rolling flux:** the number of leukocytes that are visible in the flow, since these leukocytes have a lower velocity when interacting with endothelial cells. This value is obtained by counting the visible leukocytes that circulate with the flow in the same field for 1 min, and is measured in cells/min.
- **Adhesion:** the number of leukocytes that remain stationary on the endothelial cell monolayer for a period equal to or greater than 30 s. This value is obtained by counting the number of leukocytes that remain stationary in 5-6 different fields and is measured in cells/ mm^2 .

Platelet-endothelium interactions were studied using a monolayer of confluent HUVEC grown on circular glass coverslips. Due to their size, platelets are marked with fluorescence so they can be seen under the microscope, since this would not be possible otherwise with the 40x objective. For this purpose, the PRP was incubated in

the dark for 30 min at 37°C with an antibody against CD41 (specific platelet marker) conjugated with Alexa®488, which was detected thanks to an epifluorescence system (Nikon Intensilight C-HGFIE) attached to the microscope. When the incubation period has terminated, centrifugation was performed to obtain washed platelets ready to be used in the adhesion chamber.

The washed and labeled platelet solution was perfused for 5 min onto the HUVEC monolayer in the adhesion chamber. Subsequently, a saline solution flowed through the chamber for another 5 min in order to eliminate the platelets in suspension that did not adhere to the endothelial cells. Finally, in order to evaluate platelet-endothelium interactions, images of 5-6 different fields were taken in both bright and fluorescent fields. Platelet adhesion (cells/mm²) was the parameter analyzed to assess these interactions. As leukocytes, platelets were considered to have attached to endothelial cells when they remained stationary on the endothelial cell monolayer for at least 30 s.

Interactions of platelets with leukocytes and the expression of the different adhesion molecules were studied by means of flow cytometry. A flow cytometer (BD FACSCalibur™) makes possible to identify the different leukocyte populations - neutrophils, monocytes, lymphocytes, and cell debris - and platelets according to their size and granularity characteristics (Forward Scatter and Side Scatter, respectively). This identification is recorded in histograms by the BD CellQuest™ Pro software. Since platelets and other cell debris are also found in the lymphocyte population, this population was not evaluated as part of the analysis described below, due to the impossibility of distinguishing only lymphocytes.

To study the interactions of platelets with leukocytes, the CD41 antibody (specific platelet marker) was conjugated with phycoerythrin (PE). The presence of the CD41 antibody in leukocyte populations is indicative of the formation of platelet-leukocyte complexes, and therefore of the adhesion of platelets to leukocytes. 10,000 events

per sample were recorded. In the first cohort, the percentage of CD41-positive leukocytes was analyzed, while in *in vitro* assays, median fluorescence intensity was evaluated.

For analysis of the **leukocyte adhesion molecules** lymphocyte function-associate antigen 1 (LFA-1), Mac-1, gp150,95, very late antigen 4 (VLA-4) and L-selectin, we employed flow cytometry and fluorescent antibodies labeled with PE or fluorescein isothiocyanate (FITC) against the subunits that form these adhesion molecules (CD11a-FITC, CD11b-PE, CD11c-PE, CD18-FITC, CD49d-PE and CD62L-FITC). Blood samples were incubated with one of these antibodies in the dark for 30 min. After incubation with the antibodies, samples were lysed and fixed with FACS Lysing Solution prior to analysis. 10,000 events per sample were recorded, and the median fluorescence intensity emitted by the corresponding antibody in the different leukocyte populations was analyzed.

Platelet activation was analyzed as the expression of P-selectin. Expression of the adhesion molecule involved in platelet aggregation, GPIIb/IIIa, was also carried out by flow cytometry. This was done by using FITC-labeled fluorescent antibodies against these adhesion molecules (CD62P-FITC and PAC-1-FITC, respectively). 30,000 events per sample were recorded, and the median fluorescence intensity emitted by the corresponding antibody in the population of platelets by the flow cytometer was analyzed.

Platelet aggregation was assessed using an impedance aggregometer (Chrono-Log Model 590-2D). This method is based on the measurement of a change in electrical resistance caused by the formation of platelet aggregates on a pair of platinum electrodes.

To carry out platelet aggregation assays, whole blood samples were diluted 1:1 with saline and deposited in the aggregometer cuvettes, which were placed in the

respective sample channels, allowing the samples to be kept at 37°C while in agitation. Next, the preparation was calibrated by adjusting to the value of 0% in the register and after this, a 20 Ω pulse was applied, and the amplitude value was adjusted to the value of 50%. In the record obtained with the AggroLink® software, the impedance variation corresponding to the formation of aggregates is represented as a curve that starts from the basal level of each sample adjusted to the value of 0% (no aggregation) and this is modified in a decreasing way as the platelet aggregates are formed. The following parameters can be measured in the recorded curves:

- **Slope:** represents the velocity of aggregation or its intensity, measured in Ω/min .
- **Amplitude:** corresponds to the maximum response of the aggregation and is measured in Ω .
- **Area under the curve (AUC):** this parameter unifies the previous two, and is measured in $\Omega\cdot\text{min}$.

Prior to the evaluation of platelet aggregation, and once the aggregometer was calibrated, samples were allowed to stabilize for 4 min, and after this period platelet agonists were added: ADP (5 μM), collagen (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or arachidonic acid (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The response generated upon the aggregation of each of these agonists was recorded for 5 min.

IN VITRO STUDY OF THE EFFECT OF ABACAVIR IN HIV-INFECTED PATIENTS

To carry out this part of the study, a cohort of HIV-infected patients - who were on antiretroviral treatment that did not include ABC - was used. These patients were recruited from the Infectious Diseases Service of Hospital Clínico Universitario de Valencia, if they met the following criteria: have diagnosis with an HIV infection and no co-infection with hepatitis B or C; over 18 years of age; an undetectable viral load in plasma (less than 50 copies/mL); continuous antiretroviral treatment that did not include ABC for at least the previous 6 months; and no history of cardiovascular risk.

Blood samples from these patients were treated (1 or 4h) with ABC 5 µg/mL which simulates the plasmatic levels present in patients receiving treatment with this drug. To carry out this part of the study, the same techniques described for the previous cohort were used.

STUDY OF THE MECHANISM BY WHICH ABC AND ATP INDUCE PRO-THROMBOTIC EFFECTS

To carry out this objective and characterize the mechanism by which ABC and ATP induce pro-thrombotic effects, blood samples were obtained from control donors. These donors were recruited from the Centro de Transfusiones de la Comunidad Valencia when they met the following requirements: over 18 years of age and no anti-inflammatory medication for at least 14 days before the samples were taken. Isolation of leukocytes, in this case only PMNs, and of platelets in the form of PRP from whole blood, was carried out in the same way as in the study of cardiovascular toxicity of ABC in HIV-infected patients.

To obtain the secretome released by the PMNs, a solution of PMNs was resuspended in saline at a concentration of $0.5 \cdot 10^6$ cells in 200 µL. After the corresponding treatments, they were centrifuged (259 xg, 6 min) and the supernatant that constituted the secretome released by these neutrophils was collected.

To explore **the effects of the secretome released by neutrophils treated with ABC (SN_{ABC}) or ATP (SN_{ATP})**, PMNs isolated from whole blood from control donors were treated with ABC (5 µg/mL), ATP (5 µM) or saline for 1 h at 37°C. After incubation, the secretomes were removed and placed in contact with a set of non-treated platelets and leukocytes for 15 min at 37°C. Subsequently, the samples were incubated in the dark for 10 min with the CD41-PE antibody, after which the samples were fixed with FACS Lysing Solution before being analyzed in the flow cytometer. 5,000 events per sample were recorded, and the median fluorescence intensity emitted by the

antibody was analyzed in the population of isolated PMNs that had been identified by the flow cytometer. In the case of platelet activation, after incubating the PMNs with ABC, the secretomes were extracted and placed in contact with non-treated platelets - PRP -, for 15 min at 37°C. Subsequently, the samples were diluted in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated in the dark for 10 min with the CD62P-FITC antibody. The samples were then diluted again with HBSS and analyzed in the flow cytometer.

Prior to treatment with ABC or ATP, in order to evaluate the involvement of purinergic receptors and a disintegrin and metalloproteinase (ADAM)10 and ADAM17 in the effects induced by secretomes, PMNs were pre-treated for 30 min at 37°C with antagonists of purinergic receptors: P2X₁ (NF449, 100 µM), P2X_{2/3} (A317491, 25 nM), P2X₄ (5-BDBD, 1.5 µM), or P2X₇ (A804598, 1 µM), or with ADAM10 (GI254023X, 10 µM) and/or ADAM17 (TAPI-1, 2 µM) inhibitors.

To study the involvement of lectin-like oxidized low-density lipoprotein 1 (LOX-1) in the effects induced by the secretomes, secretomes were pre-treated prior to their addition to the set of platelets and/or PMNs with the LOX -1 receptor blocking antibody (10 µg/mL) or with its isotype control for 30 min at 37°C.

Finally, to analyse the mechanism by which platelets are activated by secretomes, platelets - PRP - were pre-treated prior to addition of the secretomes for 15 min at 37°C with the inhibitors of heat shock protein (HSP)70 (VER-155005, 20 µM) or of the release of granules (glyoxylate, 100 µM), or with the receptor antagonists P2X₁ (NF449, 100 µM), P2Y₁ (MRS2500, 100 µM) or P2Y₁₂ (AR-C 66096, 10 µM).

Analysis of the **expression of the P2X₇ receptor**, the implication of the **LOX-1** receptor and the metalloproteases **ADAM10** and **ADAM17**, the **mobilization of Ca²⁺**, the **production of ROS** and the **formation of pores in the cell membrane** was carried out by flow cytometry using fluorescent antibodies or dyes against each of

these receptors; specifically P2X₇-FITC, LOX-1-FITC, ADAM10-PE and ADAM17-PE, the dye FLUO-4 acetoxymethyl ester, the dye 1,2,3-Dihydrorhodamine, and the dye of high molecular weight YO-PRO-1, respectively. Samples - whole blood in the case of studying the expression of P2X₇, LOX-1, ADAM10 and ADAM17, and the production of ROS in leukocytes; or isolated PMNs in the case of studying the mobilization of Ca²⁺ and the formation of pores in the cell membrane; or PRP (diluted in HBSS) when analyzing P2X₇ and LOX-1 expression in platelets -were incubated with their respective antibodies or dyes in the dark for 30 min. After incubation with antibodies or dyes, samples were either lysed and fixed with FACS Lysing Solution for whole blood, or diluted with HBSS for the PRP assay prior to analysis in the flow cytometer. 10,000 and 30,000 events were recorded per sample in whole blood and PRP, respectively. Finally, the median fluorescence intensity emitted by the corresponding antibody or dyes in the different populations of leukocytes or in the population of platelets was analyzed.

For the study of the **composition of the secretomes** released as an effect of ABC in neutrophils, PMNs extracted from control donors were pre-treated with 1 μM of the P2X₇ receptor antagonist A804598 or with saline for 30 min at 37°C. After this incubation period, PMNs were treated with ABC 5 μg/mL or with saline for 1h at 37°C. On the other hand, to study the composition of the secretomes released by the effect of ATP on neutrophils, the PMNs were treated with ATP 5 μM or with saline for 1h at 37°C. The study of the composition of the secretome released by PMN was carried out in the Proteomics Service within the Central Support Service for Experimental Research of the University of Valencia, using a reverse phase C18-CL column (3 μm C18-CL, 75 μm 0.5 mm, Nikon) coupled to two nanoESI qTOF mass spectrometers (5600 TripleTOF, Absciex) (LC-MS/MS).

To evaluate the effects induced by ABC and ATP on thrombus formation in an ***in vivo* murine model** and the mechanisms responsible for said effects, we employed intravital microscopy; an orthostatic microscope (Nikon Optiphot-2 SMZ1) equipped

with a 20x objective and a 10x ocular was coupled to a camera (Nikon DS-Fi3) that recorded the images using the NIS-Elements Basic Research software.

To assess the effects of ABC on thrombus formation, a FeCl₃-induced murine model of thrombosis was developed. This model is one of the most widely used and validated murine models of thrombosis. FeCl₃ acts by producing endothelial damage by inducing the release of ROS, which leads to endothelial dysfunction. The FeCl₃ concentration used was 25 mM, since previous studies evaluated the effects of different FeCl₃ concentrations (25-100 mM) and found that this concentration did not cause thrombus formation *per se*. Therefore, for the present study, in which we set out to evaluate whether ABC and ATP are capable of inducing thrombus formation, we employed a concentration of FeCl₃ that does not induce it *per se*, but rather predisposes the organism to thrombus formation by other agents or conditions with potential thrombogenic effects that, by themselves, are not capable of inducing these effects.

To evaluate the effect of ABC and ATP on thrombus formation, an acute treatment model was carried out in which ABC (5 µg/mL, 4 h) was injected into mice intrascrotally, while ATP (0.1 - 1 µM, 1 h) and rofecoxib (0.1 mg/Kg, 2 h) were injected intraperitoneally. In order to study the mechanisms involved in the thrombosis induced by these drugs, in some cases mice were pre-treated intraperitoneally for 30 min with: different purinergic receptor antagonists - P2X₁ (NF449, 10 mg/kg), P2X_{2/3} (A317491, 0.1 µg/kg), P2X₄ (5-BDBD, 1 mg/kg), P2X₇ (A804598, 1 µg/kg), P2Y₁ (MRS2500, 2 mg/kg), P2Y₁₂ (clopidogrel, 8.5 mg/kg) -, the LOX-1 receptor blocking antibody (100 µg/mL) or with its isotype control, with an HSP70 inhibitor (VER-155008, 50 mg/kg), with an inhibitor of granule release (clodronate, 10 mg/kg), or with DNase I (1000 U/mL).

STUDY OF THE EFFECT OF ABC AND ATP ON THE RELEASE OF NETs

Lastly, a final approach was carried out in order to evaluate the capacity of ABC and ATP to induce the formation of NETs. This part of the study was carried out by using the immunocytochemical technique with PMNs isolated from blood from donors without HIV infection. For the specific detection of NETs, it is essential to carry out a joint labeling of at least two typical markers of NETs release; therefore, in this case, we employed labeling of the DNA of the NETs - using DAPI - and the myeloperoxidase (MPO) - using the antibody against this protein conjugated to FITC -, a protein typically bound to the structure of NETs. The samples were visualized in a fluorescence microscope (Leica DMI8) with 20x and 40x objectives, and images of 5-6 different fields per sample were taken using the Leica LAS X software in order to analyze NETs.

RESULTS

COMPARATIVE STUDY OF PATIENTS UNDER TREATMENT WITH ABACAVIR AND TENOFOVIR

A total of 88 individuals were included in this cohort: 60 were patients with HIV infection, 27 of whom were receiving ABC as part of their antiretroviral treatment and 33 of whom were receiving TFV; while the remaining 28 were healthy donors (controls). None of the patients in the cohort were receiving treatment with statins, antihypertensive, or diabetes drugs. Regarding demographic characteristics and cardiovascular risk parameters, no differences were observed between the two groups of HIV-infected patients.

The results concerning leukocyte-endothelium interactions showed that PMN rolling velocity was lower and there were a higher number of rolling PMN in HIV-infected patients taking ABC compared to both HIV-infected patients taking TFV and control

donors. In addition, PMN adhesion was higher in the group of patients with ABC than in the TFV group. It should be mentioned that the number of rolling PMN in patients in the TFV group was also increased in comparison with controls. PMN rolling velocity and adhesion parameters did not differ between the group of patients treated with TFV and the control group. Regarding PBMCs, there were no differences between the groups in rolling velocity. On the other hand, patients with ABC presented a higher number of PBMCs rolling and adhering to the endothelium than patients treated with TFV or control donors. In addition, the numbers of rolling PBMC were also higher in patients in the TFV group than in control donors. In brief, a significantly higher inflammatory state was observed in HIV-infected patients treated with ABC than in those treated with TFV, although TFV-treated patients displayed a pattern of slight inflammation in some parameters compared to controls.

In the case of platelets, samples from the patients with HIV infection – both those treated with ABC or TFV – presented an increase in the number of platelets adhering to the endothelium compared to controls. In addition, it should be noted that this parameter was also higher in the ABC group in comparison to the TFV group.

Patients with HIV infection receiving ABC treatment, but not those with TFV treatment, presented an increase in platelet-neutrophil interactions with respect to the group of control donors. This parameter was more pronounced in the ABC group compared to the TFV group. Therefore, we could confirm that ABC treatment was inducing platelet adhesion to both endothelium and neutrophils.

Regarding platelet aggregation in response to different agonists (ADP 10 µg/mL, collagen 2 µg/mL or arachidonic acid 0.5 µg/mL); although there was an evident upward trend in platelet aggregation in the group of HIV-infected patients in treatment with ABC compared to control donors, the difference was not statistically significant. Interestingly, platelet aggregation in the TFV group presented a downward trend with respect to control donors, which was significant in the case of

stimulation with arachidonic acid. When the two treatment groups were compared, a significant increase in platelet aggregation stimulated by ADP, collagen, and arachidonic acid was observed in the ABC group. We concluded that patients under ABC therapy presented higher platelet reactivity than the TFV group.

When the expression of adhesion molecules in leukocytes was analyzed, it was observed that the expression of CD11b and CD18 (Mac-1) was higher in HIV-infected patients in treatment with ABC versus treatment with TFV and versus controls, both in the neutrophil and monocyte populations. The only exception was CD11b on monocytes, in which an increase was observed, but significance was not reached between the two groups of treatments. On the other hand, no differences were observed in the expression of the rest of the adhesion molecules analyzed (CD11a, CD11c, CD62L and CD49d) in the neutrophil and monocyte populations between the group of patients treated with ABC and that treated with TFV.

Analysis of platelet activation (assessed as P-selectin expression) and expression of the adhesion molecule GPIIb/IIIa (involved in platelet-platelet interactions) showed that, regardless of the treatment (ABC or TFV), HIV-infected patients had higher levels of P-selectin compared to control donors, with no differences detected between treatments. On the other hand, GPIIb/IIIa expression was higher in the ABC-treated patients compared to patients treated with TFV and control donors.

In summary, patients receiving ABC as part of their antiretroviral therapy exhibit a pro-inflammatory and pro-thrombotic status, since their platelets and PMNs are activated, which facilitates cell interactions with the vascular environment.

IN VITRO STUDY OF THE EFFECT OF ABACAVIR IN HIV-INFECTED PATIENTS

A total of 28 patients were included in this cohort. All of them were HIV-infected patients who had received antiretroviral therapy that did not include ABC for at least 6 months (in this case, all patients were receiving TAF as part of their treatment, although in different presentations). The mean age of these patients was 47.04 years, most were men (92.86%), and all had a CD4⁺ cell count that met the recommended limits for HIV-infected patients (with a mean of 774.2 cells/mm³). None of the patients in the cohort were receiving treatment with antihypertensive medication, statins, or for diabetes.

The addition of ABC (5 µg/mL) *in vitro* for 4h to PMNs or PBMCs isolated from HIV-infected patients induced a decrease in PMN and PBMC rolling velocity and an increase in the number of rolling and adherent PMNs and PBMCs to a non-treated endothelium.

Furthermore, treatment of platelets isolated from HIV-infected patients with ABC (5 µg/mL), added *in vitro* for 1h, did not affect platelet adhesion to a non-treated endothelium. Therefore, different treatments with ABC were performed, thus platelets and endothelial cells only or both cell types were treated *in vitro* with the drug. In this case, an increase in platelet adhesion to the endothelium was observed only when endothelial cells were treated with ABC (either HUVEC alone or both HUVEC and platelets), but not when only platelets were treated with the drug. This demonstrates that ABC *in vitro* had no direct effect on platelets.

Thereafter, treatment of whole blood samples from HIV-infected patients with ABC (5 µg/mL), added *in vitro* for 1h, induced an increase in the number of platelets attached to neutrophils. Moreover, treatment of whole blood samples from HIV-infected patients with ABC (5 µg/mL), added *in vitro* for 1h, did not produce changes in the aggregation induced by ADP, collagen and arachidonic acid with regard to the blood

of the same patients incubated with the vehicle (control). On the other hand, treatment of whole blood samples from HIV-infected patients with ABC (5 µg/mL), added *in vitro* for 4h, led to an increase in the expression of CD11b, CD11c, and CD18 on neutrophils and of CD11b and CD11c on monocytes, respectively. Nevertheless, it did not produce changes in the expression of the rest of the adhesion molecules evaluated. Regarding platelet activation and the expression of the adhesion molecules P-selectin (CD62P) and GPIIb/IIIa, when added *in vitro* ABC (5 µg/mL) had neither an effect on the expression of P-selectin nor on that of GPIIb/IIIa in platelets.

Therefore, we deduced that ABC (added *in vitro*) increases the pro-inflammatory profile of HIV-infected patients in a process in which neutrophils are clearly involved, which suggests that the drug represents an additional risk factor to that of infection with the virus per se.

STUDY OF THE MECHANISM BY WHICH ABC INDUCES PRO-THROMBOTIC EFFECTS

Given that ABC does not act directly on platelets, and that the role of neutrophils and their secretome in platelet function and thrombosis has been the focus of much research in recent years, we decided to study the action of the secretome released by ABC-treated neutrophils on platelet activation and on the induction of platelet-neutrophil interactions. With this purpose in mind, PMNs were treated with ABC (1h) and the subsequently released secretome (SN_{ABC}) was placed in contact with non-treated platelets and neutrophils to analyze platelet-neutrophil interactions. It was observed that, despite the fact that in some cases both PMNs and/or platelets were treated with the drug, an increase in platelet-neutrophil interactions was only observed when cells were treated with a secretome derived from ABC-treated neutrophils. This fact suggested the presence of an active compound in this secretome.

To explore the involvement of P2X₇ receptor in the release of the secretome, this receptor was blocked with its specific antagonist (A804598) prior to exposing the neutrophils to ABC. In this case, the secretome that was released lacked the ability to increase the expression of P-selectin in platelets and to induce the platelet-neutrophil interactions that were observed with the SN_{ABC}, whereas pre-treatment of neutrophils with the antagonist of P2X_{2/3} receptors (A317491) did not induce changes in the effects induced by SN_{ABC}. Therefore, we concluded that ABC induces the release of an active secretome through the P2X₇ receptor.

To investigate the active compound of the secretome responsible for the above described effects, a proteomics study was carried out with the secretome released by neutrophils treated with ABC in the presence or absence of a P2X₇ receptor antagonist. The results showed that ABC induced significant changes in 7 of the proteins detected in the secretome. These proteins were V-ATPase subunit E1 (VATE1), Ras-related protein 11A (Rab-11A), endothelial differentiation-related factor 1 (EDF1), actin β 2, cytoskeletal keratin type II, the non-ATPase regulatory subunit 9 of the 26S proteasome (PSMD9), and LOX-1. However, of these 7 proteins, only the levels of LOX-1 were significantly reduced by blockade of the P2X₇ receptor antagonist. Therefore, we next analyzed the expression of this receptor in neutrophils and platelets. Treatment with ABC (5-10 μ g/mL) caused an increase in the expression of LOX-1 in neutrophils that was mediated by the P2X₇ receptor, as its antagonist (A804598) reverted the increase produced by ABC. However, ABC did not induce changes in platelet LOX-1 expression. On the other hand, the functional involvement of this receptor in the effects induced by SN_{ABC} on platelet activation and on platelet-neutrophil interactions was studied. The results showed that the blocking antibody against LOX-1 reversed the effects of SN_{ABC} on both the expression of P-selectin in platelets and on platelet-neutrophil interactions, an effect that was not observed with the isotype control, thus confirming the involvement of LOX-1 in platelet activation and platelet-neutrophil interactions induced by SN_{ABC}. These findings suggest that the

active component responsible for ABC effects and present into the secretoma released by the neutrophils is the soluble protein sLOX-1.

Therefore, we evaluated the proteins responsible for the cleavage of the LOX-1 receptor in the production of its soluble form (sLOX-1): ADAM10 and ADAM17. First, the effects of ABC on the expression of both proteins were analyzed, and it was observed that ABC induced an increase in the expression of ADAM10 and ADAM17 in neutrophils (with concentrations of ABC 5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proving to be effective). Second, the involvement of both proteins in the observed effects of SN_{ABC} was determined using ADAM10 and ADAM17 inhibitors (GI254023X and TAPI-1, respectively). Treatment with these two inhibitors separately did not reverse the effects of SN_{ABC} ; however, combined treatment with both inhibitors did reverse the effects of SN_{ABC} on both P-selectin expression in platelets and on platelet-neutrophil interactions. These results indicate that ADAM10 and ADAM17 cleavage of the LOX-1 receptor is essential in promoting platelet activation and inducing platelet-neutrophil interactions by SN_{ABC} .

Finally, as part of the quest to determine the SN_{ABC} mechanism responsible for platelet activation and induction of platelet-neutrophil interactions, the signaling pathway involved in platelets was analyzed. In this sense, among the different ligands of the LOX-1 receptor, there is the HSP70 protein, which is a protein involved in platelet activation and degranulation. Therefore, this protein could enable the release of platelet granules, which could lead to the release of ADP/ATP, and consequently the purinergic receptors of platelets (P2X_1 , P2Y_1 , P2Y_{12}) could also be involved in this mechanism. To address this possibility, an HSP70 inhibitor (VER-155008), a granule release inhibitor (glyoxylate), and the purinergic receptor antagonists P2X_1 (NF449), P2Y_1 (MRS2500), and P2Y_{12} (AR-C 66096) were employed. The results showed that these inhibitors reversed the effects of SN_{ABC} on both P-selectin expression in platelets and platelet-neutrophil interactions. Thus, we can affirm that HSP70, platelet granule

release, and platelet purinergic receptors P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ are involved in SN_{ABC}-induced platelet activation and platelet-neutrophil interactions.

Given our observation that the involvement of the P2X₇ receptor in the effects induced by SN_{ABC}, the next step was to analyze the expression of these receptors in the different cell types involved, since ABC acts through the P2X₇ receptors in leukocytes, but does not exert effects directly on the platelets. Thus, it was observed that neutrophils displayed a higher basal expression than platelets. It has been shown that the activation of P2X₇ leads to the mobilization of Ca²⁺, the production of ROS, and, if the activation of the receptor is maintained in time, the formation and opening of pores in the cell membrane that allow the passage of high molecular weight molecules. For this reason, and since ABC induces its effects through the P2X₇ receptor, the next steps we took were to analyze whether ABC produced calcium mobilization, ROS production, and pore formation in neutrophils by YO-PRO-1 internalization. The results showed that ABC induced a significant calcium mobilization in a concentration-dependent manner (5-10 µg/ml), and P2X₇ receptor antagonist (A804598) pretreatment had a tendency to reduce these effects of ABC on calcium mobilization, although the reversion was not significant. Subsequently, the effects of ABC on ROS production in neutrophils were determined. ABC induced ROS production in a concentration-dependent manner (5 -10 µg/mL) that was not observed when blood was pretreated, prior to ABC, with the P2X₇ receptor antagonist (A804598). In this case, the production of ROS induced by ABC occurred through the P2X₇ receptor. Finally, our results showed that ABC induced a significant increase in the internalization of YO-PRO-1 in a concentration-dependent manner (5 -10 µg/mL), which was again reversed by pretreatment of the neutrophils with the P2X₇ receptor antagonist (A804598). All these results together suggest that ABC is capable of activating P2X₇ receptors in neutrophils. The release of IL-1β has been attributed to P2X₇ receptor activation, and so we investigated the involvement of this mechanism. The process of P2X₇ receptor activation to the release of IL-1β requires several pathways - NF-κB translocation to the nucleus, transcription and translation steps, and

finally NLRP3 inflammasome involvement -, and so neutrophils were incubated for 4 hours with ABC. The results showed that ABC induced a significant release of IL-1 β in a concentration-dependent manner (2.5-10 μ g/mL).

On the other hand, the potential effects of ABC in the induction of thrombus formation and the involvement of the P2X₇ receptor on these effects have been described in a murine model of thrombosis. Therefore, we explored the involvement of the LOX-1 receptor in the formation of thrombi induced by ABC by using a blocking antibody against this receptor. It was observed that treatment of mice with the LOX-1 blocking antibody, but not with its isotype control, reversed the observed effects of ABC on occlusion time, thus avoiding the induction of thrombus formation. Moreover, the LOX-1 blocking antibody and the isotype control did not alter the effects induced by rofecoxib, used as a positive control for thrombus formation, demonstrating that, in the case of rofecoxib, thrombus formation is independent of LOX-1 receptor.

Finally, we analyzed the importance of different proteins and receptors in platelets, whose involvement had been evaluated previously in *in vitro* assays. For this purpose, we used the HSP70 protein blocker (VER-155008), a degranulation inhibitor (clodronate), and the antagonists of the P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ receptors (NF449, MRS2500, and clopidogrel, respectively). Treatment of mice with these inhibitors reversed ABC-induced thrombus formation. Therefore, we could deduce that the HSP70 protein, the granule release and the P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂ receptors are involved in the mechanism by which ABC induces thrombus formation.

STUDY OF THE MECHANISM BY WHICH ATP INDUCES PRO-THROMBOTIC EFFECTS

Given the effects observed for ABC, and that they were due to an action of the drug through the P2X₇ receptor, the effects of the endogenous agonist of this receptor

(ATP) were evaluated to verify if the mechanisms activated by ABC could also be produced at a physiological or pathophysiological level.

It was observed that treatment of isolated neutrophils with ATP (5 - 10 μ M) provoked, as occurred with ABC, the release of an active secretome (SN_{ATP}) that, when in contact with untreated platelets and neutrophils, increased platelet-neutrophil interactions, while their respective controls did not induce changes in these interactions. ATP is the endogenous agonist of several P2X purinergic receptors, so the next step was to evaluate the P2X receptors involved in ATP-induced neutrophil secretome release. To carry out this objective, the antagonists of the P2X₁ (NF449), P2X_{2/3} (A317491), P2X₄ (5-BDBD) and P2X₇ (A804598) receptors were added prior to treatment of the neutrophils with ATP 5 μ M. Subsequently, the SN_{ATP} obtained was placed in contact with untreated platelets and neutrophils to determine the effect of the secretome on platelet-neutrophil interactions. It was observed that the antagonists NF449, 5-BDBD and A804598 reversed the effects of SN_{ATP} to some extent, although neither did so completely. Therefore, we can confirm that the P2X₁, P2X₄ and P2X₇ receptors are involved in the secretome release induced by ATP.

Analysis of the proteins detected in the SN_{ATP} revealed significant changes in the levels of the soluble LOX-1 receptor, similarly to the results obtained with ABC, and additionally in the levels of another 10 proteins. These proteins were haptoglobin, thrombospondin-1, complement C4B and C3, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, clusterin, twinphyllin-2, S100 A7 protein, α -2-macroglobulin, stress-induced phosphoprotein 1, which were analyzed in the database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID) in order to assess their biological and molecular functions and the cellular components to which they belong. In this sense, the gene ontology (GO) terms referring to the cellular components that were detected were blood microparticles, exosome and extracellular space, lumen of azurophil granules and platelet α -granules, cell surface and macromolecular complexes. Regarding the GO terms referring to biological processes, it was

observed that the proteins altered by ATP were related to inflammatory response and innate immunity, complement activation, degranulation of neutrophils and platelets, cellular response to growth factors, upregulation of apoptotic cell clearance, upregulation of receptor-mediated endocytosis, and downregulation of endopeptidase activity.

Despite the fact that ATP induced changes in more proteins, we focused on LOX-1 on the basis of the interesting previous results obtained with ABC. Therefore, the expression of this receptor in neutrophils and platelets was analyzed. Treatment with ATP (5 -10 μ M) produced an increase in the expression of LOX-1 in neutrophils. However, ATP did not induce changes in the expression of LOX-1 in platelets. By analyzing the functional involvement of this receptor in the effects induced by SN_{ATP} on platelet-neutrophil interactions, we observed that blocking antibody against LOX-1, but not its control isotype, reversed the effects of SN_{ATP} in the induction of platelet-neutrophil interactions, thus confirming the involvement of LOX-1.

Subsequently, we evaluated the proteins responsible for the cleavage of the LOX-1 receptor in the production of its soluble form (sLOX-1), ADAM10 and ADAM17. Firstly, the effects of ATP on the expression of both proteins were analyzed, and it was observed that ATP (5 -10 μ M) induced an increase in the expression of ADAM10 and ADAM17 in neutrophils in a concentration-dependent manner. Secondly, the functional involvement of both proteins in platelet-neutrophil interactions provoked by SN_{ATP} was determined using the ADAM10 inhibitor GI254023X and the ADAM17 inhibitor TAPI-1. Each inhibitor, separately, decreased the effect of SN_{ATP} , but not significantly. However, combined treatment with both inhibitors completely reversed the effects of SN_{ATP} on platelet-neutrophil interactions. These results indicate that cleavage of the LOX-1 receptor by ADAM10 and ADAM17 is essential to promote SN_{ATP} -induced platelet-neutrophil interactions, in a similar way to that done by ABC.

Following the study of ATP, we explored the signaling pathway involved in platelets activation by SN_{ATP} . For this purpose, the involvement of HSP70, platelet granule release, and platelet purinergic receptors ($P2X_1$, $P2Y_1$, $P2Y_{12}$) was evaluated by using the respective inhibitors; VER-155008 of HSP70, glyoxylate of granules release, and NF449, MRS2500 and AR-C 66096 of $P2X_1$, $P2Y_1$ and $P2Y_{12}$ receptors. The results showed that the use of these inhibitors reversed the observed effects of SN_{ATP} on platelet-neutrophil interactions. Thus, we could affirm that the mechanism of platelet activation by SN_{ATP} was similar to that of SN_{ABC} .

As previously mentioned, the activation of purinergic receptors leads to the mobilization of Ca^{2+} , the production of ROS and, in the case of the $P2X_7$ receptor, if the activation of the receptor occurs for a long time, the formation and opening of pores in the cell membranes allows the passage of molecules of a high molecular weight. Therefore, the involvement of these pathways was evaluated in neutrophils treated with ATP and the results confirmed that ATP (1-10 μM) provoked a significantly concentration-dependent increase in Ca^{2+} mobilization, ROS production and YO-PRO-1 internalization. Subsequently, the involvement of the $P2X_7$ receptor in the opening of the pore induced by ATP was determined by using its specific receptor antagonist (A804598), which prevented the increase in the internalization of YO-PRO-1 caused by ATP. The final step of $P2X_7$ receptor activation was verified, since ATP (1 - 10 μM) reproduced the release of IL-1 β in a concentration-dependent manner, as occurred with ABC.

On the other hand, and with regard to the effects of ATP on the murine model of thrombosis, our results showed that ATP is capable of inducing thrombus formation in a dose-dependent manner, and starts to induce thrombosis at a concentration of 0.5 μM . For this reason, the purinergic receptors involved in ATP-induced thrombus formation were analyzed. To do this, we selected a concentration of 0.5 μM ATP and used different antagonists of these receptors: $P2X_7$ (A804598), $P2X_{2/3}$ (A317491), $P2X_4$ (5-BDBD), $P2X_1$ (NF449), $P2Y_1$ (MRS2500), and $P2Y_{12}$ (clopidogrel). Treatment with the

P2X₇ receptor antagonist reversed the effect induced by ATP, although the reversion was not complete and thrombus formation was still induced; however, the time required for vessel occlusion was longer. The rest of the antagonists were able to reverse the effects of ATP, since, as mentioned in the introduction, ATP can act as an agonist for all of them. Therefore, it became clear that ATP induces thrombus formation through the P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2Y₁, P2Y₁₂ receptors, and to a lesser extent the P2X₇ receptor (the receptor that requires the highest concentration of ATP to become activated).

Later, the pathway that had previously been demonstrated *in vitro* was studied *in vivo*, by evaluating the involvement of the LOX-1 receptor, the HSP70 protein, and the release of granules. For this aim, we used the LOX-1 blocking antibody, the HSP70 protein inhibitor (VER-155008), and a degranulation inhibitor (clodronate). Treatment of mice with these inhibitors reversed ATP-induced thrombus formation, which was not the case when mice were treated with the LOX-1 blocking antibody isotype control. Thus, it was evident that the LOX-1 receptor, the HSP70 protein, and granule release are involved in the mechanisms by which ATP induces thrombus formation.

In short, as an endogenous physiological modulator, ATP reproduces the described pro-inflammatory and pro-thrombotic effects of ABC through activation of the purinergic P2X receptors. This clearly opens the way for future clinical studies.

STUDY OF THE INVOLVEMENT OF NETs IN THE EFFECTS OF ABC AND ATP

A final approach was carried out in order to evaluate the capacity of ABC and ATP to induce the formation of NETs and their involvement in the formation of thrombi induced by these drugs. The results showed that neither ABC nor ATP were capable of inducing the release of NETs by isolated neutrophils at the concentrations described in the previous *in vitro* studies. Only elevated concentrations of ATP (10 μM)

or ABC (10 µg/mL), which were higher than the physiological and clinical concentrations, respectively, induced the release of NETs. Subsequently, the functional involvement of NETs in thrombus formation was evaluated by applying pre-treatment with DNase I in the murine model of thrombosis, in which case we observed that these structures were involved in both ABC- and ATP-induced thrombi.

DISCUSSION

Currently, antiretroviral therapy against HIV infection consists of the use of a combination of several drugs that act on diverse targets of the biological cycle of the virus, giving rise to what is known as combined antiretroviral therapy. With the introduction of this therapy, it was possible to significantly reduce the mortality in HIV patients, though it has been associated with different adverse effects over the years. In this regard, the antiretroviral drug ABC has been related in recent years with an increased cardiovascular risk in HIV patients whose treatment includes it. In fact, this drug has been part of the preferred regimens for the treatment of HIV infection since 1998, and is currently part of one of the four preferred regimens, so its use is extensive. There was been controversy regarding the cardiotoxicity of this drug since the first alert which arose in this regard, triggered the publication of both studies that corroborated this association as well as others that did not observe an increased cardiovascular risk in patients with this treatment. Nevertheless, over the years, with the arrival of new clinical evidence, it has been confirmed that ABC induces an increase in the risk of cardiovascular disease, specifically myocardial infarction, and that this increase is associated with the presence of comorbidities or other additional risk factors. This has led to a change in the current clinical guidelines by which it is recommended not to use this drug in patients with cardiovascular risk.

Myocardial infarction is a cardiovascular condition, frequently due to the occlusion of an epicardial coronary artery. In this sense, our previous *in vitro* studies in samples

from healthy donors without HIV infection have shown that ABC produces vascular inflammation, manifested in an increase in leukocyte-endothelium interactions. Beyond this observation, this drug is capable of triggering processes that lead to thrombus formation, demonstrated *in vitro* (increased platelet adhesion to endothelial cells and neutrophils) and *in vivo* (vessel occlusion in a murine model of thrombosis). However, to date there are no controlled studies addressing the complex situation of patients who have not only been exposed to the HIV, but have also been treated with a combination of drugs in addition to ABC. For this reason, one of the main objectives of this Doctoral Thesis was to evaluate the possible contribution of ABC, as part of a combined antiretroviral therapy, to the inflammatory and thrombogenic status of HIV patients, by comparing these patients with those receiving TFV - which is part of the rest of the preferred regimens to treat HIV - instead of ABC. However, the antiretroviral therapy of these patients includes other drugs, such as 3TC, FTC, DTG, EVG, DRV or RPV, all of which may exert an influence. Blood from healthy donors without infection and without treatment was used as a control. No differences were observed in the biochemical parameters analyzed in the two groups of patients, including cholesterol levels and prothrombin time and activity; in this sense, initial routine lab test parameters were homogenous in both cohorts, and, interestingly, the potential side effects of ABC were unnoticed in these patients. However, the results of the same cohort showed that blood from patients treated with ABC presented an increase in inflammatory and thrombotic processes. Thus, inflammatory processes were analyzed, including leukocyte-endothelium interactions and the expression of adhesion molecules in leukocytes. Consequently, samples from patients in the ABC-treated cohort displayed higher levels of interactions of leukocytes (both PMNs and PBMCs) with the endothelium compared with TFV-treated patients and controls. In addition, enhanced expression of the leukocyte adhesion molecule Mac-1 was also observed in patients treated with ABC, which, together with previous evidence - *in vitro* studies with samples from donors without HIV infection - suggest that these interactions are caused by the interaction of Mac-1 in leukocytes with ICAM-1 in the endothelium. Interestingly, Mac-1 has been proposed as a link between cell adhesion

and thrombosis, not only because of its adhesion to the endothelium, but also because its adhesion to platelet molecules, promote the formation of platelet-leukocyte aggregates, a fundamental step in the initiation of the thrombotic process. In this sense, our data support a role for ABC in the process of thrombus formation, since interactions of platelets with either endothelial cells or leukocytes were higher in samples from ABC-treated patients than in those from TFV-treated patients or control donors. All of this was accompanied by the overexpression of the platelet adhesion/aggregation molecule GPIIb/IIIa in patients treated with ABC, but not in those treated with TFV or in control donors. Indeed, previous studies demonstrated that ABC-induced platelet-endothelium interactions *in vitro* were mediated by GPIIb/IIIa on platelets and ICAM-1 on endothelial cells, among other adhesion molecules. Altogether, overexpression of both GPIIb/IIIa in platelets and Mac-1 in leukocytes reinforces their implication in the increase in platelet-leukocyte interactions observed in patients receiving ABC treatment. However, regarding expression of the platelet activation marker P-selectin, it was observed that patients with HIV infection, regardless of whether their treatment contained ABC or TFV, presented a higher expression and therefore greater platelet activation than donors without HIV infection. In this sense, different studies have confirmed that patients with HIV infection present a higher number of platelets adhering to the endothelium and rolling leukocytes than donors without HIV infection. This highlights the importance of taking into account the presence of the infection as an additional cardiovascular risk when studying the cardiotoxic effects of ABC.

In addition to the overexpression of the platelet aggregation molecule GPIIb/IIIa, functional aggregation studies revealed significant platelet hyper-reactivity to agonists (ADP, collagen, and arachidonic acid) in samples from ABC-treated patients compared with TFV-treated ones; nevertheless, despite the upward trend, results in the ABC group were not significantly different from those in control donors. These results are consistent with those of three other studies carried out in HIV patients, in which it was observed that patients treated with ABC compared to those treated with

TDF had greater platelet aggregation in response to ADP, collagen, epinephrine, U46619 and TRAP. Although we observed more aggregation in the ABC group compared to the TFV group, the absence of statistically significant differences compared to control group rule out the hypothesis of a platelet hyper-reactivity induced by ABC and suggest a platelet hypo-reactivity produced by TFV, which was significant only in the case of arachidonic acid. This evidence is in line with other studies supporting a cardioprotective effect of TFV by demonstrating that: patients treated with TDF had less endothelial dysfunction due to a lowering of the expression of VCAM-1; TDF and TAF *in vitro* induced an increase in the expression of ectonucleotidase enzymes (CD39 and CD73) that promote the hydrolysis of ATP and ADP to adenosine, and a decrease in the expression of endothelial ICAM-1 and tissue factor; TDF decreased the release of IL-8 and the macrophage inflammatory protein 1 α induced by stimulation with LPS and TNF- α in an *in vitro* study performed in monocytes.

In our cohort of HIV patients treated with ABC or TFV and donors without HIV infection, we have been able to demonstrate that the presence of ABC induces a state of greater activation of the inflammatory processes - leukocyte-endothelium interactions and an increase in the expression of Mac-1 - and thrombotic processes - platelet-endothelium and platelet-leukocyte interactions, and an increase in the expression of GPIIb/IIIa -. However, the fact that effective antiretroviral therapy currently consists of a combination of different drugs besides ABC or TFV means that we cannot associate the observed effects directly with ABC, since the antiretroviral regimen of our patients included other drugs (3TC, FTC, DTG, EVG, DRV or RPV). Therefore, controlled validation studies were undertaken with samples from HIV patients who were not receiving ABC as part of their antiretroviral therapy, and which were exposed exclusively to a precise concentration of ABC. In this way, the infection variable was made present in the blood samples and the direct effect of the drug could be assessed.

To carry out this part of the study, we employed a cohort of patients with HIV infection who were on antiretroviral treatment that did not include ABC. Blood samples were treated *in vitro* with a concentration of ABC 5 µg/mL, which simulates the plasma levels present in patients receiving treatment with this drug.

With this cohort, it was observed that ABC induced an increase in the interactions of leukocytes (both PMNs and PBMCs) with endothelial cells, inducing a decrease in the speed of rolling and an increase in both rolling flux and the number of leukocytes adhering to the endothelial cell monolayer. These interactions may have occurred thanks to an increase induced by ABC in the expression of the adhesion molecules Mac-1 and gp150,95 in neutrophils and monocytes, as they can interact with ICAM-1 on the surface of endothelial cells. In this sense, a previous study demonstrated that ABC *in vitro* - but in this case in samples from control donors without HIV infection - induced an increase in the expression of Mac-1, and that this adhesion molecule was functionally involved in the ABC-induced leukocyte-endothelium interactions by interacting with ICAM-1 on endothelial cells.

The pro-thrombotic effects of ABC were also tested *in vitro* in samples from patients with HIV infection. In this context, the results showed that, when added *in vitro*, ABC induced an increase in the formation of platelet-leukocyte aggregates, both with neutrophils and monocytes. On the other hand, when the effect of ABC on platelet-endothelium interactions was analyzed by treating platelets from HIV infected patients with the drug, no changes were observed with respect to controls. This data may seem contradictory with respect to the results obtained in the previous cohort; however, they are not surprising given our previous studies showing that ABC does not act directly on platelets, but rather acts by activating other vascular cells, such as endothelial cells or leukocytes, and that their stimulation leads to platelet activation. To corroborate this evidence, ABC was added, not only to platelets from HIV patients (without ABC in their regimen), but also to the endothelial cells from control donors. In this case, the increase in these interactions were observed only when endothelial

cells were treated with ABC, regardless of the platelet treatment. This demonstrates once again that ABC does not exert a direct effect on platelets. In this line, it was shown that ABC neither induced an increase in the expression of P-selectin nor in that of GPIIb/IIIa in platelets isolated from HIV patients from the aforementioned cohort. Similarly, ABC *in vitro* did not induce an increase in the platelet aggregation stimulated by ADP, collagen, or arachidonic acid. This is in accordance with previous studies in which ABC *in vitro* did not induce changes in platelet aggregation in samples from healthy donors; in said studies the effect of ABC on platelet aggregation was only seen in samples from HIV patients in treatment with ABC, demonstrating the importance of treatment *in vivo* for observing the global effects of ABC on inflammatory and thrombotic events.

In these two cohorts, it can be concluded that ABC promotes an increase in inflammatory signals by inducing leukocyte-endothelium interactions, which represent the first phases of the inflammatory process. ABC has also been shown to promote different phases of thrombus formation, such as platelet interactions with other vascular cells (endothelial cells and leukocytes). In line with this evidence, as mentioned before in the context of a previous publication, it was shown that ABC was capable of inducing thrombus formation in a murine model of thrombosis through the P2X₇ receptor. However, the mechanisms by which ABC is capable of inducing the platelet-leukocyte interactions that can eventually lead to the formation of these thrombi are yet to be determined. This was first addressed in a previous study in which ABC *in vitro* was shown to induce platelet adhesion to neutrophils, acting on neutrophils and not directly on platelets, as observed in platelet-endothelium interactions. Furthermore, this interaction occurred through the P2X₇ receptor and was mediated by the adhesion molecules PSGL-1 in leukocytes and P-selectin in platelets. It should be noted that PSGL-1 is constitutively expressed in neutrophils, while the expression of P-selectin can be induced on the platelet surface; however, when treating isolated platelets *in vitro* with ABC, the expression of this adhesion molecule was not induced. This fact is evidence of the importance of neutrophils in

inducing the expression of P-selectin in platelets and, therefore, their activation, which would lead to their adhesion to neutrophils. The activation of platelets is required for them to adhere to neutrophils; however, ABC by itself is not capable of activating platelets, thus highlighting the relevance of the secretome released by neutrophils after their treatment with ABC. For this reason, the next part of our study consisted in exploring the capacity of the secretome released by ABC-treated neutrophils to induce platelet-neutrophil interactions and platelet activation.

Our data show that the formation of platelet-neutrophil aggregates was mainly due to the presence of a secretome released by neutrophils treated with ABC. This was concluded because when neutrophils and/or platelets were treated with the drug, but the secretome came from control neutrophils, the formation of these aggregates was not observed. This parameter only occurred in the presence of SN_{ABC} , regardless of the treatment of platelets and neutrophils. In addition, the induction of platelet activation and the formation of these aggregates was due to SN_{ABC} and was mediated by the $P2X_7$ receptor of neutrophils. The activation of this receptor by ABC was studied in depth in a previous study in which it was shown that the drug acts as an allosteric modulator of this receptor, binding to an active site different from that of its natural agonist, ATP. Thus, the binding of ABC to this active site seems to produce a conformational change that makes this receptor sensitive to lower ATP concentrations.

Next, the protein composition of the secretomes released by neutrophils was analyzed by means of a proteomics study. This analysis showed that ABC induced an increase in the levels of LOX-1, VATE1, Rab-11A, EDF1, and a decrease in the levels of β 2-actin, type II cytoskeletal keratin, and PSMD9. However, LOX-1 was the only protein released into the secretome, by neutrophils treated with ABC, which was responsible for platelet activation and platelet-neutrophil aggregates formation through $P2X_7$ receptor.

LOX-1 is part of the family of scavenger receptors (SR) implicated in the initiation and progression of atherosclerosis. Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease characterized by the accumulation of lipids in the arterial wall, manifested macroscopically as an atherosclerotic plaque. Furthermore, rupture of this plaque can lead to the thrombotic occlusion of the vessels. This accumulation of lipids is mainly due to low-density lipoprotein (LDL) deposits, which are modified by free radicals, giving rise to oxidized LDL (oxLDL). The latter can induce the immune response by acting on different cell types, increasing the expression of adhesion molecules and chemotactic factors and therefore promoting the adhesion of leukocytes and platelets.

SR receptors interact with oxLDL and promote its internalization and proteolytic degradation. LOX-1 is one of the SR capable of internalizing the oxLDL that accumulates in atherosclerotic plaques. This receptor is expressed in neutrophils, macrophages, platelets, endothelial cells, and muscle cells. It should be noted that the basal expression of LOX-1 is low; however, it can be induced by different pro-inflammatory and pro-atherogenic stimuli (ROS, IL-1, LPS, TNF- α , interferon γ , and oxLDL itself).

On the other hand, in addition to oxLDL, LOX-1 can bind to multiple ligands, such as lipoproteins (acetylated LDL, carbamylated LDL, electronegative LDL, hyperchlorinated HDL), cells (activated platelets, leukocytes, apoptotic cells, bacteria), proteins (HSP60, HSP70, C-reactive protein, fibronectin), phospholipids (phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid, cardiolipin), polyanions (heparin, dextran sulfate, polyinosinic acid) and advanced glycation end products, among others. The interaction of LOX-1 with its respective ligands can induce different biological effects. In this sense, it has been described that the binding of oxLDL to LOX-1 receptor can activate the NF- κ B pathway, the production of ROS and the activation of NLRP3. Likewise, LOX-1 causes endothelial dysfunction, participates as an adhesion molecule in endothelial cells and in leukocytes and platelets, and can

contribute to the aggregation and activation of platelet integrins (GPIIb/IIIa). In fact, the presence of LOX-1 in activated platelets suggests that this receptor could play an important role in thrombus formation.

Like many surface receptors with a single transmembrane domain, LOX-1 can undergo posttranslational proteolytic cleavage, which occurs in the region of the extracellular domain, releasing a 187-residue polypeptide known as soluble LOX-1 (sLOX-1). Inflammatory cytokines, such as IL-18, C-reactive protein and TNF- α , stimulate the release of this soluble form of the receptor, mediated by proteolytic cleavage carried out by different metalloproteases, such as disintegrins and metalloproteinases (ADAM). In this sense, ADAM10 and ADAM17 have been proposed as molecules responsible for the release of sLOX-1. The proteolytic activity of ADAMs can be both constitutive and inducible, and is dependent on intracellular Ca²⁺ levels, membrane lipid composition, and G protein-coupled receptors. Furthermore, ADAM17-mediated release of sLOX-1 is dependent on the generation of ROS by NADPH oxidase, while plasma levels of sLOX-1 may reflect an increased expression of the receptor on the cell membrane and can serve as a biomarker of cardiovascular disease. However, the functional role of sLOX-1 is still to be elucidated.

In this sense, it was observed that ABC induces expression of the LOX-1 receptor on the surface of neutrophils by the P2X₇ receptor in neutrophils. In fact, it was shown that the activation of the P2X₇ receptor induced by ABC triggers the mobilization of calcium in neutrophils, the production of ROS and the opening of the ion channel of the receptor, together with the release of IL-1 β , which would imply the activation of the transcription factor NF- κ B. The activation of NF- κ B and its migration to the nucleus have been described as inducers of the transcription of the LOX-1 gene, thus promoting an increase in the expression of LOX-1. This receptor can be cleaved by ADAM10 and ADAM17, thus releasing its soluble form in the secretome, the expression of which is also induced by ABC on the surface of neutrophils; indeed, the increased expression of these proteases may be due to the formation of ROS derived

from activation of the P2X₇ receptor. On the other hand, at a functional level, it was shown that the actions of both ADAM10 and ADAM17 - which produce the release of the soluble form of LOX-1 and of LOX-1 itself released in the secretome - are responsible for the effects of SN_{ABC} on the induction of platelet activation and the consequent formation of platelet-neutrophil aggregates.

Regarding the mechanism by which sLOX-1 acts on platelet signaling, inducing its activation and its subsequent adhesion to neutrophils, as well as thrombus formation in the murine model of thrombosis, the present findings demonstrate that the HSP70 protein, platelet degranulation and the platelet purinergic receptors P2X₁, P2Y₁ and P2Y₁₂ are involved in this mechanism. According to the bibliography, LOX-1 binds mainly to oxLDL, but can also bind to other ligands, such as different lipoproteins and phospholipids, HSP70, or even cells such as activated platelets, leukocytes, or apoptotic cells. In line with these observations, HSP family activity has been associated with granule secretion, adhesion molecule activation, P2X₁ receptor expression and function, and with platelet aggregation. Although the involvement of the P2X₁ receptor is controversial, since its mechanism of action on platelet function is not fully understood, there is enough evidence to suggest that activation of the P2X₁ receptor by ATP sensitizes the platelet P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors to ADP, thus amplifying their responses. This could explain why these three receptors are involved in SN_{ABC}-induced platelet activation and platelet-neutrophil aggregates, and in ABC-induced thrombus formation in the murine model of thrombosis.

In conclusion, all of this evidence suggests that neutrophils are target cells in the effects of ABC on thrombosis. ABC acts on the P2X₇ receptor in neutrophils, and not on platelets - which could be explained by the low basal expression of the P2X₇ receptor in platelets compared to neutrophils (as shown), thus increasing the expression of LOX-1 on the surface of neutrophils. Through cleavage of this receptor by ADAM10 and ADAM17, sLOX-1 is released into the secretome. Subsequently, sLOX-1 would bind to HSP70 on platelets, forming a complex that causes platelet

degranulation and the subsequent release of nucleotides (ADP and ATP). In this scenario, the nucleotides would interact with the platelet purinergic receptors P2X₁, P2Y₁ and P2Y₁₂, inducing expression of P-selectin on the platelet surface. Finally, P-selectin in platelets interacts with PSGL-1, which is constitutively expressed in neutrophils, thus mediating platelet-neutrophil conjugates.

The results obtained in the *in vitro* section of our study were corroborated in the murine model of thrombosis induced by FeCl₃, in which it was demonstrated that the formation of thrombi induced by ABC, in addition to being mediated by the P2X₇ receptor (as described previously), was dependent on LOX-1, HSP70, degranulation, and P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ purinergic receptors. In addition, a chronic model of treatment with ABC was carried out in order to bring this *in vivo* model closer to clinical practice, in which patients continuously receive the drug. In this case, it was shown that chronic ABC administration also induced thrombus formation mediated by P2X₇ and the LOX-1 receptor.

If we consider all these results together, it can be concluded that the effect of the sLOX-1 released by neutrophils may be the cause of the cardiotoxic effect of ABC that can trigger the formation of thrombi. However, the results show a modest effect of both ABC and SN_{ABC} on the parameters analyzed, though this effect should not be underestimated in terms of an additional risk factor that may contribute to cardiovascular events. The formation of platelet-neutrophil aggregates is one of the first phases of thrombus formation; however, alterations in this parameter can be reversed or, on the contrary, amplified by additional stimuli, leading in the latter case to the stage of irreversible platelet aggregation. Therefore, this adhesion of platelets on neutrophils might not be enough by itself to cause the formation of severe or acute thrombi, but rather promotes thrombotic events in the presence of additional stimuli or risk factors. This is also consistent with the ABC cardiotoxicity observed in different clinical trials where it was related to the existence of additional risk factors or comorbidities in patients treated with ABC; and with data obtained in the murine

thrombosis model employed in this study, which showed that ABC can induce thrombus formation in the presence of another cardiotoxic stimulus (in this case, FeCl₃), but not by itself.

On the other hand, a similar mechanism has been described in macrophages, whereby activation of the P2X₇ receptor triggers the release of thromboinflammatory microparticles with overexpressed tissue factor on their surface. In this context, ATP is the endogenous ligand of the P2X₇ receptor, so it is plausible to extrapolate this pathway to this agonist and/or to pathological conditions that can stimulate this receptor.

Therefore, the next and final step of the present study was to assess whether ATP employs a mechanism similar to ABC by which it can trigger the formation of platelet-neutrophil aggregates and lead to thrombus formation. First, the results showed that SN_{ATP} was capable of inducing the formation of un-treated platelet-neutrophil aggregates. When we evaluated the involvement of the P2X₇ receptor in said effect, it was observed that this receptor was not the only one involved, since other purinergic receptors, such as P2X₁ and P2X₄, also influenced the effect of SN_{ATP}. These results are not surprising given that ATP is the endogenous agonist of the P2X purinergic receptor family, since the P2X₇ receptor is the P2X receptor that requires the highest concentration of ATP for its activation; thus, if ATP activates P2X₇, it probably also activates other receptors in the family. Activation of these receptors by ATP leads to calcium mobilization, ROS formation, pore opening of the P2X₇ receptor ion channel, and activation of the NF-κB pathway, which triggers IL-1β release. As previously mentioned, activation of this pathway promotes LOX-1 transcription, inducing increased expression of this receptor on the surface of neutrophils. On the other hand, the production of ROS is associated with activation of the proteases responsible for the cleavage of LOX-1, ADAM10 and ADAM17. In keeping with this, our results showed that ATP induces an increase in the expression of LOX-1, ADAM10 and

ADAM17 on the surface of neutrophils, in addition to the levels of the soluble form of LOX-1 in the secretome. Subsequently, the functional involvement of these proteins in the effects of SN_{ATP} on the formation of platelet-neutrophil aggregates was analyzed, and it was shown that cleavage of LOX-1 by ADAM10 and ADAM17 and sLOX-1 itself were involved functionally in said effect. Finally, the platelet signaling pathway involved in the effects of SN_{ATP} was evaluated, demonstrating, once again, that HSP70, degranulation, and platelet P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ purinergic receptors participate in this mechanism. These results were corroborated with the murine model of thrombosis induced by FeCl₃, which demonstrated that ATP was capable of inducing thrombus formation, a process in which purinergic receptors P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2X₇, P2Y₁ and P2Y₁₂, LOX-1, HSP70 and degranulation were involved. In addition, a model of chronic treatment with ATP was carried out in order to bring this *in vivo* model closer to clinical practice by simulating the high and prolonged concentrations of ATP found in the body due to pathological conditions of chronic inflammation. With this model it was observed that chronic treatment with ATP induced thrombus formation and that the P2X₇ receptor and LOX-1 were involved in the mechanism leading to said effect. Due to the fact that ATP is a key endogenous mediator in the signaling of many physiological and/or pathological processes and that has reproduced the mechanism of action by which ABC causes platelet sensitization, a new framework of knowledge is opened and will be the objective of future studies.

A final approach was carried out in order to evaluate the capacity of ABC and ATP to induce the formation of NETs, as well as their involvement in the formation of thrombi induced by both. The results showed that concentrations of ABC or ATP used in the other *in vitro* studies and which caused the formation of platelet-neutrophil aggregates were not capable of inducing the release of NETs *in vitro*. Only high concentrations of either - and supraclinical concentrations in the case of ABC - induced the release of NETs. Subsequently, the functional involvement of NETs in thrombus formation was evaluated in the murine model of thrombosis, in which it was

observed that these structures were involved in both ABC and ATP-induced thrombi. These results highlight the importance of NETs in the pathological conditions of thrombosis. However, the mechanisms involved in these effects are not altogether clear and should be further addressed, as new knowledge could lead to the discovery of new and more effective therapeutic targets for this type of pathology. In addition, it would be interesting to analyze the role of sLOX-1, the P2X₇ receptor, and NETs in the induction of platelet aggregates and thrombotic events in samples from HIV-infected patients receiving ABC as part of their treatment and in patients with chronic inflammation to extrapolate these results to a clinical context.

CONCLUSIONS

1. HIV infected patients under ABC treatment present a more pronounced inflammatory and thrombogenic state than patients treated with TFV or donors without HIV infection. In particular, patients treated with ABC present an increase in leukocyte-endothelium, platelet-endothelium and platelet-leukocyte interactions, and in the expression of the adhesion molecule Mac-1 in leukocytes and GPIIb/IIIa in platelets. In addition, an increase in platelet aggregation is observed in these patients in comparison with those on TFV.

2. When added *in vitro* to the blood of HIV infected patients, ABC induces the activation of inflammatory and thrombogenic responses mediated specifically by leukocytes or endothelium, but not by platelets. ABC produces an increase in leukocyte-endothelium, platelet-endothelium and platelet-leukocyte interactions, as well as an increase in the expression of the adhesion molecules Mac-1 and gp150,95 in leukocytes. However, the selective treatment of platelets with ABC does not modify the expression of adhesion molecules involved in platelet activation and aggregation (P-selectin and GPIIb/IIIa, respectively) and neither does it affect platelet aggregation.

3. The mechanism by which ABC induces prothrombotic effects involves the release of an active secretome (SN_{ABC}) by neutrophils that is capable of producing platelet activation and increasing platelet adhesion to neutrophils.

4. The release of SN_{ABC} is mediated by the neutrophil P2X₇ purinergic receptor, whose activation involves the mobilization of intracellular calcium, the production of reactive oxygen species, and the formation of pores in the neutrophil membrane.

5. Treatment of neutrophils with ABC produces modifications in the protein composition of the secretome released by them. Thus, it induces an increase in the levels of EDF1, RAB-11A, VATE-1 and LOX-1 proteins, and a decrease in the levels of β 2 actin, type II keratin and PSMD9. LOX-1 is the only protein whose expression is dependent on the activation of the P2X₇ receptor.

6. The release of LOX-1 in the secretome brought on by the action of ADAM10 and ADAM17 is responsible for the effects of SN_{ABC} on platelets. Furthermore, ABC induces an increase in the expression of these receptors (LOX-1, ADAM10 and ADAM17) on the surface of neutrophils.

7. HSP70 protein, granule release, and purinergic receptors P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ on platelets are involved in the platelet activation and platelet adhesion to neutrophils induced by SN_{ABC}.

8. LOX-1, HSP70, and the purinergic receptors P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂, in addition to the previously demonstrated P2X₇, are involved in ABC-induced thrombus formation in the FeCl₃-induced murine model of thrombosis.

9. ATP, the endogenous agonist of the purinergic receptors involved in the observed effects of ABC, reproduces the effects induced by SN_{ABC}, as well as its mechanism of action. Thus, SN_{ATP} induces platelet-neutrophil interactions through the release of

LOX-1 from the surface of the neutrophils to the secretome (through the action of ADAM10 and ADAM17); and through the HSP70 protein, granule release, and the P2X₁, P2Y₁, and P2Y₁₂ purinergic receptors on platelets.

10. In the murine model of thrombosis induced by FeCl₃, ATP induces thrombus formation through the P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2X₇, P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors, LOX-1, HSP70 protein and granule release.

11. High concentrations of ABC and ATP induce the release of NETs, which are involved in the formation of thrombi induced by ABC or ATP in the murine model of thrombosis induced by FeCl₃.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la migración leucocitaria y moléculas de adhesión implicadas	16
Figura 2. Adhesión de las plaquetas en las lesiones tisulares	18
Figura 3. Cascada de coagulación	19
Figura 4. Rutas de activación plaquetaria	21
Figura 5. Fases de la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio	24
Figura 6. Moléculas de adhesión implicadas en la adhesión de plaquetas sobre leucocitos	25
Figura 7. Tipos, componentes, orden de síntesis y orden de desgranulación de los gránulos de los neutrófilos	27
Figura 8. Mecanismos por los que el secretoma de neutrófilos puede inducir la formación de trombos	28
Figura 9. Mecanismos responsables de la liberación de las NETs	30
Figura 10. Receptores responsables de la señalización purinérgica	33
Figura 11. Mecanismos post-activación del receptor P2X ₇	35
Figura 12. Mecanismos post-activación del receptor LOX-1	38
Figura 13. Línea temporal de la historia de la infección por VIH	40
Figura 14. Composición del virón del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	41
Figura 15. Ciclo infeccioso del VIH	43
Figura 16. Curso clínico de la infección por VIH	45
Figura 17. Evolución epidemiológica del VIH	47
Figura 18. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de entrada	50
Figura 19. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (análogos de bases pirimidínicas)	51

Figura 20. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido/-tido (análogos de bases púricas)	52
Figura 21. Estructuras moleculares de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido	53
Figura 22. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la integrasa	54
Figura 23. Estructuras químicas de los potenciadores farmacológicos	55
Figura 24. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la proteasa	56
Figura 25. Metabolismo de tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF)	59
Figura 26. Metabolismo de abacavir (ABC)	61
Figura 27. Efectos descritos de Abacavir (ABC) sobre las células vasculares	69
Figura 28. Fases del aislamiento de leucocitos (PMN y PBMC) a partir de sangre entera	81
Figura 29. Extracción de plasma rico en plaquetas (PRP)	83
Figura 30. Cordón umbilical humano	84
Figura 31. Equipo para evaluar la adhesión en la cámara de flujo paralelo	86
Figura 32. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones leucocito-endotelio en muestras de pacientes infectados por VIH	88
Figura 33. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones plaqueta-endotelio en muestras de pacientes infectados por VIH	90
Figura 34. Histogramas de las diferentes poblaciones de células identificadas mediante el citómetro de flujo	91
Figura 35. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones plaqueta-leucocito en muestras de pacientes infectados por VIH	92
Figura 36. Protocolo experimental para el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias (en neutrófilos y monocitos) en muestras de pacientes infectados por VIH	93

Figura 37. Protocolo experimental para el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión plaquetarias en muestras de pacientes infectados por VIH	94
Figura 38. Agregometría de impedancia	96
Figura 39. Protocolo experimental para el estudio de la agregación plaquetaria en muestras de pacientes infectados por VIH	97
Figura 40. Obtención de los secretomas	98
Figura 41. Protocolo experimental para el estudio del mecanismo por el que el secretoma de neutrófilos tratados por abacavir (ABC) induce las interacciones plaqueta-neutrófilo	101
Figura 42. Protocolo experimental para la evaluación de los mecanismos por los que el secretoma de neutrófilos tratados con abacavir (ABC) induce la activación	103
Figura 43. Equipo de microscopia intravital	112
Figura 44. Curva dosis-respuesta de FeCl ₃	113
Figura 45. Protocolo experimental del tratamiento agudo en el modelo murino de trombosis	114
Figura 46. Interacciones leucocito-endotelio en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV)	128
Figura 47. Adhesión de las plaquetas al endotelio en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV)	129
Figura 48. Interacciones plaqueta-leucocito en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV)	130
Figura 49. Agregación plaquetaria estimulada por diferentes agonistas plaquetarios en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV)	131
Figura 50. Expresión de la molécula de adhesión Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos y monocitos en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV)	133

Figura 51. Expresión de las moléculas de adhesión P-selectina y GPIIb/IIIa en plaquetas de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) y tenofovir (TFV)	134
Figura 52. Efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> sobre las interacciones leucocito-endotelio en muestras de sangre de pacientes infectados por VIH	137
Figura 53. Análisis del efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> sobre la adhesión de las plaquetas al endotelio en pacientes infectados por VIH	139
Figura 54. Determinación del efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> sobre las interacciones plaqueta-leucocito en pacientes infectados por VIH	140
Figura 55. Estudio del efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> en la agregación plaquetaria estimulada por diferentes agonistas plaquetarios en pacientes infectados por VIH	141
Figura 56. Análisis del efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> sobre la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1 (CD11b/CD18) y gp150,95 (CD11c/CD18) en neutrófilos y monocitos de pacientes infectados por VIH	142
Figura 57. Evaluación del efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> en la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina y GPIIb/IIIa en plaquetas de pacientes infectados por VIH	143
Figura 58. Efecto del secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN _{ABC}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo y la activación plaquetaria	145
Figura 59. Implicación del receptor P2X ₇ en los efectos inducidos por el secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN _{ABC}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	146
Figura 60. Clasificación de los secretomas analizados en el estudio de ABC por proteómica	148
Figura 61. Proteínas en las que abacavir (ABC) induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos	149
Figura 62. Proteína en la que abacavir (ABC) induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos a través del receptor P2X ₇	150
Figura 63. Efecto de abacavir (ABC) en la expresión de LOX-1 en neutrófilos y plaquetas, e implicación del receptor LOX-1 en los efectos del SN _{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo	152

Figura 64. Efecto de abacavir (ABC) en la expresión de ADAM10 y ADAM17 en neutrófilos y su implicación en los efectos del SN _{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo	153
Figura 65. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos plaquetarios y los receptores purinérgicos plaquetarios P2X ₁ , P2Y ₁ y P2Y ₁₂ en los efectos del SN _{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo	154
Figura 66. Expresión basal del receptor P2X ₇ en leucocitos y plaquetas	155
Figura 67. Efecto de abacavir (ABC) sobre la expresión del receptor P2X ₇ en neutrófilos	156
Figura 68. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X ₇ sobre la movilización de Ca ²⁺ en neutrófilos	157
Figura 69. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X ₇ sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos	158
Figura 70. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X ₇ sobre la formación de poros en neutrófilos	159
Figura 71. Efecto de abacavir (ABC) sobre la liberación de interleucina (IL)-1β	160
Figura 72. Papel del receptor P2X ₇ en la homeostasis celular	162
Figura 73. Papel del receptor P2X ₇ en la señalización de daño celular	163
Figura 74. Efecto del secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN _{ATP}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	165
Figura 75. Implicación de los receptores purinérgicos en los efectos inducidos por el secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN _{ATP}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	166
Figura 76. Clasificación de los secretomas analizados en el estudio de ATP por proteómica	167
Figura 77. Proteínas en las que ATP induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos	168
Figura 78. Efecto de ATP en la expresión de LOX-1 en neutrófilos y plaquetas, y su implicación en los efectos del SN _{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	171

Figura 79. Efecto de ATP en la expresión de ADAM10 y ADAM17 en neutrófilos y su implicación en los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	173
Figura 80. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos plaquetarios y los receptores purinérgicos plaquetarios P2X ₁ , P2Y ₁ y P2Y ₁₂ en los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo	174
Figura 81. Efecto de ATP sobre la expresión del receptor P2X ₇	175
Figura 82. Efecto de ATP sobre la movilización de Ca ²⁺ en neutrófilos	176
Figura 83. Efecto de ATP sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos	176
Figura 84. Efecto de ATP y la implicación del receptor P2X ₇ sobre la formación de poros en neutrófilos	177
Figura 85. Efecto de ATP sobre la liberación de IL-1 β	178
Figura 86. Implicación del receptor LOX-1 en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC)	180
Figura 87. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos, los receptores purinérgicos P2X ₁ , P2Y ₁ y P2Y ₁₂ , y la ciclooxigenasa en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC)	180
Figura 88. Efecto del tratamiento crónico con abacavir (ABC) y la implicación de los receptores P2X ₇ y LOX-1 en la formación del trombo inducida por ABC	181
Figura 89. Efecto de ATP sobre la formación de trombos en el modelo de trombosis inducida por FeCl ₃	182
Figura 90. Receptores purinérgicos implicados en la formación del trombo inducida por ATP	183
Figura 91. Implicación del receptor LOX-1, la proteína HSP70 y la liberación de gránulos en la formación del trombo inducida por ATP	184
Figura 92. Efecto del tratamiento crónico de ATP e implicación de los receptores P2X ₇ y LOX-1 en la formación del trombo inducida por ATP	185
Figura 93. Efecto de abacavir (ABC) y ATP sobre la liberación de NETs	187

Figura 94. Implicación de las NETs en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC) y por ATP	188
Figura 95. Efectos de abacavir (ABC) en pacientes con infección por VIH en tratamiento con este fármaco	201
Figura 96. Efectos de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> sobre muestras de pacientes con infección por VIH	203
Figura 97. Mecanismo por el cual abacavir (ABC) y adenosina trifosfato (ATP) inducen la formación de agregados plaqueta-neutrófilo	210

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de los gránulos plaquetarios	20
Tabla 2. Ligandos del receptor LOX-1	37
Tabla 3. Combinaciones de fármacos que forman las pautas preferentes y alternativas	58
Tabla 4. Anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados	115
Tabla 5. Fármacos, antagonistas e inhibidores utilizados en el tratamiento de las células	116
Tabla 6. Reactivos empleados	117
Tabla 7. Material específico utilizado	118
Tabla 8. Tratamiento y fármacos antirretrovirales de los pacientes que conforman la cohorte	125
Tabla 9. Características demográficas de los pacientes que conforman la cohorte	126
Tabla 10. Expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o tenofovir (TFV)	133
Tabla 11. Características demográficas y tratamiento antirretroviral de los pacientes que conforman la cohorte	136
Tabla 12. Efecto de abacavir (ABC) <i>in vitro</i> en la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de sangre procedente de pacientes infectados por VIH	142
Tabla 13. Términos GO relacionados con los componentes celulares asociados con las proteínas en las que ATP induce cambios en sus niveles en el secretoma liberado por los neutrófilos	169
Tabla 14. Términos GO relacionados con los procesos biológicos asociados con las proteínas en las que ATP induce cambios en sus niveles en el secretoma liberado por los neutrófilos	170
Tabla 15. Relación de los componentes de las NETs con la trombosis (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. Int. J. Mol. Sci. 2021)	189

Tabla 16. Componentes de las NETs detectados en pacientes con diferentes patologías relacionadas con la trombosis (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. Int. J. Mol. Sci. 2021)	190
Tabla 17. Relación de los diferentes signos clínicos asociados con la patología del COVID-19 con los niveles de los diferentes componentes de las NETs (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. Biomedicines 2022)	192

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	LXIX
ÍNDICE DE TABLAS	LXXIX

I. INTRODUCCIÓN **9**

1. SISTEMA CARDIOVASCULAR: INFLAMACIÓN Y TROMBOSIS **11**

1.1. PROCESO INFLAMATORIO **11**

1.1.1. INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO 13

1.2. PROCESO TROMBÓTICO **17**

1.2.1. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA 19

1.2.2. AGREGACIÓN PLAQUETARIA 21

1.3. INMUNOTROMBOSIS **22**

1.3.1. INTERACCIONES PLAQUETA-ENDOTELIO 22

1.3.2. INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO 24

1.4. PAPEL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA INMUNOTROMBOSIS **26**

1.4.1. SECRETOMA Y VESÍCULAS EXTRACELULARES 26

1.4.2. NETs 29

1.5. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA: ATP Y RECEPTORES PURINÉRGICOS **31**

1.5.1. RECEPTOR P2X₇ 33

1.6. PAPEL DE LOX-1 **36**

2. VIH Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL **39**

2.1. VIROLOGIA MOLECULAR: CLASIFICACIÓN, GENOMA Y MORFOLOGÍA **40**

2.2. CICLO BIOLÓGICO DEL VIH **42**

2.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR VIH **44**

2.4. EPIDEMIOLOGÍA **46**

2.5. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL **48**

2.5.1. FÁRMACOS 49

2.5.2. PAUTAS POSOLÓGICAS 57

2.5.3. TENOFOVIR 58

2.5.4. ABACAVIR 60

2.6. COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	62
3. <u>COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES EN LOS PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH</u>	63
3.1. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN	63
3.2. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS AL ABACAVIR	64
II. OBJETIVOS	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. <u>ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CARDIOVASCULAR DE ABC EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH</u>	79
1.1. COHORTE DE PACIENTES	79
1.1.1. PACIENTES INFECTADOS POR VIH	79
1.1.1.1. COHORTE DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON ABC O TFV	79
1.1.1.2. COHORTE DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO IN VITRO	79
1.1.2. DONANTES NO INFECTADOS POR VIH	80
1.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS	80
1.2.1. SANGRE	80
1.2.1.1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS	80
1.2.1.2. EXTRACCIÓN DE PLAQUETAS	82
1.2.2. CORDONES UMBILICALES	83
1.2.2.1. EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES	83
1.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	85
1.3.1. ADHESIÓN EN CÁMARA DE FLUJO PARALELO	85
1.3.1.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO	86
1.3.1.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-ENDOTELIO	88
1.3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO	90
1.3.2.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO	91
1.3.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LEUCOCITOS	92

1.3.2.3.	ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PLAQUETAS	93
1.3.3.	AGREGOMETRÍA	95
1.3.3.1.	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-PLAQUETA	95
2. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP INDUCEN EFECTOS PRO-TROMBÓTICOS		97
2.1. COHORTE DE DONANTES		97
2.1.1.	DONANTES NO INFECTADOS POR VIH	97
2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS		98
2.2.1.	SANGRE	98
2.2.1.1.	AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS	98
2.2.1.2.	EXTRACCIÓN DE PLAQUETAS	98
2.2.1.3.	OBTENCIÓN DE SECRETOMAS	98
2.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES		99
2.3.1.	CITOMETRÍA DE FLUJO	99
2.3.1.1.	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO	99
2.3.1.2.	ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	101
2.3.1.3.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X ₇ , LOX-1, ADAM10 Y ADAM17	103
2.3.1.4.	EVALUACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO	104
2.3.1.5.	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	105
2.3.1.6.	EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA CELULAR	105
2.3.2.	PROTEÓMICA	106
2.3.2.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	106
2.3.2.2.	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS SECRETOMAS	107
2.3.2.3.	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS	107
2.3.3.	ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	108
2.3.3.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	108
2.3.3.2.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA 1 β	108
2.3.4.	INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	109
2.3.4.1.	DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NETs	109

3. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP PROMUEVEN LA TROMBOSIS EN UN MODELO IN VIVO	111
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	111
3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	111
3.2.1. MICROSCOPÍA INTRAVITAL	111
3.2.1.1. <i>MODELO DE TROMBOSIS IN VIVO</i>	112
4. MATERIAL	115
4.1. ANTICUERPOS Y MARCADORES FLUORESCENTES	115
4.2. FÁRMACOS Y REACTIVOS	116
5. COMITÉS ÉTICOS	118
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	119
IV. RESULTADOS	123
1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE ABACAVIR EN DIFERENTES COHORTES DE PACIENTES INFECTADOS POR VIH	125
1.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON ABACAVIR Y TENOFOVIR	125
1.1.1. TRATAMIENTO Y PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LOS PARTICIPANTES DE LA COHORTE	125
1.1.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO	127
1.1.3. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN DE PLAQUETAS SOBRE EL ENDOTELIO	128
1.1.4. DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO	130
1.1.5. ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA	131
1.1.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS	132
1.1.7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PLAQUETARIAS	134
1.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE ABACAVIR IN VITRO EN MUESTRAS DE PACIENTES INFECTADOS POR VIH	135
1.2.1. TRATAMIENTOS Y PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LOS PARTICIPANTES DE LA COHORTE	135
1.2.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO	137
1.2.3. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN DE PLAQUETAS SOBRE EL ENDOTELIO	138
1.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO	139

1.2.5.	ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA (INTERACCIÓN PLAQUETA-PLAQUETA)	140
1.2.6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LEUCOCITOS	141
1.2.7.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PLAQUETAS	143
2. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP INDUCEN EFECTOS PROTROMBÓTICOS		144
2.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PROTROMBÓTICOS DE ABACAVIR		144
2.1.1.	EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ABC	144
2.1.2.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA LIBERACIÓN DEL SECRETOMA	145
2.1.3.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL SECRETOMA LIBERADO POR NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ABC	147
2.1.3.1.	<i>CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS</i>	147
2.1.3.2.	<i>ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN LAS QUE ABC INDUCE CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN</i>	148
2.1.4.	DETERMINACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ABC	151
2.1.5.	ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR P2X ₇ EN NEUTRÓFILOS EN LOS EFECTOS DE ABC	155
2.1.5.1.	<i>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X₇</i>	155
2.1.5.2.	<i>ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X₇</i>	161
2.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PROINFLAMATORIOS Y PROTROMBÓTICOS DE ATP		164
2.2.1.	EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP	164
2.2.2.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LOS EFECTOS DE ATP	165
2.2.3.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL SECRETOMA LIBERADO POR NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP	166
2.2.3.1.	<i>CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS</i>	166
2.2.3.2.	<i>ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN LAS QUE ATP INDUCE CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN</i>	167

2.2.4.	DETERMINACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP	170
2.2.5.	ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DE NEUTRÓFILOS EN LOS EFECTOS DE ATP	174
2.2.5.1.	<i>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X₇</i>	174
2.2.5.2.	<i>SEÑALIZACIÓN POST-ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS</i>	175
3.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS TROMBÓTICOS EN UN MODELO ANIMAL IN VIVO	179
3.1.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS POR LOS QUE ABACAVIR INDUCE LA FORMACIÓN DE TROMBOS EN UN MODELO IN VIVO INDUCIDO POR FeCl₃	179
3.1.1.	MODELO AGUDO	179
3.1.2.	MODELO CRÓNICO	181
3.2.	ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ATP Y SUS MECANISMOS EN UN MODELO IN VIVO DE TROMBOSIS INDUCIDO POR FeCl₃	182
3.2.1.	MODELO AGUDO	182
3.2.2.	MODELO CRÓNICO	184
4.	ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE NETs EN LOS EFECTOS PROTROMBÓTICOS DE ABACAVIR Y DE ATP	186
4.1.	ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE NETs	186
4.2.	IMPLICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NETs EN EL MODELO IN VIVO DE TROMBOSIS	188
4.3.	ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA LIBERACIÓN DE NETs	188
4.3.1.	ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA IMPLICACIÓN DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS EN LA TRANSICIÓN DE LA INFLAMACIÓN A LA TROMBOSIS	188
4.3.2.	ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS NETs EN OTRAS PATOLOGÍAS	191
V.	DISCUSIÓN	195
VI.	CONCLUSIONES	213
VII.	REFERENCIAS	219
VIII.	ANEXO I: CERTIFICADOS	253

I. INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA CARDIOVASCULAR: INFLAMACIÓN Y TROMBOSIS

1.1. PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es una respuesta adaptativa del organismo desencadenada por condiciones y estímulos nocivos, como infecciones y lesiones tisulares (1). Esta respuesta consiste en una cascada de múltiples pasos, definidos y regulados, que involucran fases consecutivas de interacciones entre los leucocitos y el endotelio, con la finalidad de que se produzca la extravasación de los leucocitos del plasma sanguíneo hacia los focos de inflamación (1-3).

La inflamación puede iniciarse a partir de estímulos exógenos, cuando se produce una infección o a partir de estímulos endógenos, en el caso de las lesiones tisulares (1,2,4,5). Los estímulos exógenos se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), liberados por los microorganismos invasores (como lipoproteínas y lipopolisacáridos derivados de los diferentes patógenos) (1,2,4,5). Por el contrario, los estímulos endógenos se conocen como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), y derivan de células muertas y/o dañadas o liberadas en respuesta a un estrés celular y/o tisular (como adenosina trifosfato [ATP], ADN, ARN y proteínas de la matriz extracelular) (1,2,4,5).

El reconocimiento inicial de la infección está mediado por mastocitos y macrófagos residentes en los tejidos, y esto conduce a la producción y liberación de una variedad de mediadores inflamatorios, que incluyen quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas (1,2,4). El efecto de estos mediadores es inducir un exudado de proteínas plasmáticas y leucocitos (principalmente neutrófilos), que se extravasan a través de las vénulas postcapilares a los tejidos extravasculares en el sitio de la infección o de la lesión con el fin de erradicar el estímulo desencadenante y restaurar el tejido dañado (1,2,4). Para ello, una de las funciones principales de los mediadores inflamatorios liberados consiste en la activación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, para favorecer

sus interacciones con los leucocitos y que estos puedan acudir al foco inflamatorio (1,2,6).

En un tejido no inflamado los leucocitos no interaccionan con las células endoteliales (7,8). Esto se debe a que las células endoteliales están en un estado de reposo, en el que producen óxido nítrico (NO) mediante la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en respuesta a las señales que reciben por la presión del flujo sanguíneo (7,9,10). El NO es el causante del mantenimiento de la homeostasis celular, ya que puede inhibir la expresión de mediadores pro-inflamatorios, la fusión de los cuerpos Weibel-Palade con la superficie celular, y la activación de los leucocitos (7,9-15). Sin embargo, cuando se inicia un proceso inflamatorio, las células endoteliales se activan y adquieren nuevas capacidades diferentes a las de las células en reposo. La activación puede dividirse en dos tipos (tipo I y tipo II) dependiendo de la rapidez y de la necesidad de la expresión génica *de novo* (7,16). La **activación endotelial de tipo I** está mediada por ligandos como la histamina, que se unen a los receptores acoplados a la proteína G, como los receptores de histamina H1 (7,16,17). Este receptor inicia una señalización que resulta en el aumento del Ca^{2+} intracelular que a su vez inicia la exocitosis de los cuerpos Weibel-Palade, llevando a la superficie de la célula endotelial la molécula de adhesión P-selectina (18). En cuanto a la **activación endotelial de tipo II**, los principales ligandos causantes de la misma son el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina (IL)-1, que al unirse a sus receptores en las células inician un proceso de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), que a su vez inicia la transcripción para dar lugar a la expresión de E-selectina, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), y diferentes quimiocinas (7,19,20).

1.1.1. INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO

Como se ha mencionado, los leucocitos del torrente sanguíneo deben acudir al foco inflamatorio para tratar de eliminar los agentes dañinos y restaurar el tejido. Para ello los leucocitos sufren una serie de interacciones con las células endoteliales que en último lugar les permite extravasarse y acudir al tejido inflamado. Las etapas por las que se produce la extravasación de los leucocitos son las siguientes (**Figura 1**) (3,5,6,13,21,22):

- **Captura:** las quimiocinas liberadas por los macrófagos residentes en el tejido generan un gradiente que guía a los leucocitos del torrente sanguíneo hacia el foco inflamatorio. Esto hace que los leucocitos se aproximen a la superficie endotelial, enlenteciendo su velocidad y comenzando la cascada de interacciones (5,6,13,21,23).
- **Rodamiento:** cuando se produce esta fase las células endoteliales ya están activadas debido a las quimiocinas - histamina, factor activador de plaquetas (PAF), TNF- α , IL-1 β - liberadas en el foco inflamatorio y, por tanto, los leucocitos pueden interactuar con las selectinas expresadas en la superficie endotelial a través de sus ligandos como el ligando 1 de P-selectina (PSGL-1), el ligando 1 de E-selectina (ESL-1), el antígeno muy tardío 4 (VLA-4) y otros ligandos glicosilados. Estas interacciones transitorias entre las selectinas y sus ligandos dan como resultado la unión y el rodamiento de los leucocitos (3,5,6,21-24). Hasta este punto (captura y rodamiento de los leucocitos) el proceso es reversible, de hecho, muchos de los leucocitos que han comenzado el proceso no se terminarán adhiriendo, sino que se separarán de la superficie del vaso y volverán a entrar en el torrente sanguíneo (6). Por tanto, para transformar el rodamiento en adhesión, las interacciones transitorias de baja afinidad deben ser reemplazadas por una adhesión de mayor afinidad entre el leucocito y la superficie endotelial.

-
- **Activación:** Las interacciones de alta afinidad son desencadenadas por estímulos presentados al leucocito en la superficie endotelial. Estos pueden ser moléculas intrínsecas de la superficie celular endotelial o moléculas como las quimiocinas del sitio inflamatorio o producidas por el endotelio que se unen a los glicosaminoglicanos de la superficie endotelial y se presentan a los leucocitos. El rodamiento permite el contacto entre las quimiocinas, presentes en la superficie de las células endoteliales, con los leucocitos que se unen a estas quimiocinas a través de los receptores de quimiocinas acopladas a la proteína G. Esta unión induce la activación de los leucocitos, iniciando una transducción de señales intracelulares que finalmente conducen a un aumento en la expresión de integrinas y una serie de cambios conformacionales en las integrinas de forma que estas se vuelven más afines a sus ligandos en las células endoteliales (22,24).

Los leucocitos poseen integrinas β_1 , β_2 y α . Las integrinas β_2 también son conocidas como CD18. En cuanto a las cadenas α , actualmente se conocen 4 cadenas que se pueden emparejar con la cadena β_2 , que son α_L (CD11a), α_M (CD11b), α_X (CD11c), y α_D (CD11d). Estas combinaciones dan como resultado las moléculas de adhesión antígeno-1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1, CD11a/CD18), antígeno-1 de macrófagos (Mac-1, CD11b/CD18), glicoproteína (gp)150,95 (CD11c/CD18), y en cuanto a la cadena α_D , esta no está completamente caracterizada en humanos. Estas integrinas se expresan en diferentes grados en los diferentes tipos leucocitarios y en general, pueden sustituirse entre sí (3,5,6,13,21,22,24).

- **Adhesión firme:** activados los dos tipos celulares, las integrinas de los leucocitos pueden unirse a sus ligandos en las células endoteliales - ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 -, dando lugar a la adhesión firme de los leucocitos sobre el endotelio (3,5,6,13,21,22,24).

- **Migración o diapédesis:** tras la adhesión, el leucocito puede atravesar el endotelio de forma paracelular o transcelular, mediante una serie de fenómenos de adhesión dinámica. Ambos tipos de migración requieren de interacciones homofílicas entre las moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias. Las moléculas de adhesión que participan son la molécula de adhesión denominada molécula de adhesión-1 de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1) y CD99, que actúan de forma secuencial (3,5,6,13,22,24).

La forma más frecuente es la migración paracelular, que consiste en el paso del leucocito entre dos células endoteliales. Esta se produce por la ruptura transitoria y reversible de las proteínas de unión intercelular (como el complejo VE-cadherina) ya que la interacción de leucocitos y células endoteliales activa una serie de quinasas que fosforilan la parte citoplasmática del complejo VE-cadherina, produciendo la ruptura reversible de la unión entre las células endoteliales, y por tanto facilitando el paso del leucocito entre ellas. Por otro lado, la migración transcelular es menos frecuente y consiste en el paso de los leucocitos a través de la célula endotelial (5,21,22).

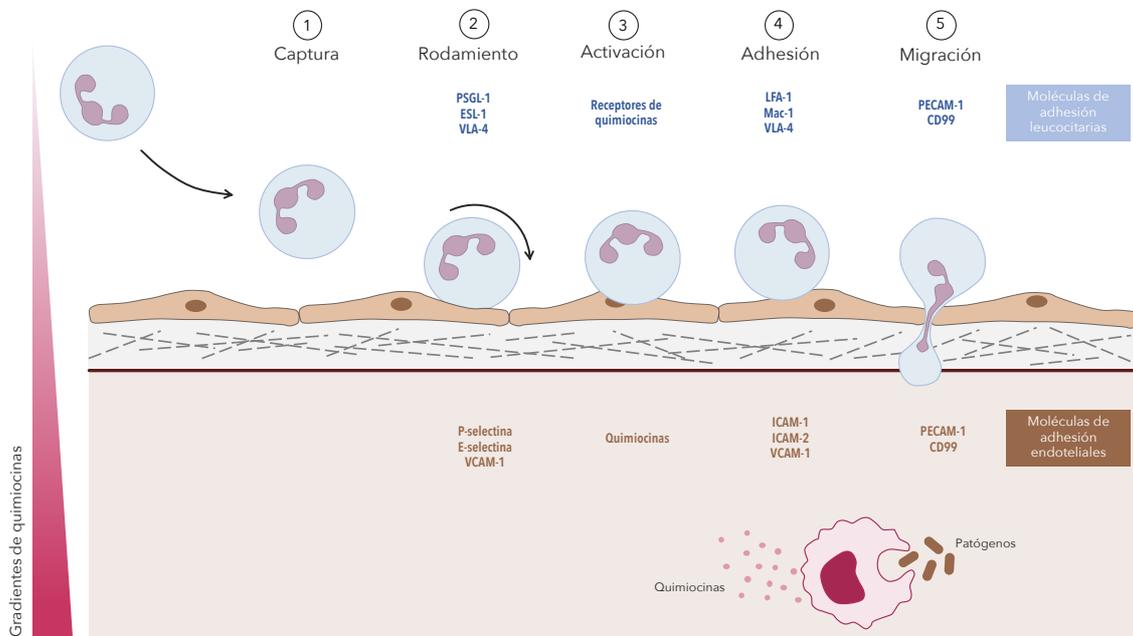


Figura 1. Fases de la migración leucocitaria y moléculas de adhesión implicadas. La detección de patógenos o agentes extraños por parte de los macrófagos residentes en los tejidos induce la liberación de quimiocinas que promueve la migración de los leucocitos, que se da en las siguientes fases: 1. Captura: inducida por el gradiente de quimiocinas; 2. Rodamiento: son uniones débiles de los leucocitos con las células endoteliales que se producen por las interacciones del ligando 1 de P-selectina (PSGL-1), el ligando 1 de E-selectina (ESL-1) y el antígeno muy tardío 4 (VLA-4) en leucocitos con P-selectina, E-selectina y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) en el endotelio, respectivamente; 3. Activación: se produce por la unión de quimiocinas presentes en el endotelio con sus receptores en los leucocitos; 4. Adhesión: se produce por uniones firmes entre los leucocitos y el endotelio, mediante las interacciones de la molécula de adhesión antígeno-1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1), antígeno-1 de macrófagos (Mac-1) y VLA-4 con la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1, ICAM-2 y VCAM-1 en las células endoteliales; 5. Migración: se produce el paso de los leucocitos desde el torrente sanguíneo al tejido donde se encuentra el foco inflamatorio, esta etapa se produce por las interacciones de la molécula de adhesión-1 de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1) y CD99, tanto en leucocitos como en las células endoteliales.

1.2. PROCESO TROMBÓTICO

La trombosis es un proceso patológico que se produce como consecuencia de un desequilibrio de la hemostasia produciendo la formación de coágulos (o trombos) en el lumen de los vasos sanguíneos (25). Una de las funciones fisiológicas de la hemostasia es evitar la pérdida de sangre cuando se produce una lesión tisular (25). Sin embargo, la trombosis es consecuencia de un exceso en los procesos hemostáticos en respuesta a determinadas patologías que cursan con daño endotelial, depósito de lípidos y la formación de la placa de ateroma en la pared arterial, así como con la hiperactividad de los factores de coagulación. De hecho, la trombosis es un evento crítico en las enfermedades arteriales asociadas al infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, así como en los tromboembolismos venosos, los cuales determinan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados (26).

El proceso de **coagulación** se inicia cuando se produce una rotura en la pared de un vaso sanguíneo o en endotelio (26). Esta lesión deja el colágeno - situado en la capa subendotelial - y el factor tisular - liberado por células endoteliales y leucocitos - expuestos al flujo sanguíneo (26,27). Así, las plaquetas pueden activarse a través de dos rutas diferentes. En una de estas vías, las plaquetas se unen al colágeno mediante la molécula de adhesión GPVI, y esta unión desencadena la activación de otro receptor de colágeno en plaquetas $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), que participa en la adhesión firme de las plaquetas sobre el colágeno (**Figura 2**) (27-34). Además, estas interacciones generan una serie de señales intracelulares que producen la activación y la desgranulación de plaquetas (26-34). Esta desgranulación libera consigo una serie de agonistas plaquetarios que inducen la activación y desgranulación de las plaquetas que se encuentran alrededor, por lo que se va amplificando el proceso (26-36).

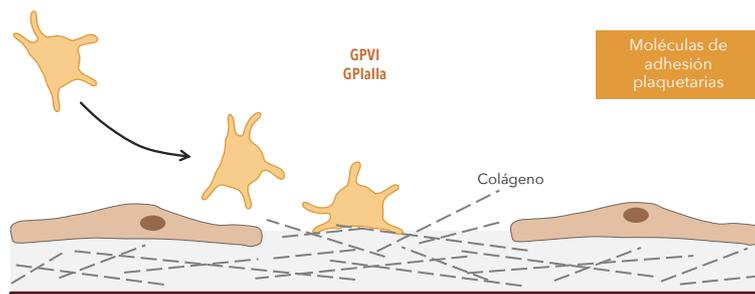


Figura 2. Adhesión de las plaquetas en las lesiones tisulares. La rotura de la pared de un vaso sanguíneo o del endotelio deja el colágeno, situado en la capa subendotelial, expuesto al flujo sanguíneo de forma que las plaquetas pueden unirse a este mediante las moléculas de adhesión GPVI y GPIIb/IIIa, iniciando el proceso de coagulación para restaurar el tejido.

Por otro lado, la activación de las plaquetas se puede dar a través de la cascada de coagulación (**Figura 3**) (30,31,37). El principal iniciador de este proceso es el factor tisular, liberado por las células endoteliales cuando se producen lesiones en estas células (38). La cascada de coagulación se da como consecuencia de un mecanismo de amplificación. La activación de un factor de coagulación cataliza la activación del factor de coagulación siguiente. Esta cascada de coagulación resulta en la producción de trombina, que induce la agregación plaquetaria, y en la formación y estabilización de fibrina, a partir de la proteína plasmática fibrinógeno, que favorece la formación de agregados (30,31,37). La formación de coágulos se produce debido a que el fibrinógeno, presente a nivel plasmático y que es soluble en sangre, se convierte en fibrina, que es insoluble y de esta forma favorece la formación de los coágulos.

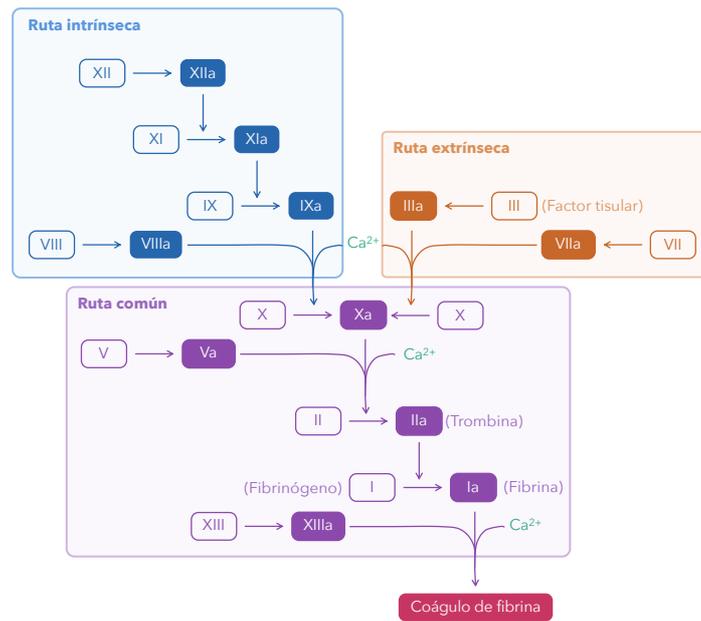


Figura 3. Cascada de coagulación. La producción final de fibrina que es la que aporta estabilidad a los coágulos se da mediante la activación de la cascada de coagulación que puede darse por dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca, a través de la activación consecutiva de diferentes factores.

1.2.1. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación de las plaquetas se produce cuando alguno de los ligandos de los receptores de la superficie de las plaquetas se une a ellos. Los principales inductores de la activación plaquetaria son trombina, tromboxano, epinefrina, colágeno y adenosina difosfato (ADP) (**Figura 4**) (27,33,34).

La activación plaquetaria induce tanto un cambio de forma en las plaquetas como la liberación del contenido de sus gránulos (27,33,34). En este sentido, las plaquetas contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos: gránulos α , gránulos densos y lisosomas. Los gránulos α son reservorios de diferentes moléculas de adhesión plaquetarias, entre ellas P-selectina, GPIIb α (CD42b) y GPIIb/IIIa (α IIb/ β 3, CD41/CD61), citocinas y también diferentes factores de crecimiento (**Tabla 1**) (27,33-35). La liberación de los gránulos densos produce la liberación de ADP, ATP, polifosfatos, serotonina y Ca^{2+} , entre otros (**Tabla 1**) (27,33-35). El ADP es esencial como cofactor de la activación y la agregación plaquetaria, y actúa interaccionando con dos

receptores en la superficie de las plaquetas acoplados a la proteína G, los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ (**Figura 4**) (28,30). Ambos receptores actúan de modo sinérgico en la activación de las plaquetas. El receptor P2Y₁ es probablemente el que origina la activación inicial que puede ser reversible, mientras que el P2Y₁₂ es necesario para la activación prolongada (39). Por otro lado, además de ADP los gránulos densos también liberan grandes cantidades de ATP, que puede activar los receptores P2X₁ (31). La activación de este receptor produce un influjo de Ca²⁺, que da lugar a un cambio conformacional de las plaquetas y a una segunda liberación de gránulos (40), pero no induce la agregación plaquetaria (41). Por lo tanto, la señalización de los receptores P2X₁ no se considera clave en la agregación, pero sí en la modulación de la respuesta plaquetaria (31). En este sentido, es importante tener en cuenta que la respuesta generada por los receptores P2X₁ no se mantiene de forma prolongada, debido a la rápida y continua desensibilización de estos receptores (42). Por último, los lisosomas plaquetarios contienen diferentes proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular (**Tabla 1**) (27,33-35).

Tabla 1. Contenido de los gránulos plaquetarios.

Gránulos α	Gránulos densos	Lisosomas
Fibrinógeno	Serotonina	Catepsinas
Plasminógeno	Histamina	
vWF		Carboxipeptidasas
Trombospondina	ATP	
Factor V	ADP	Colagenasa
Factor VII		
Factor XI	Ca ²⁺	Fosfatasa ácida
Factor XIII	Mg ²⁺	
Factores de crecimiento		Glicohidrolasas
Inhibidores de proteasas	Pirofosfatos	
Inmunoglobulinas	Polifosfatos	
Membrana	Membrana	Membrana
GPIIb/IIIa	GPIIb/IIIa	CD63
GPVI	GPIbα	
P-selectina	P-selectina	
PECAM-1	CD63	

vWF: factor von Willebrand; GP: glicoproteína; PECAM-1: molécula de adhesión-1 de células endoteliales y plaquetas; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato.

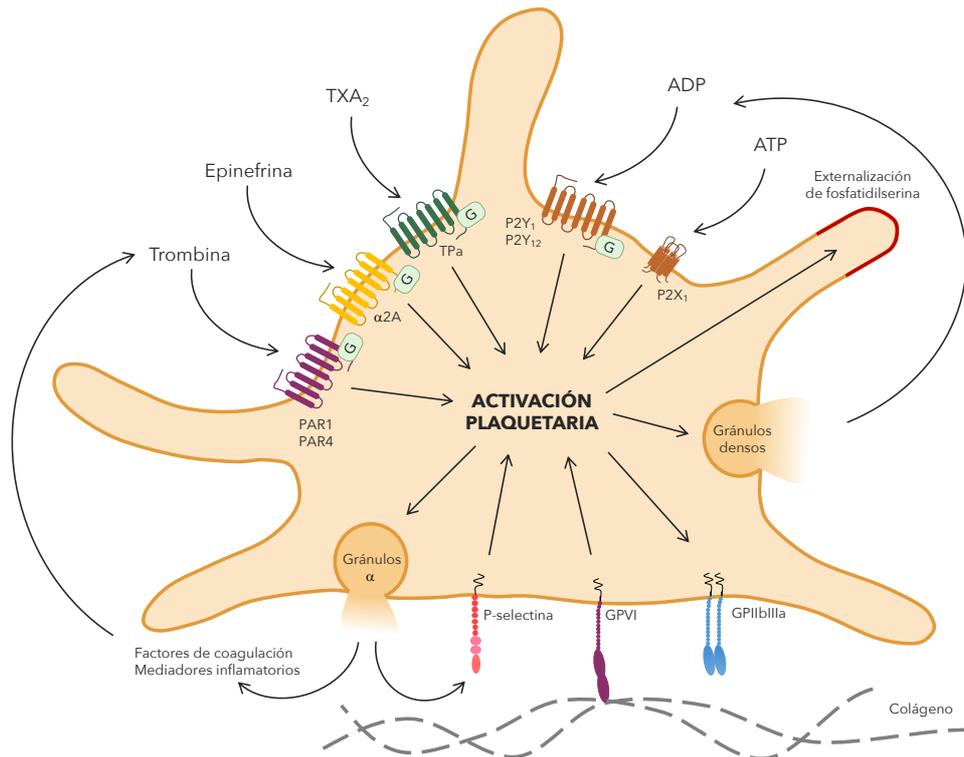


Figura 4. Rutas de activación plaquetaria. Las plaquetas pueden activarse por la trombina a través de los receptores activados por proteasas (PAR)1 y PAR4; por la epinefrina por su unión a los receptores α 2A; por el tromboxano A_2 (TXA₂) mediante el receptor T prostanoide a (TPa); por adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP) a través de los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2X₁; y por la unión de la glicoproteína (GP)VI con el colágeno. Todo esto además de inducir la activación plaquetaria provoca la movilización de la fosfatidilserina a la capa externa de la membrana y la desgranulación liberando el contenido de los gránulos α y los gránulos densos amplificando así la señal de activación. La liberación de los gránulos α induce la translocación de P-selectina desde los gránulos a la superficie plaquetaria, y también la activación de la molécula de adhesión GPIIb/IIIa. Tanto la P-selectina como GPIIb/IIIa al unirse a sus ligandos pueden seguir amplificando la activación plaquetaria y contribuir a la agregación plaquetaria.

1.2.2. AGREGACIÓN PLAQUETARIA

La agregación plaquetaria comienza tras la activación plaquetaria y ocurre como resultado de la activación de la molécula de adhesión GPIIb/IIIa (α IIb/ β 3, CD41/CD61) (30,31,33). Esta es la molécula de adhesión más abundante en las plaquetas y se expresa de forma constitutiva en su superficie plaquetaria (31). Cuando las plaquetas se encuentran en estado quiescente, GPIIb/IIIa se encuentra en un estado inactivado; no obstante, la activación de determinados receptores plaquetarios acoplados a la proteína G, induce una serie de cambios conformacionales en esta glicoproteína

desencadenando su activación (30,31,33). Tras la activación, GPIIb/IIIa se une a moléculas de adhesión extracelulares, como el factor von Willebrand (vWF), fibrinógeno, fibronectina y trombospondina (30,31,33). Adicionalmente, esta molécula de adhesión forma puentes de fibrina entre diferentes plaquetas, participando en la cohesión y el crecimiento del trombo (30,31,33).

1.3. INMUNOTROMBOSIS

La inflamación y la trombosis son procesos fisiológicos diferentes, sin embargo, en los últimos años se ha descrito una intensa interdependencia entre estos mecanismos. De hecho, fisiológicamente, la activación de la coagulación dependiente de la inflamación es parte de la respuesta del huésped a la presencia de patógenos y tiene lugar con el fin de facilitar su reconocimiento y limitar su propagación sistémica en sangre (25,28,30,31). Esta respuesta se logra a través de interacciones entre las células inmunitarias innatas y las células endoteliales con las plaquetas, desencadenando la activación del sistema de coagulación en un proceso denominado inmunotrombosis (25).

1.3.1. INTERACCIONES PLAQUETA-ENDOTELIO

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en un tejido no inflamado las células endoteliales vasculares se encuentran en estado de reposo manteniendo un flujo sanguíneo regular mediante diferentes mecanismos que inhiben los procesos de coagulación. Entre los mecanismos más importantes de los que disponen las células endoteliales para inhibir la coagulación se encuentra la expresión de inhibidores de la vía del factor tisular (TFPI) que bloquean el inicio de la coagulación; la expresión de proteoglicanos de heparán sulfato que se une a la antitrombina III e inactiva la trombina; y la expresión de trombomodulina. La trombomodulina es una proteína de membrana que disminuye la especificidad de unión de la trombina por un procoagulante, favoreciendo así su especificidad por un anti-coagulante activador de la proteína C (7-16). Por otro lado, las células endoteliales producen NO y prostaglandina I₂ (PGI₂), que sinérgicamente inhiben la adhesión y la agregación

plaquetaria (7-9,14). Sin embargo, cuando se desencadena el proceso inflamatorio se produce la activación de las células endoteliales causando, de forma similar al reclutamiento de los leucocitos, la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio vascular intacto (7,16,17).

Esta adhesión se produce mediante diferentes etapas (**Figura 5**): captura, rodamiento y activación, y finalmente adhesión firme de las plaquetas (27,29,33,43). El primer contacto entre las plaquetas circulantes y el endotelio está mediado por selectinas, presentes en la superficie de las células endoteliales. P-selectina se transloca rápidamente a la superficie endotelial tras el inicio del proceso inflamatorio, desde los cuerpos Weibel-Palade que también liberan en la superficie de las células endoteliales vWF (27,31). Tanto P-selectina como vWF promueven las primeras interacciones con PSGL-1 y GPIb α , respectivamente, que se expresan de forma constitutiva en las plaquetas no activadas (29). Estas interacciones, aunque débiles, desencadenan la activación de las plaquetas y la secreción de sus gránulos que conlleva a la movilización de P-selectina e integrinas β_3 hacia la superficie de las plaquetas (27,31). Debido a la expresión de estas nuevas moléculas de adhesión en plaquetas se produce la adhesión firme de las mismas sobre el endotelio, mediante las interacciones de P-selectina con PSGL-1, GPIIb/IIIa y GPIb α con ICAM-1, y CD40L con CD40 en plaquetas y en células endoteliales, respectivamente (27,29,31,34).

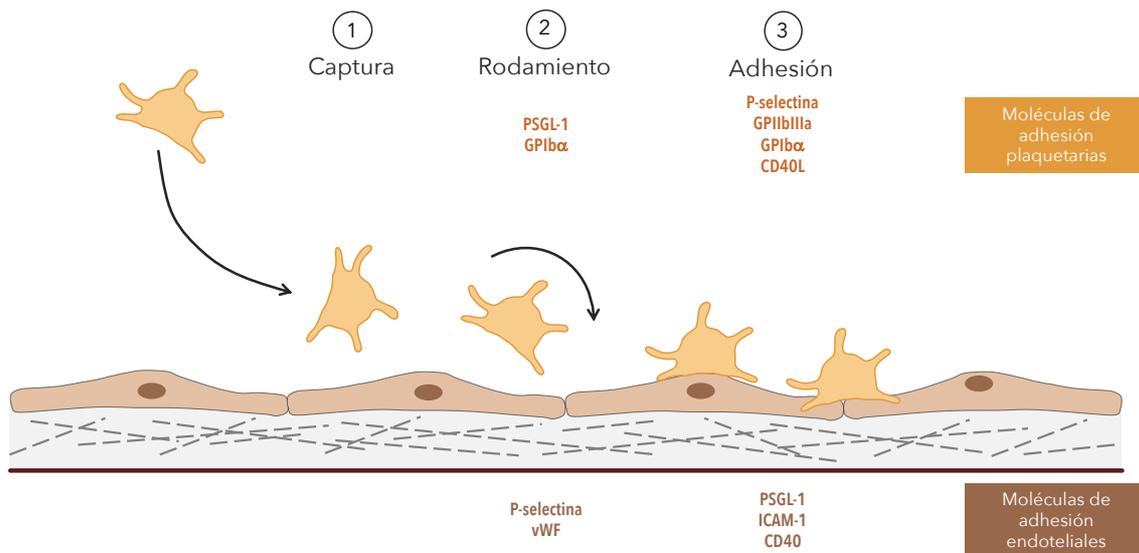


Figura 5. Fases de la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio. La presencia de estímulos proinflamatorios y/o la activación de las células endoteliales promueven la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio intacto, que se da en las siguientes fases: captura; rodamiento, que se caracteriza por uniones débiles de las plaquetas con las células endoteliales a través de las interacciones del ligando 1 de P-selectina (PSGL-1) y la glicoproteína (GP)Ib α en plaquetas con P-selectina y el factor von Willebrand (vWF) en el endotelio; y finalmente la adhesión mediante las interacciones firmes de P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIb α y CD40L con PSGL-1, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y CD40, en plaquetas y células endoteliales, respectivamente.

1.3.2. INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO

Además del reclutamiento clásico de los leucocitos al foco inflamatorio, las plaquetas adheridas al endotelio pueden interactuar con los leucocitos. Durante los procesos mencionados anteriormente, se produce tanto la activación de las plaquetas como de los leucocitos, y esto contribuye a las interacciones entre estos dos tipos de células (27,29,31,34,44,45).

Estas interacciones se dan principalmente por la unión de P-selectina en la superficie de las plaquetas con PSGL-1 en leucocitos, dando lugar a uniones débiles, que sin embargo generan la activación de las integrinas tanto en plaquetas como en leucocitos. Esta activación contribuye a la adhesión firme mediante las interacciones de GPIIb/IIIa, GPIb α con Mac-1, y CD40L con CD40, en plaquetas y leucocitos, respectivamente. Otro mecanismo por el que se produce la adhesión firme es por la unión de ICAM-2 plaquetaria con LFA-1 en leucocitos (**Figura 6**) (27,29,34,44-46).

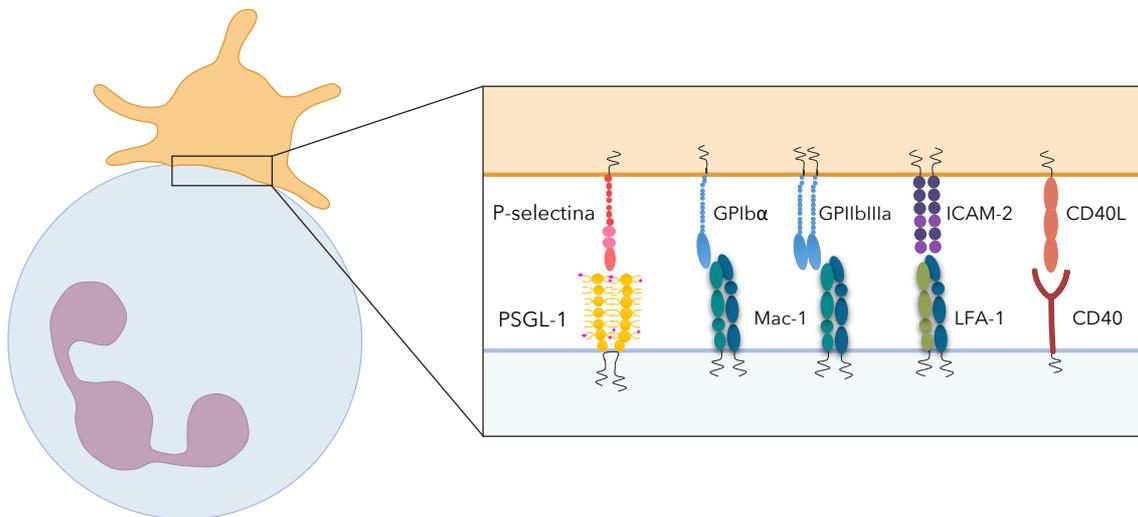


Figura 6. Moléculas de adhesión implicadas en la adhesión de plaquetas sobre leucocitos. Las interacciones plaqueta-leucocito se dan debido a las uniones de las moléculas de adhesión plaquetarias: P-selectina, la glicoproteína (GP)Ib α , GPIIb/IIIa, la molécula de adhesión intercelular 2 (ICAM-2) y CD40L, con las moléculas de adhesión leucocitarias: el ligando 1 de P-selectina (PSGL-1), el antígeno-1 de macrófagos (Mac-1), el antígeno-1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1) y CD40, respectivamente.

Todos estos procesos e interacciones *per se*, o la liberación de mediadores proinflamatorios y/o protrombóticos por cualquiera de los tipos celulares implicados, pueden inducir la activación de otras células vasculares, promoviendo así una continua interestimulación entre neutrófilos, plaquetas y células endoteliales, dando lugar a la transición de la inflamación a la trombosis (27,47). Además, el contacto estrecho entre las plaquetas y los leucocitos, especialmente los neutrófilos, genera una comunicación constante entre ambos tipos celulares que puede desencadenar diferentes respuestas celulares propagando así tanto el proceso inflamatorio como la trombosis (47,48).

1.4. PAPEL DE LOS NEURÓFILOS EN LA INMUNOTROMBOSIS

Las plaquetas tienen un papel crucial en los procesos trombóticos, no obstante, aunque las plaquetas pueden realizar algunas de sus funciones individualmente, se ha descrito que sus interacciones con otras células vasculares son esenciales para muchas de sus funciones (25,26,47,49). En este contexto, el papel de los neutrófilos en la trombosis ha adquirido especial importancia en los últimos años. Si bien, la presencia de neutrófilos en los trombos se ha descrito desde hace años, los mecanismos por los que estos leucocitos participan en el proceso de trombosis no han sido completamente caracterizados (50,51). Debido a que los neutrófilos son clave en la inmunidad innata y en la inflamación, y también debido a su capacidad de interactuar con otras células vasculares, pueden constituir un nexo entre la inflamación y el inicio de la formación del trombo. En este sentido, los neutrófilos son células secretoras que liberan una gran cantidad de mediadores solubles y otras estructuras celulares complejas - como las vesículas extracelulares y las *neutrophil extracellular traps* (NETs) - que pueden intervenir en la activación de otras células vasculares - como las plaquetas - y, por tanto, desencadenar el proceso de inmunotrombosis (47).

1.4.1. SECRETOMA Y VESÍCULAS EXTRACELULARES

Los neutrófilos son células secretoras que contienen una gran variedad de gránulos formados secuencialmente durante la diferenciación de la célula mieloide (52,53). Generalmente hay tres tipos de gránulos reconocidos que difieren entre sí en su contenido, función y en las señales necesarias para activar su secreción que son: gránulos primarios o azurófilos, gránulos secundarios o específicos y gránulos terciarios ricos en gelatinasa (54,55). El contenido de estos gránulos (**Figura 7**) es importante para entender el papel que pueden tener los neutrófilos en la inducción de los eventos trombóticos, ya que alguno de los componentes liberados por los gránulos puede inducir la activación plaquetaria y/o la activación de la cascada de coagulación (56-58).

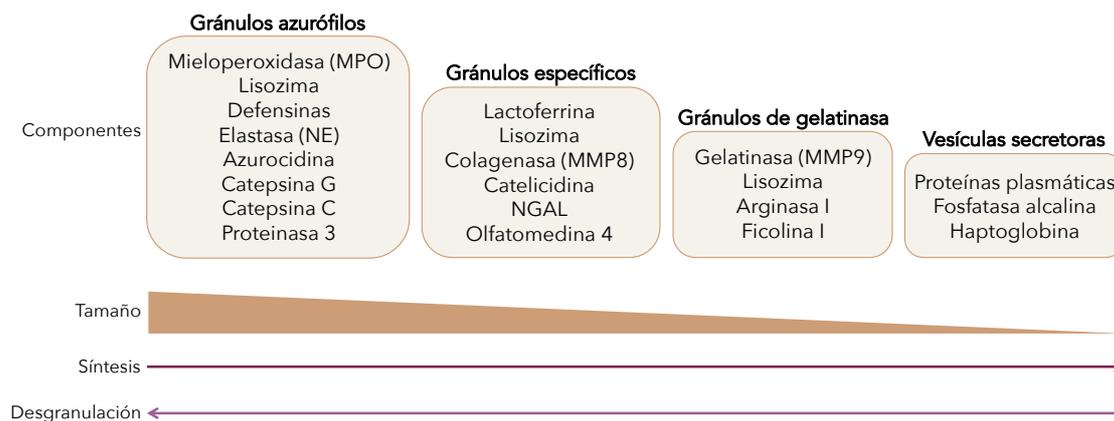


Figura 7. Tipos, componentes, orden de síntesis y orden de desgranulación de los gránulos de los neutrófilos. El sentido de las flechas representa el orden en el que se produce tanto la desgranulación como la síntesis de los gránulos de los neutrófilos. De forma que los gránulos que se forman primero son los gránulos azurófilos, posteriormente los gránulos específicos, a continuación, los de gelatinasa, y, por último, las vesículas secretoras. En cuanto a la desgranulación el orden sería el inverso: vesículas secretoras, gránulos de gelatinasa, gránulos específicos, y finalmente, los gránulos azurófilos. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos.

Adicionalmente, la liberación de estos gránulos puede estar acompañada de la liberación de vesículas extracelulares (47). Estas vesículas son cruciales en la comunicación entre células adyacentes y distantes, ya que sirven como vehículos de intercambio de información y material biológico entre células (59). Estas vesículas extracelulares están formadas por una bicapa lipídica, por proteínas tanto de la membrana como del citoplasma de la célula de la que provienen, por material nuclear y por ARN no codificante (60,61). El contenido y funciones de las vesículas extracelulares es más diverso y dinámico que el de otros gránulos, ya que varía considerablemente dependiendo del estímulo que induce su liberación (47,52).

Actualmente, se conocen diversos mecanismos por los que las vesículas extracelulares pueden inducir la trombosis (**Figura 8**) (47): la presencia de fosfatidilserina en la superficie de las vesículas, que puede causar la activación de las plaquetas y la formación de coágulos (**Figura 8B**) (62); la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las vesículas, como Mac-1 que puede interactuar con P-selectina en plaquetas e inducir así la activación de las mismas (**Figura 8C**) (63); la presencia de mieloperoxidasa (MPO) que induce la disfunción endotelial

promoviendo así la adhesión y activación de las plaquetas (**Figura 8D**) (61); además, pueden intervenir en la activación de la cascada de coagulación, tanto por la vía intrínseca - por la presencia de polifosfatos - como por la vía extrínseca - por la presencia del factor tisular (**Figura 8E**) (64-66). Además, los neutrófilos también pueden activar a las plaquetas, mediante la liberación de diferentes mediadores solubles (**Figura 8A**) (47).

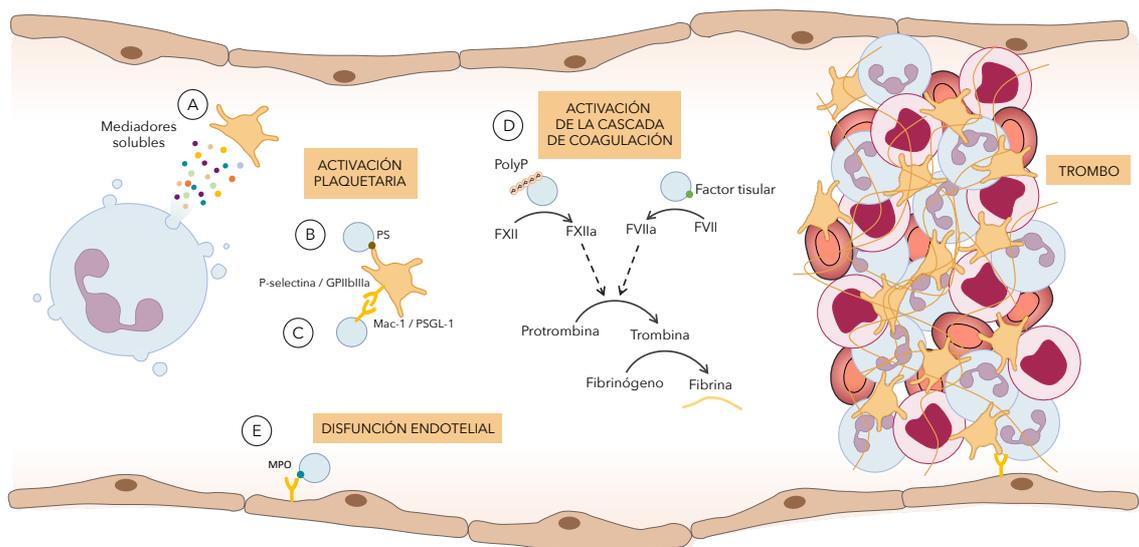


Figura 8. Mecanismos por los que el secretoma de neutrófilos puede inducir la formación de trombos. El secretoma de neutrófilos puede inducir la activación plaquetaria a través de los mediadores solubles liberados (A); por la presencia en las vesículas extracelulares de fosfatidilserina (PS) (B) o de moléculas de adhesión como el antígeno-1 de macrófagos (Mac-1) y el ligando 1 de P-selectina (PSGL-1) (C); por la activación de la cascada de coagulación (D), tanto por la vía intrínseca por la presencia de polifosfatos (PolyP) en la superficie de las vesículas extracelulares, como por la vía extrínseca por la presencia del factor tisular en las vesículas extracelulares; y por la disfunción endotelial (E) debido a la presencia de mieloperoxidasa (MPO) en las vesículas extracelulares. Todos estos procesos pueden desencadenar eventualmente la formación del trombo.

Por tanto, el secretoma de los neutrófilos contiene una gran cantidad de proteínas, que se liberan no solo ante estímulos proinflamatorios o protrombóticos, sino también en condiciones basales y/o no patológicas (47). Esto hace evidente que hay muchas vías por las que los neutrófilos pueden inducir la formación de trombos, y es probable que no estén todas descritas actualmente.

1.4.2. NETs

Otro de los mecanismos por los que los neutrófilos pueden ser un nexo entre la inflamación y la trombosis es a través de la liberación de NETs (47,67). Las NETs fueron descritas por primera vez en 2004, como un nuevo mecanismo de defensa de los neutrófilos, actuando como una red que impide la diseminación de patógenos y favorece su eliminación (68). Las NETs son un entramado extracelular de filamentos descondensados de ADN, que puede provenir tanto del núcleo como de la mitocondria, que están asociados a histonas y a diferentes proteínas - como elastasa de neutrófilos (NE), MPO, catepsina G, calprotectina, gelatinasa, peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4), caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), defensinas y actina (**Figura 9**) (47,69,70). Sin embargo, la composición de las NETs varía en función del estímulo que las induce (47).

Se han descrito dos mecanismos por los que se pueden liberar las NETs. El primero se conoce como NETosis, ocurre a través del proceso de muerte celular, y el otro se conoce como NETosis no lítica, que consiste en una liberación más rápida y que no implica la muerte celular (71-73). La NETosis puede estar inducida por una gran variedad de estímulos que actúan a través de diferentes receptores en los neutrófilos (**Figura 9**) (47). El primer inductor de la liberación de NETs que se describió fue el forbol miristato acetato (PMA) (68).

Uno de los primeros eventos intracelulares que inician el fenómeno de NETosis es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a través de la vía de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o a través de las mitocondrias. Las ROS inducen la activación y traslocación al núcleo de PAD4, que citrulina a las histonas unidas al ADN y contribuye a la descondensación de la cromatina. Por otro lado, las ROS inducen la activación de la MPO y subsecuentemente de la NE que degradan las histonas. Tanto la citrulinación como la degradación de las histonas inducen la descondensación de la cromatina. Además, la gasdemina D, activada por NE, degrada la envoltura nuclear, liberando así la cromatina en el citoplasma donde

se une con diferentes componentes del citoplasma y de los gránulos, y también permeabiliza la membrana plasmática, permitiendo que las NETs puedan expandirse hacia el espacio extracelular (**Figura 9**) (71,74-80).

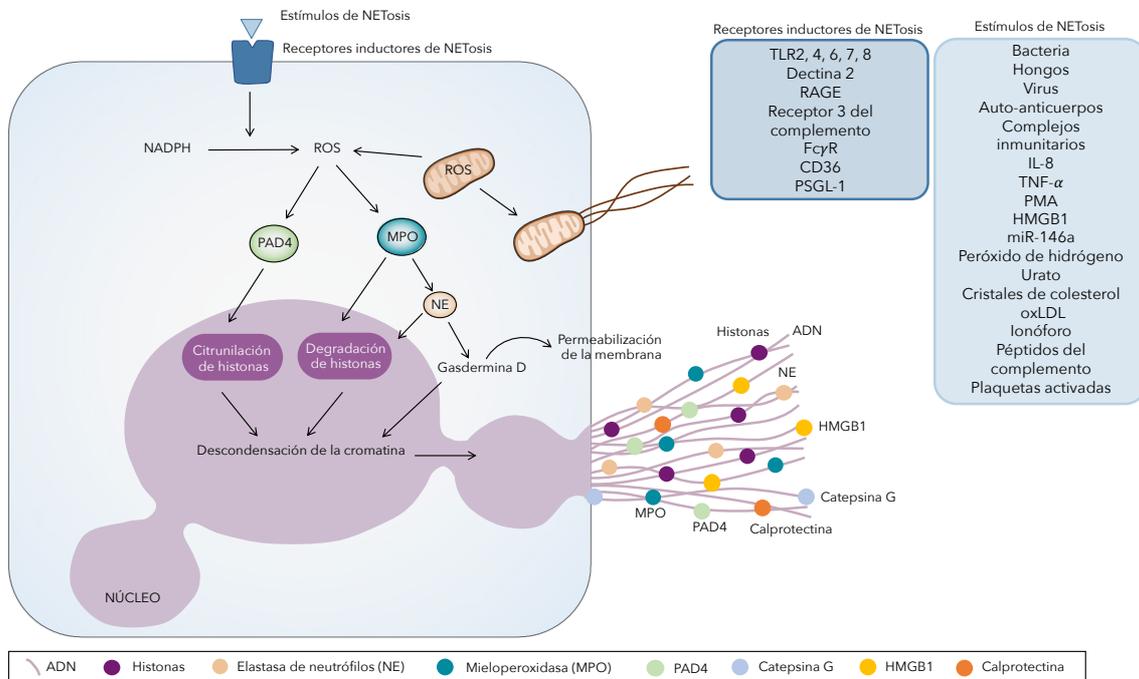


Figura 9. Mecanismos responsables de la liberación de las NETs. La unión de diferentes estímulos de la NETosis con sus respectivos receptores en los neutrófilos induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias o a través de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Las ROS inducen la activación de peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4) que citrulina las histonas unidas al ADN; y de la mieloperoxidasa (MPO) y subsecuentemente de la elastasa de neutrófilos (NE) que degradan las histonas. Tanto la citrulinación como la degradación de las histonas inducen la descondensación de la cromatina y la gasdemina D, activada por NE, degrada la membrana nuclear y permeabiliza la membrana plasmática favoreciendo la externalización de la cromatina descondensada con diferentes proteínas unidas. HMGB1: caja 1 del grupo de alta movilidad; TLR: *Toll-like receptor*; RAGE: receptor de productos terminales de glicación avanzada; PSGL-1: el ligando 1 de P-selectina; IL: interleucina; TNF-α: factor de necrosis tumoral α; PMA: forbol miristato acetato; oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada.

En cuanto al papel de las NETs en la trombosis, se ha descrito que estas son tóxicas para las células endoteliales. Las NETs causan la disfunción endotelial, activando así el endotelio, que a su vez puede inducir la liberación de las NETs, desencadenando una retroalimentación que provoca más daños (81,82). Sin embargo, el papel de las NETs en las múltiples facetas de la trombosis se atribuye principalmente a las interacciones de los neutrófilos y las NETs con las plaquetas (67). Por un lado, el entramado formado por las NETs puede capturar plaquetas, induciendo así su

activación y agregación, lo que desencadena la formación de grandes agregados que pueden obstruir los vasos (67). También se ha descrito que las NETs promueven la formación de trombina al proporcionar una estructura estable para moléculas procoagulantes, como vWF, fibronectina, fibrinógeno y factor tisular (83,84). Por otro lado, los diferentes componentes de las NETs pueden inducir la expresión génica de diferentes factores de coagulación y la activación plaquetaria (47).

Así, las NETs tienen un papel importante en la activación de las plaquetas y los procesos trombóticos, pero además las plaquetas activadas también pueden inducir la liberación de las NETs - cobrando todavía más importancia las interacciones plaqueta-neutrófilo -, generando así un bucle de retroalimentación que puede conducir a la formación patológica de trombos (85,86).

1.5. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA: ATP Y RECEPTORES PURINÉRGICOS

Durante los procesos inflamatorios y trombóticos las células vasculares liberan al medio extracelular adenosina y **ATP** (87,88). La adenosina ejerce acciones anti-inflamatorias, mientras que el ATP participa en el desarrollo de la inflamación ya que modula la producción y liberación de citocinas, la activación, la migración y la proliferación en las células inmunes; por tanto, se considera una molécula de comunicación entre diferentes células que es capaz de advertir de algún peligro en el organismo (considerándose un DAMP) (87-89). En este sentido, en tejidos sanos, el ATP se encuentra casi exclusivamente en el interior de las células (~mM), mientras que a nivel extracelular las concentraciones que se pueden encontrar son muy bajas (~nM). Por el contrario, en respuesta a una lesión tisular, las células inmunitarias liberan ATP llegando a alcanzar concentraciones altas (~100 µM) en el medio extracelular (90,91).

La señalización purinérgica hace referencia al papel del ATP como molécula de señalización extracelular (92). En este sentido, se han descrito diferentes familias de

receptores para la adenosina (P1) y para ATP y ADP (P2). La familia de los P1 está formada por 4 receptores acoplados a la proteína G (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) que actúan por vía de la adenilato ciclasa. En la familia de los P2 se han descrito 7 receptores P2X ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_3$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_6$, $P2X_7$), y 8 P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) (**Figura 10**) (89,92).

Los receptores P2X están constituidos por trímeros que forman canales iónicos (93). El canal iónico formado por estos trímeros puede ser tanto homotrimérico como heterotrimérico (93,94). Por ejemplo, están ampliamente descritos los heterotrímeros formados por los receptores $P2X_2$ y $P2X_3$ que forman los receptores $P2X_{2/3}$, además el $P2X_6$ no forma homotrímeros funcionales, y, por el contrario, el $P2X_7$ no forma heterotrímeros (95). El ligando de los receptores P2X es el ATP y cuando este se une a los receptores produce un cambio conformacional del canal iónico induciendo su apertura y con ello la entrada a la célula de cationes (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+}) que producen una despolarización que supone el inicio de la señalización purinérgica (**Figura 10**) (95,96). Estos receptores se diferencian entre sí por su afinidad con su ligando (ATP), la cinética de activación/inactivación, la permeabilidad al Ca^{2+} y algunas características funcionales (95,96).

Por otro lado, los P2Y son receptores acoplados a la proteína G, y en este caso los ligandos pueden ser tanto ATP como ADP (89,90,93,96). Cuando uno de estos ligandos se une a los receptores, se produce un cambio conformacional que en este caso activa a la proteína G, y esto inicia la señalización purinérgica (89,90,93). Este grupo de receptores además se divide en dos subgrupos: P2Y acoplados a la proteína G_q que activan la fosfolipasa C ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$), y los P2Y acoplados a la proteína G_i que inhiben la adenilato ciclasa y regulan canales iónicos ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) (**Figura 10**) (89,93).

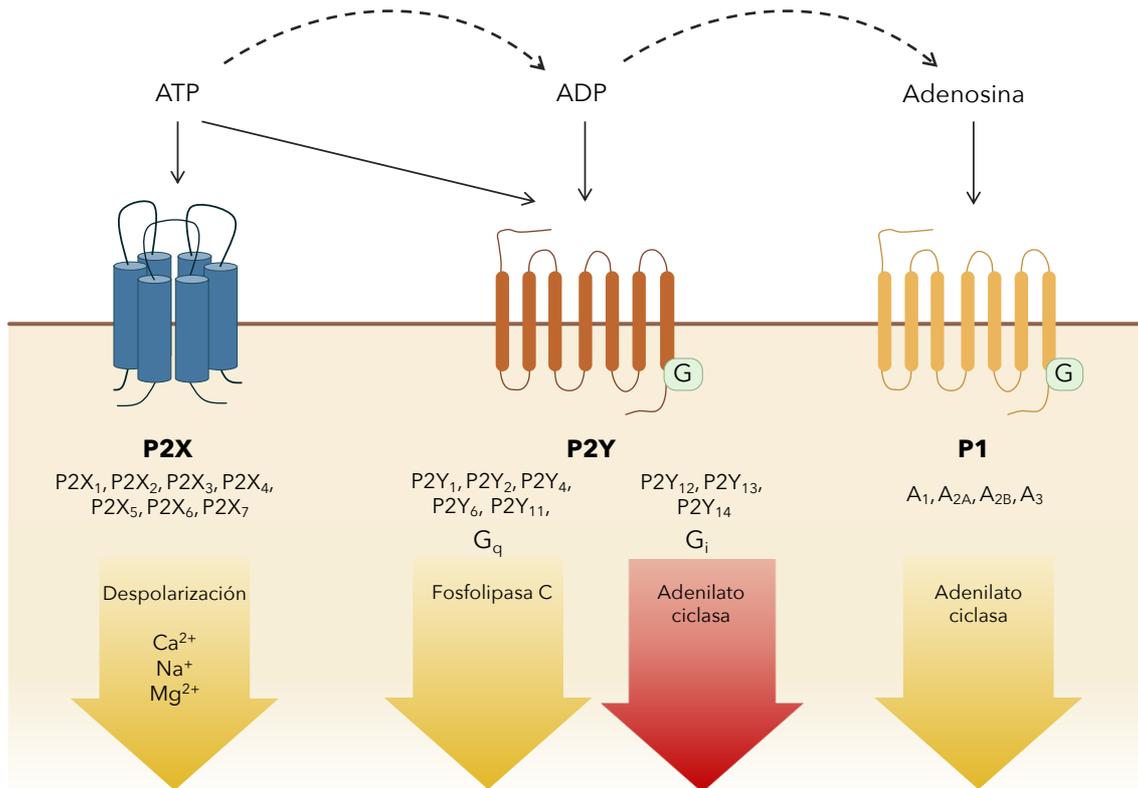


Figura 10. Receptores responsables de la señalización purinérgica. Los receptores P2X son canales iónicos activados por adenosina trifosfato (ATP), que inducen la despolarización de la membrana por movilización de diferentes cationes. Los receptores P2Y, activados por ATP o por adenosina difosfato (ADP), están acoplados a la proteína G, que puede activar la fosfolipasa C o inhibir la adenilato ciclasa. Los receptores P1, son receptores acoplados a la proteína G, activados por la adenosina, que activan la adenilato ciclasa.

1.5.1. RECEPTOR P2X₇

El receptor P2X₇ ha sido el último receptor caracterizado de la familia de los P2X, aunque originalmente se nombró como P2Z puesto que presenta una estructura única y requiere para su activación concentraciones de ATP inusualmente altas (con una concentración efectiva 50 de ~500 μM) (97) comparado con el resto de los receptores de esta familia (98). De hecho, las concentraciones de ATP que precisa no se encuentran en condiciones fisiológicas e incluso son difíciles de alcanzar en procesos patológicos (99). Esto sugiere la existencia de moduladores alostéricos¹ que

¹ Son ligandos que se unen a un sitio del receptor que está espacialmente separado del sitio de unión ortostérico, y que es capaz de modular la afinidad de unión, la potencia o la eficacia de los ligandos ortostéricos.

hagan al receptor más sensible a concentraciones bajas de ATP. En este sentido, se han descrito un importante número de moduladores alostéricos endógenos tanto positivos (nicotinamida adenina dinucleótido [NAD], fosfoinosítidos, lisofosfatidilcolina, lipopolisacáridos [LPS]) como negativos (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), así como otras moléculas exógenas (99).

Los receptores P2X₇ requieren para su activación y apertura del canal iónico la unión de tres moléculas de ATP. Este produce la entrada de los cationes Na^+ y Ca^{2+} al interior de la célula y la salida de K^+ , promoviendo la despolarización que activa la cascada de señalización (**Figura 11**) (99,100). La activación prolongada de este receptor (>10 s) resulta en la formación de un macroporo no selectivo, que permite el paso de moléculas de alto peso molecular (> 900 Da), lo que puede conducir a la muerte celular (99,101,102). Por otro lado, el aumento de Ca^{2+} intracelular induce la activación de NADPH oxidasa, fosfolipasas, proteína quinasa B y el inflamasoma constituido por el receptor 3 que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, repeticiones ricas en leucina y el dominio de pirina (NLRP3) (99,101-103). La NADPH oxidasa genera la producción de ROS que son moléculas de señalización importantes en la respuesta inmunitaria, eliminación de patógenos, disfunción endotelial, y también tienen efectos deletéreos sobre proteínas, lípidos y ADN (104). La activación del receptor P2X₇ también induce la activación de NF- κ B, que es el factor de transcripción responsable de la producción de pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-caspasa-1, entre otros (105). Por otro lado, tanto la producción de ROS como el aumento de Ca^{2+} intracelular y la disminución de K^+ inducen el ensamblaje y la activación del inflamasoma NLRP3. La activación de este complejo permite el reclutamiento y la activación de la caspasa-1, que a su vez provoca la maduración de IL-1 β , IL-18 y gasdermina D (103). Por último, la gasdermina D forma unos poros en la membrana que permite la liberación de las interleucinas producidas, y que además están relacionados con procesos de piroptosis², apoptosis y muerte celular (**Figura 11**) (103). Este receptor se expresa predominantemente en neuronas, células gliales,

² Muerte celular programada asociada a la inflamación y caracterizada por la formación de poros en la membrana.

células musculares, células epiteliales, células endoteliales y especialmente en células inmunitarias (linfocitos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas, eosinófilos y mastocitos) (99,106).

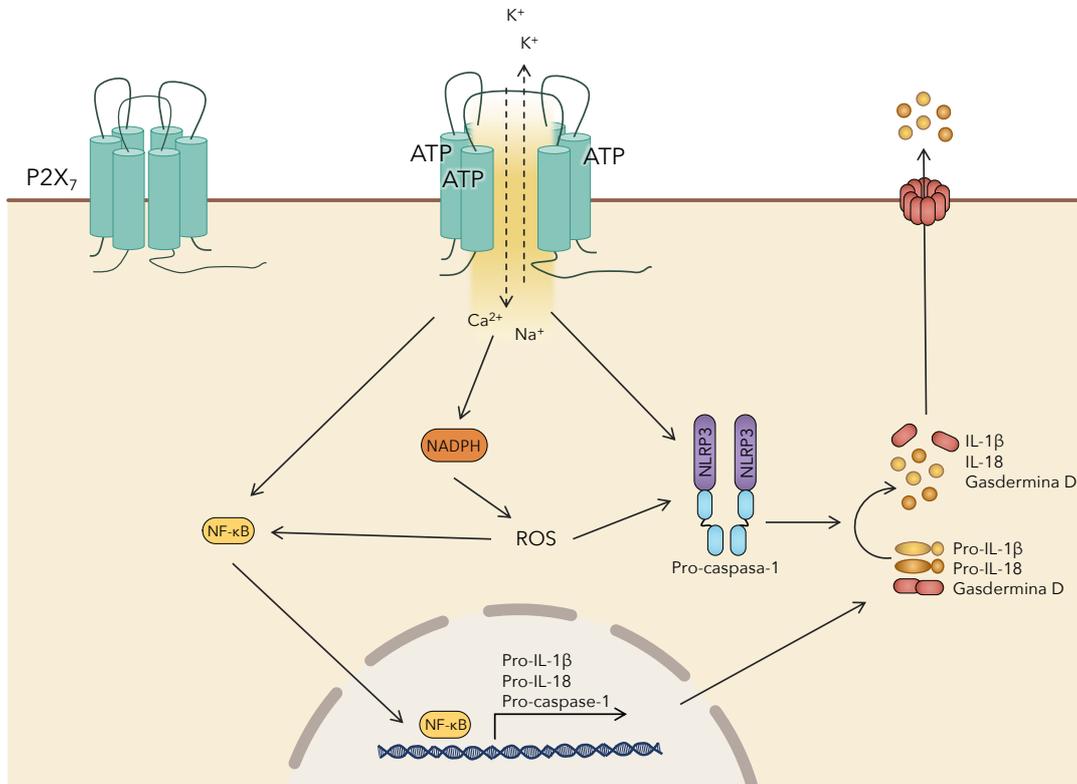


Figura 11. Mecanismos post-activación del receptor P2X₇. Se requieren tres moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para inducir la activación del receptor P2X₇ que supone la apertura del canal iónico, con el subsiguiente influjo de Ca²⁺ y Na⁺ y eflujo de K⁺. Esto supone la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), y a su vez se induce la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF-κB) y el inflamasoma NLRP3, activando la transcripción y maduración de la interleucina (IL)-1β, IL-18 y gasdermina D.

1.6. PAPEL DE LOX-1

Otro de los sistemas implicados en la regulación del sistema cardiovascular son los receptores SR (por sus siglas en inglés *scavenger receptors*) que están asociados con el inicio y la progresión de la aterosclerosis (107). La aterosclerosis es una enfermedad vascular de inflamación crónica caracterizada por la acumulación de lípidos en la pared arterial, manifestándose a nivel macroscópico como una placa aterosclerótica (108,109). Además, la ruptura de esta placa puede conducir a la oclusión trombótica de los vasos (108,109).

Esta acumulación de lípidos se debe fundamentalmente a depósitos de la lipoproteína de baja densidad (LDL), que debido a los radicales libres puede ser modificada dando lugar a la LDL oxidada (oxLDL) (107-110). Esta última, puede inducir la respuesta inmunitaria actuando sobre diferentes tipos celulares, aumentando la expresión de moléculas de adhesión y factores quimiotácticos, y, por tanto, promoviendo la adhesión de leucocitos y plaquetas (107,110).

Los receptores SR interaccionan con oxLDL y promueven su internalización y degradación proteolítica (107,111). El receptor 1 de oxLDL (LOX-1) es uno de los receptores SR capaz de internalizar la oxLDL que se acumula en las placas ateroscleróticas (110,112). Este receptor se expresa en neutrófilos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales y células musculares (107,113). Cabe destacar que la expresión basal de LOX-1 es baja, no obstante, esta puede ser inducida por diferentes estímulos pro-inflamatorios y pro-aterogénicos (ROS, IL-1, LPS, TNF- α , interferón γ , y el propio oxLDL) (114).

Por otro lado, además de oxLDL, LOX-1 puede unirse a múltiples ligandos (**Tabla 2**) (115). La interacción de LOX-1 con sus respectivos ligandos puede inducir diferentes efectos biológicos (114). En este sentido, se ha descrito que la unión de oxLDL al receptor puede activar la ruta del NF- κ B, la producción de ROS y la activación de NLRP3 (**Figura 12**) (114). Asimismo, LOX-1 produce disfunción endotelial, puede

participar como molécula de adhesión tanto en células endoteliales, como en leucocitos y plaquetas, y contribuye a la agregación y a la activación de integrinas (GPIIb/IIIa) plaquetarias (116,117). De hecho, la presencia de LOX-1 en plaquetas activadas sugiere que este receptor podría tener un papel importante en la formación de trombos (116,117).

Tabla 2. Ligandos del receptor LOX-1.

Ligandos de LOX-1	Moléculas	
<i>Lipoproteínas</i>	LDL oxidada	LDL carbamilada
	LDL acetilada	HDL hiperclorada
	LDL electronegativa	
<i>Células</i>	Plaquetas activadas	Células apoptóticas
	Leucocitos	Bacterias
<i>Proteínas</i>	HSP60	CRP
	HSP70	Fibronectina
<i>Fosfolípidos</i>	Fosfatidilserina	Ácido fosfatídico
	Fosfatidilinositol	Cardiolipina
	Fosfatidilglicerol	
<i>Polianiones</i>	Heparina	Ácido poliinosínico
	Sulfato de dextrano	
<i>Otros</i>	AGE	

LOX-1: receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; HSP: proteína de choque térmico; CRP: proteína C reactiva; AGE: Productos terminales de glicación avanzada.

Como muchos receptores de superficie con un solo dominio transmembrana, LOX-1 puede sufrir una escisión proteolítica postraducciona, que ocurre en la región del dominio extracelular, liberando un polipéptido de 187 residuos conocido como LOX-1 soluble (sLOX-1) (116,118). Citocinas inflamatorias, como IL-18, la proteína C reactiva (CRP) y TNF- α , estimulan la liberación de esta forma soluble del receptor, mediada por la escisión proteolítica que llevan a cabo diferentes metaloproteasas como las desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM) (118). En este sentido, las ADAM10 y ADAM17 se han postulado como las responsables de la liberación de sLOX-1 (**Figura 12**) (118). La actividad proteolítica de las ADAMs puede ser tanto constitutiva como inducible, y es dependiente de los niveles de Ca²⁺ intracelulares, de la composición lipídica de la membrana y de receptores acoplados a la proteína

G (119). Además, la liberación de sLOX-1 mediada por ADAM17 es dependiente de la generación de ROS, por la NADPH oxidasa (118,119).

Los niveles en plasma de sLOX-1 pueden reflejar un aumento de la expresión del receptor en la membrana celular y servir como biomarcador de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, el papel funcional de sLOX-1 está por esclarecer (118).

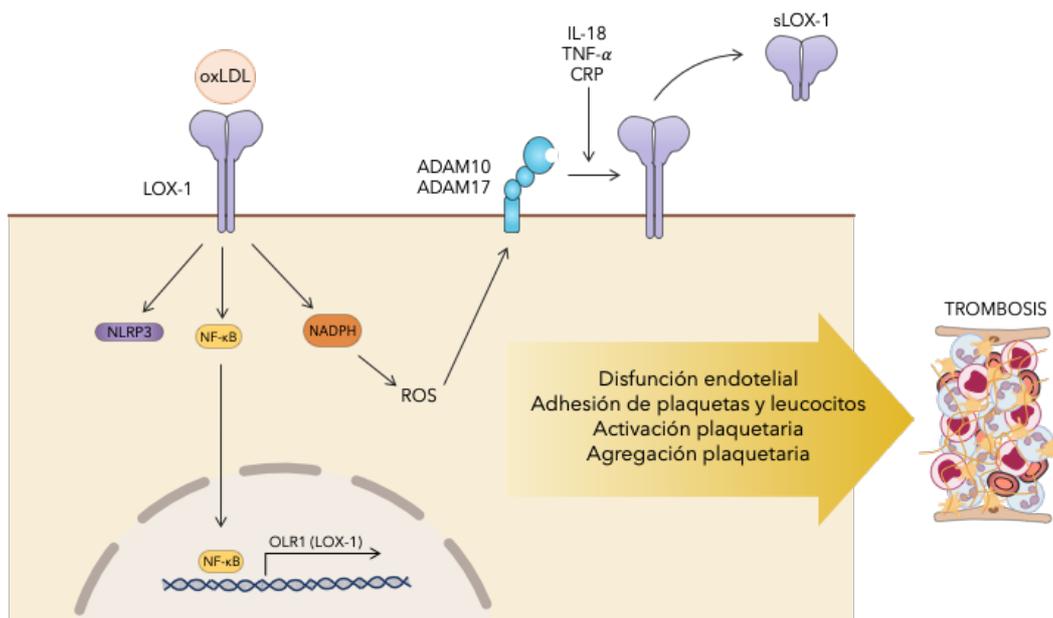


Figura 12. Mecanismos post-activación del receptor LOX-1. La unión de la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) u otros ligandos del receptor inducen la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), el inflamasoma NLRP3 y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Todo esto desencadena la disfunción endotelial, la adhesión de leucocitos y plaquetas, y la activación y agregación de las plaquetas, que eventualmente pueden conducir a la formación del trombo. Las ROS a su vez pueden inducir, junto con la presencia de la interleucina (IL-)18, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proteína C reactiva (CRP), la activación de la desintegrina y metaloproteinasas (ADAM)10 y ADAM17 favoreciendo la escisión proteolítica del receptor, liberando así la forma soluble de LOX-1 (sLOX-1).

2. VIH Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

En 1981 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos publicó un informe con 5 casos de pacientes, de diferentes hospitales de California, que presentaban neumonía por *Pneumocystis* (120-123). Estos pacientes tenían un patrón común de déficit inmunológico, siendo significativa la disminución en el número de linfocitos T CD4⁺ (120,123-125). En un primer momento, se asoció este síndrome a determinados comportamientos de hombres homosexuales generando así un gran estigma social (120,123). Sin embargo, esta teoría se terminó descartando debido a que esta patología también se observó indistintamente en otros grupos poblacionales (120). Más adelante, diferentes investigadores concluyeron que la agrupación de casos con esta patología y su presencia en diferentes grupos de riesgo solo podía explicarse si estaba causada por un microorganismo infeccioso transmitido por contacto íntimo, por ejemplo, a través de prácticas sexuales o por la sangre (120,126). En 1982, se define la enfermedad que padecen estos pacientes como Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), detectándose casos en América, Europa, África, Oceanía y Asia (127). En los años siguientes, en 1983 y 1984, los grupos liderados por Luc Montagnier y Robert C. Gallo, descubrieron e identificaron el agente causante del SIDA al que denominan virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (128-131). Este virus comparte similitudes con el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), llegando a compartir entre un 82-89% de homología en las secuencias de sus genomas, por lo que una de las teorías apunta a que el VIH surgió como una zoonosis, probablemente alrededor de 1920 en la República Democrática del Congo, debido a la caza y al manejo de la sangre de estos simios (**Figura 13**) (127,132,133).

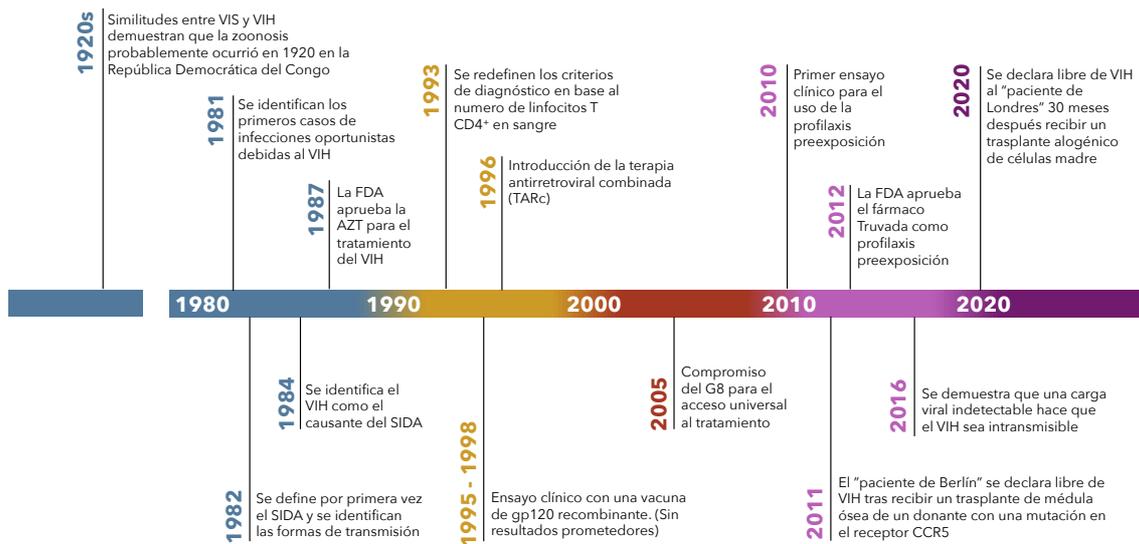


Figura 13. Línea temporal de la historia de la infección por VIH. Se presentan los acontecimientos más importantes desde que se produjo la zoonosis (1920), la identificación de los primeros casos (1981), y las estrategias terapéuticas hasta 2020 cuando se declara libre de VIH al "paciente de Londres".

2.1. VIROLOGIA MOLECULAR: CLASIFICACIÓN, GENOMA Y MORFOLOGÍA

El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Como todo retrovirus, el genoma del VIH está codificado por ARN, que debe transcribirse inversamente a ADN viral para infectar nuevas células. El VIH tiene forma esférica con un diámetro de aproximadamente 100 nm. La partícula madura consta de la envoltura, el núcleo y la matriz, que es la región que se encuentra entre el núcleo y la envoltura (**Figura 14**). La envoltura es una bicapa lipídica compuesta por trímeros de la proteína Env. Esta proteína a su vez está formada por la proteína de superficie (SU) gp120, anclada a la membrana por la proteína transmembrana (TM) gp41. La envoltura cubre la cápside icosaédrica que está formada por la proteína de la matriz (MA, p17), y a su vez esta recubre la cápside canónica formada por la proteína de la cápside interna (CA, p24). En el interior de esta cápside canónica se encuentra el genoma viral estabilizado formando un complejo ribonucleoproteico con proteínas de la nucleocápside (NC, p7), también se encuentran en esta cápside algunas proteínas virales como la transcriptasa inversa, ARNasa H y la integrasa (**Figura 14**) (133-135). El genoma viral está compuesto por dos copias idénticas de ARN, que debe ser transcrito a ADN

bicatenario mediante la transcripción inversa e integrarse en el genoma de la célula para formar el ADN proviral (133-135).

Actualmente, hay descritos dos tipos de VIH identificados como VIH-1 y VIH-2. El VIH-1, la variante que se descubrió originalmente como la causante del SIDA, es la más virulenta e infecciosa y la causante de la mayoría de las infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 es menos contagioso y se encuentra casi exclusivamente en África occidental (133-135).

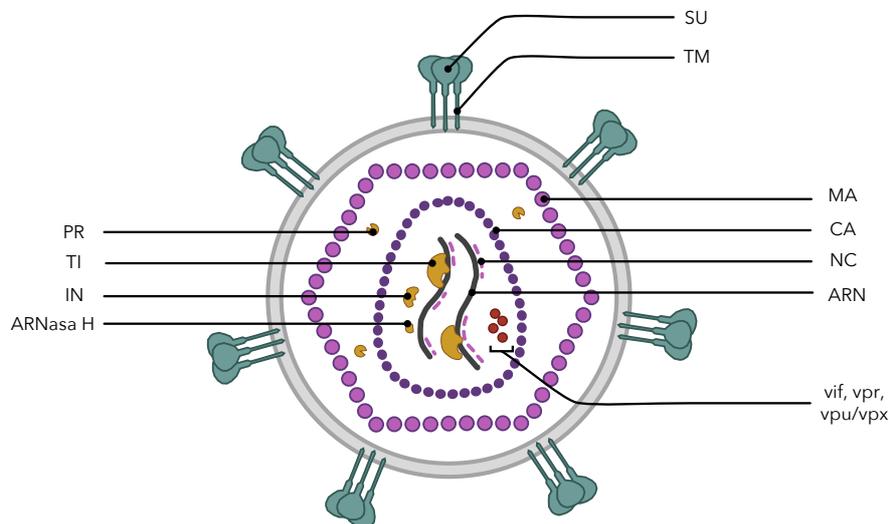


Figura 14. Composición del virión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El virión del VIH está formado por la envoltura, que es una bicapa lipídica, donde se encuentran las proteínas de superficie (SU) y transmembrana (TM). La envoltura cubre la cápside icosaédrica formada por la proteína de la matriz (MA), que a su vez cubre la cápside interna formada por la proteína de la cápside interna (CA). En el interior de esta cápside se encuentra el genoma del virus, formado por dos copias de ARN que forman un complejo ribonucleoproteico con la proteína de la nucleocápside (NC), y otras proteínas virales como la transcriptasa inversa, ARNasa H, la integrasa, y las proteínas reguladoras.

2.2. CICLO BIOLÓGICO DEL VIH

El VIH puede entrar en el organismo a través de la piel, de membranas mucosas intactas, mucosas lesionadas y por vía parenteral (133). El VIH infecta células CD4⁺ como linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y astrocitos (133,135).

Las fases iniciales de la infección se caracterizan por complejas interacciones proteína-proteína. La gp120 presente en la superficie del VIH se une al receptor CD4 de la célula hospedadora (133,135). Tras la **fijación**, ambas proteínas sufren modificaciones conformacionales, que permiten que en la gp120 queden accesibles nuevos dominios permitiendo su interacción con un co-receptor en la superficie celular, como el receptor de quimiocinas C-C 5 (CCR5) o el receptor de quimiocinas C-X-C 4 (CXCR4). La unión de la gp120 al receptor CD4 y a alguno de los co-receptores induce un cambio conformacional adicional en la gp120 y posteriormente en la gp41, permitiendo que el N-terminal de la gp41 situado en la membrana vírica, debido a su alta hidrofobicidad, se inserte en la membrana de la célula diana (133,135). De esta forma se inicia el proceso de **fusión** de la membrana celular con la envoltura viral. Una vez completada la fusión de ambas membranas se produce la translocación de la cápside icosaédrica al citoplasma celular, donde esta es encapsulada por un endosoma, y el cambio de pH que se produce en el interior del mismo provoca la liberación del contenido de la cápside en el citoplasma, liberándose así el ARN y diferentes proteínas virales (133,135). En el siguiente paso, se produce la **transcripción inversa**, mediante la cual el ARN viral se transforma, por la transcriptasa inversa del virus, en una cadena de ADN complementario. Al mismo tiempo que se va produciendo el nuevo ADN se va degradando la cadena de ARN, mediante la enzima ARNasa H, y finalmente a partir de la cadena de ADN se sintetiza el ADN bicatenario, formando el ADN proviral, gracias a la función ADN polimerasa de la transcriptasa inversa (133,135). Este ADN proviral formando un complejo con la integrasa se transporta por los nucleoporos al núcleo celular, donde se produce la **integración** del genoma proviral en el genoma de la célula hospedadora, mediante la integrasa viral (133,135). En este punto, el genoma viral puede replicarse como

parte del genoma de la célula durante la división celular, dando lugar a la fase latente de la infección. Sin embargo, tras la activación de las células infectadas, diferentes factores de transcripción y ARN polimerasas pueden unirse al promotor situado en la región LTR 5' (por sus siglas en inglés *Long terminal repeats*) del genoma proviral dando lugar a la **transcripción y traducción del ADN vírico** (133,135). En esta fase se produce la síntesis del ARN genómico y el ARN mensajero, que dará lugar a las nuevas proteínas virales. Las proteínas obtenidas de la traducción deben ser procesadas por la proteasa viral para su **maduración y ensamblaje** (133,135). A continuación, estas proteínas ya procesadas se ensamblan para encapsular el ARN viral y formar las nuevas cápsides. Finalmente, los nucleoides víricos se aproximan a la membrana celular induciendo la liberación de los nuevos viriones mediante gemación (**Figura 15**) (133,135).

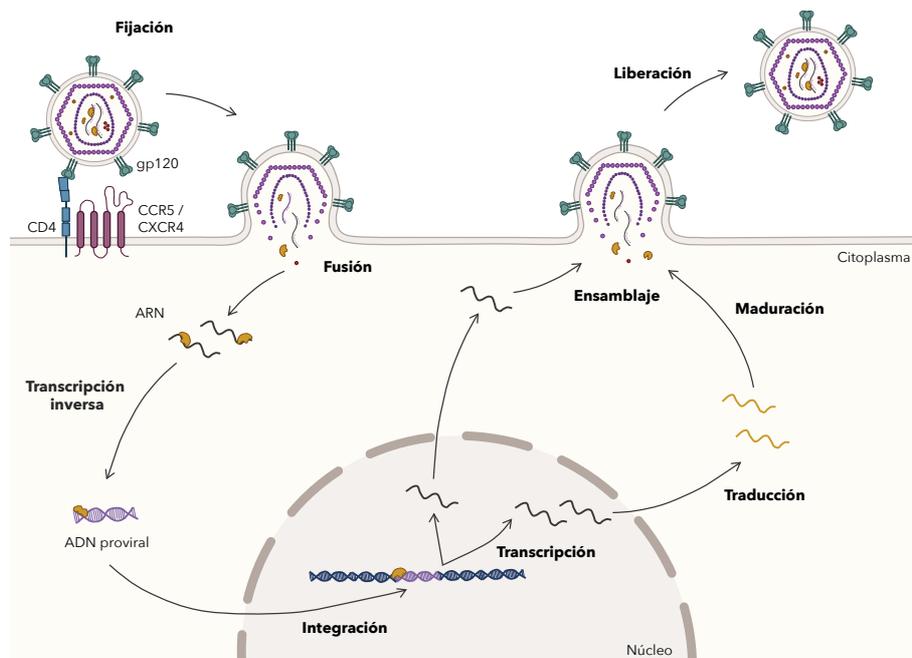


Figura 15. Ciclo infeccioso del VIH. En primer lugar, se produce la fijación del virus a la célula hospedadora (Linfocitos T CD4⁺) mediante la interacción de la glicoproteína 120 (gp120) de superficie del virus con el receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 de las células. Esto genera una serie de cambios conformacionales en las proteínas de la envoltura del virus que desencadena en la fusión de la envoltura del virus con la membrana de la célula. Durante este proceso se libera el ARN y las proteínas del virus en el citoplasma de la célula, donde se produce la transcripción inversa del genoma viral mediante la transcriptasa inversa viral dando lugar al ADN proviral, que se transloca al núcleo celular y mediante la acción de la integrasa se integra en el genoma de la célula. A continuación, se produce la transcripción de ADN viral para producir las nuevas copias de ARN que constituirán los nuevos genomas virales y el ARN mensajero para producir las nuevas proteínas virales. Tras la traducción de las nuevas proteínas virales, estas deben ser procesadas y maduras por la proteasa viral. Cuando las proteínas están procesadas se ensamblan junto con el ARN del genoma del virus para formar los nuevos viriones que se liberan por gemación de la célula hospedadora.

2.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR VIH

Los linfocitos T infectados por el VIH tienen una vida media de 2-4 días, debido a los componentes citotóxicos del VIH, a la lisis provocada por el propio virus, o por la citotoxicidad de los linfocitos T como parte de la respuesta inmunitaria (133,135,136). Además, el descenso gradual que se produce en el número de linfocitos T se debe tanto a la destrucción de estas células por parte de virus, como a la inhibición de la producción de nuevos linfocitos (133,135).

Pasados 10-12 días de la infección, la carga de ARN viral se puede detectar en sangre mediante RT-PCR (> 50 copias/mL) (133,135,137). La viremia plasmática aumenta rápidamente, aunque durante un periodo corto de tiempo, ya que el organismo inicia la respuesta inmune humoral y celular que permite controlar en cierta medida la replicación del virus, apareciendo los primeros anticuerpos específicos frente al VIH (seroconversión) aproximadamente en una media de 22 días (133,135,137). En las semanas siguientes, la viremia disminuye por debajo del límite de detección finalizando así la que se considera la primera fase o **infección aguda (Figura 16)** (133,135,137). Durante esta fase de la infección, la cantidad de linfocitos T CD4⁺ disminuye bruscamente, debido a los altos niveles de viremia (133,135,136). Sin embargo, una vez iniciada la respuesta inmunitaria específica los niveles de carga viral disminuyen y el número de linfocitos T CD4⁺ vuelve a aumentar, aunque a niveles inferiores a los que había previo a la infección, señalando la presencia de efectos patogénicos persistentes asociados al virus (133,135,136).

Semanas después del inicio de la infección aguda, la mayoría de los pacientes infectados entra en una **fase crónica asintomática** asociada generalmente a niveles bajos de viremia, reflejando los efectos de la respuesta inmune innata y adaptativa (133,135,138). No obstante, durante la fase asintomática, el VIH continúa replicándose en el organismo, contrarrestando la respuesta inmunitaria e induciendo un estado de inflamación sistémica crónica (133,135,138). De hecho, la presencia de reservorios en los órganos linfoides, con una baja expresión de antígenos virales

y una alta frecuencia de mutaciones en el genoma del virus, le permite esquivar el sistema inmunitario (133,135). Todo esto genera una disminución lenta, aunque progresiva del número de linfocitos T CD4⁺ y un deterioro del sistema inmunitario. En este punto, el curso de la enfermedad se caracteriza por la destrucción del tejido linfoide, como consecuencia de la replicación viral, y la activación crónica de las células inmunitarias (133,135,136). Esto conlleva a la propagación y replicación del virus por el organismo, que en ausencia de una respuesta inmunitaria adecuada puede llevar a una disminución del número de linfocitos T CD4⁺ hasta niveles < 200 células/μL, que determina el riesgo de padecer infecciones oportunistas y tumores (133,135), produciéndose lo que se conoce como la fase del **SIDA**. Según la información de ONUSIDA, se estima que, sin tratamiento frente a la infección, el tiempo medio de esperanza de vida relacionado con el SIDA es de aproximadamente 11 años (**Figura 16**) (135,139).

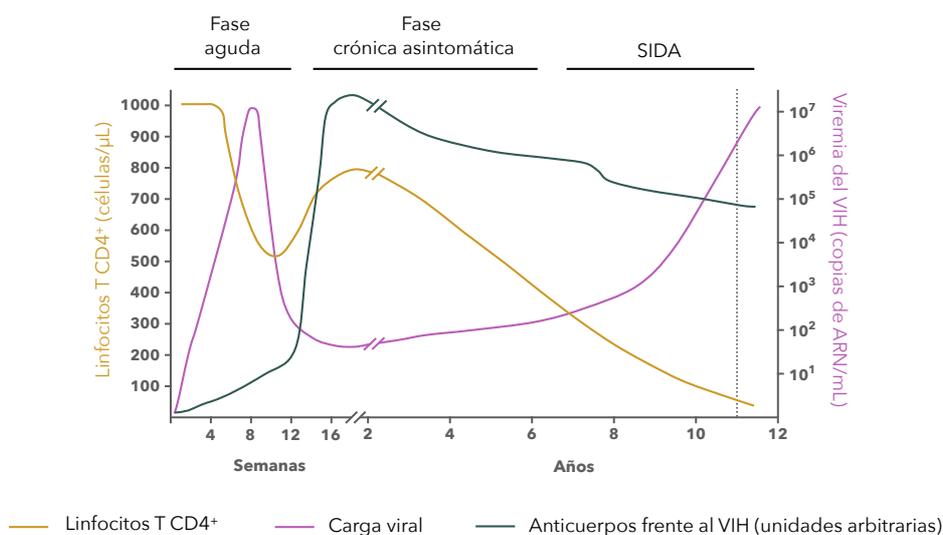


Figura 16. Curso clínico de la infección por VIH. La primera fase de la infección se conoce como fase aguda. En esta fase la viremia (línea rosa) va aumentando rápidamente, empezando a ser detectable (> 50 copias de ARN/mL) a las 2 semanas aproximadamente, y el pico se alcanza alrededor de las 8 semanas. Sin embargo, este aumento de la viremia cesa puesto que el organismo inicia la respuesta inmunitaria dando lugar a la producción de anticuerpos frente al VIH (línea verde). Durante la fase aguda, también se produce una disminución en el número de linfocitos T CD4⁺ (línea amarilla), debido a la replicación y propagación del virus, pero gracias a la activación de la respuesta inmunitaria el número de linfocitos T vuelve a aumentar, aunque a niveles inferiores a los que había previamente. La siguiente fase se conoce como la fase crónica asintomática, asociada a una viremia baja. No obstante, el VIH continúa replicándose, disminuyendo la cantidad de linfocitos T CD4⁺ y de anticuerpos. A continuación, se produce la fase del SIDA, en la que la viremia sigue aumentando y el número de linfocitos T CD4⁺ llega a ser inferior a 200 células/μL, produciéndose el riesgo de sufrir infecciones oportunistas y tumores. Sin tratamiento frente a la infección, el tiempo medio de esperanza de vida es de aproximadamente 11 años (línea vertical discontinua).

2.4. EPIDEMIOLOGÍA

Tras 4 décadas desde que se describió por primera vez el SIDA y se identificó el VIH, se estima que, según los datos de ONUSIDA, actualmente 38,4 millones de personas están infectadas por este virus, y que han fallecido aproximadamente 39 millones debido a esta patología (139,140).

La pandemia generada por el VIH se dio como un conjunto de epidemias que se iban trasladando con el tiempo por diferentes países y grupos poblaciones. Estas se caracterizaron por olas de inaparentes infecciones por el VIH seguidas de epidemias visibles de la enfermedad y muertes debidas a la misma (123). Observando con perspectiva la evolución de esta pandemia, la tendencia en el número de personas que están infectadas con VIH va creciendo, tanto a nivel global como en España (**Figura 17A-B**) (139,140). Sin embargo, las nuevas infecciones que se producen cada año han ido disminuyendo, a nivel global desde el año 2000 y en España desde que comenzó la pandemia, reduciéndose en un 32% y un 3% desde 2010, respectivamente (**Figura 17C-D**) (139,140).

Por otro lado, en cuanto al número de personas fallecidas debido a esta patología se puede observar que desde que se produjo el pico - tanto a nivel global en 2005 como en España en 1996 - ha ido disminuyendo regularmente (**Figura 17E-F**) (139,140). Así, en 2021 se infectaron 1,5 millones de personas y se produjeron 650.000 muertes relacionadas con la infección por el VIH a nivel global, mientras que en España se produjeron 3.900 nuevas infecciones y 1.000 fallecimientos relacionadas con el SIDA (139,140).

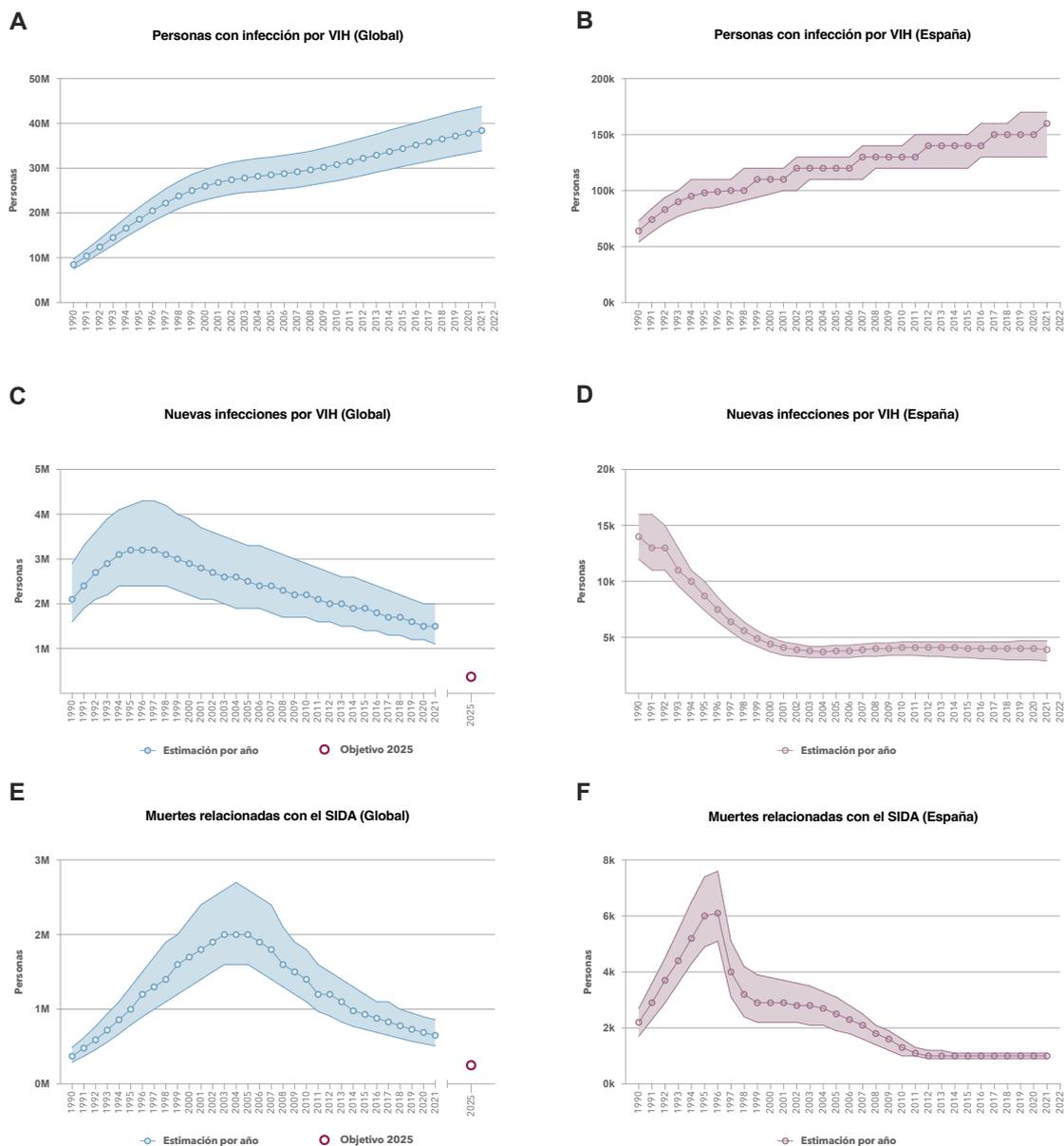


Figura 17. Evolución epidemiológica del VIH. **A.** Personas con infección por VIH a nivel global. **B.** Personas con infección por VIH en España. **C.** Nuevas infecciones por VIH a nivel global. El objetivo que plantea ONUSIDA para el año 2025 es de 370.000 nuevas infecciones. **D.** Nuevas infecciones por VIH en España. **E.** Número de muertes relacionadas con el SIDA a nivel global. El objetivo que plantea ONUSIDA para el año 2025 es de 250.000 fallecimientos. **F.** Número de muertes relacionadas con el SIDA en España. Datos obtenidos de ONUSIDA.

2.5. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Como se puede apreciar en la sección anterior el número de muertes asociadas a la infección por VIH ha disminuido sustancialmente con el paso de los años, a pesar de que el número de personas que vive con VIH ha ido aumentando. Esto es debido a que actualmente esta enfermedad terminal se ha convertido en una enfermedad crónica manejable, gracias al desarrollo de la terapia antirretroviral (141,142). En este sentido, en 1987, se aprueba el primer fármaco para el tratamiento de la infección, la zidovudina (142,143). Sin embargo, el descenso en la letalidad no se alcanzó hasta que en 1996 se introdujo la **terapia antirretroviral combinada**, que consistía en el uso de 3 o más fármacos que actuaran contra al menos dos dianas diferentes del virus (**Figura 13**) (120,141,142).

Esta terapia antirretroviral, actualmente, es eficaz para restaurar la salud del paciente y minimizar la transmisión secundaria del virus, pero no logra la erradicación del VIH (141-143). De hecho, hoy en día la infección por VIH es la segunda causa de muerte, tras los accidentes de tráfico, entre los jóvenes de 25-49 años a nivel global (144). Este hecho hace patente la necesidad de desarrollar una cura efectiva que sea capaz de erradicar completamente el virus de los pacientes.

A pesar de la creciente investigación y la acumulación de evidencias científicas para la cura del VIH, dicha terapia aún no se prevé cercana. En este sentido, la eliminación del virus en el "paciente de Berlín" en 2011, tras recibir un trasplante de médula ósea de un paciente con una mutación en el receptor CCR5, dio esperanza a las comunidades de pacientes. Esta hazaña se repitió en 2020 con el "paciente de Londres", en este caso tras recibir un trasplante alogénico de células madre (**Figura 13**) (145-147).

2.5.1. FÁRMACOS

Actualmente se emplea la terapia antirretroviral combinada para el tratamiento de la infección por VIH, que permite reducir los niveles de viremia hasta hacerlos indetectables (141-143). Los fármacos que forman parte de esta terapia se centran en bloquear o inhibir alguna fase del ciclo biológico del virus (**Figura 15**) (141-143). Así, se distinguen 5 grupos de fármacos:

1. Inhibidores de entrada:

Este grupo de fármacos son los que inhiben la entrada del virus a la célula hospedadora (148). Es el grupo más heterogéneo, ya que los fármacos que pertenecen a este grupo actúan mediante diferentes mecanismos para llevar a cabo la inhibición. A este grupo pertenecen los siguientes fármacos (**Figura 18**):

- Fostemsavir (Rukobia®), es el precursor de temsavir, fármaco que actúa uniéndose a la gp120 de la envoltura del VIH y bloqueando su unión al receptor CD4 de la célula diana, impidiendo así la fijación y posterior entrada del virus en la célula (141).
- Ibalizumab (Trogarzo®), es un anticuerpo monoclonal no inmunosupresor, que se une al segundo dominio extracelular del receptor CD4 impidiendo la interacción del virus con los co-receptores CCR5 o CXCR4 (141).
- Maraviroc (Selzentry®), este fármaco es un antagonista del co-receptor CCR5, por lo tanto, el receptor queda bloqueado y el virus no puede continuar el proceso de entrada tras la fijación a la célula hospedadora (141).
- Enfuvirtida (Fuzeon®), bloquea la gp41 de la envoltura del VIH, imposibilitando el cambio conformacional, e inhibiendo así la fusión de la membrana viral con la membrana celular de forma que el contenido del virus no se puede liberar en la célula diana para continuar con el ciclo de replicación (141).

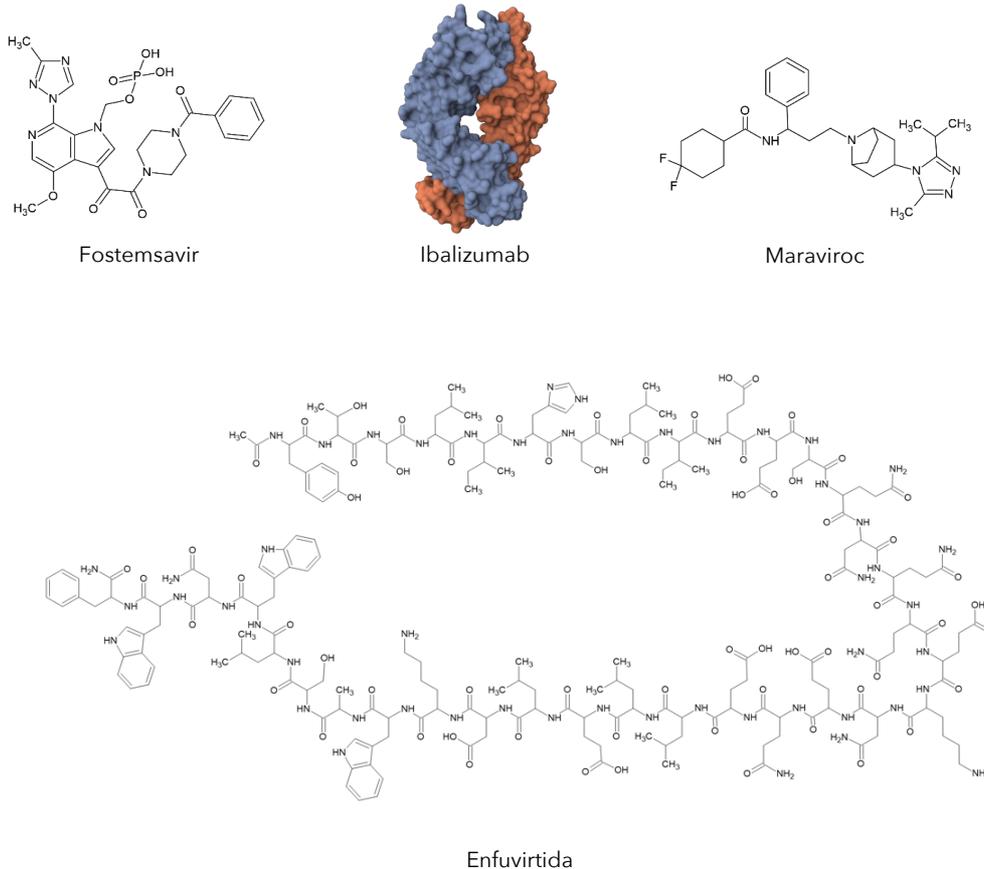


Figura 18. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de entrada. Los fármacos son: fostemsavir, ibalizumab, maraviroc y enfuvirtida.

2. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido/-tido

Este fue el primer grupo de fármacos empleados en el tratamiento de la infección por VIH (142). Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (ITIAN) actúan inhibiendo la transcripción del ARN viral al ADN proviral (141,143). Estos fármacos, análogos o bien de las bases púricas o bien de las bases pirimidínicas presentes en el material genético, tienen dos mecanismos, por un lado inhiben la transcriptasa inversa del virus de forma competitiva al unirse a esta enzima de forma más eficaz que los nucleótidos fisiológicos, y por otro lado finalizando la síntesis de la cadena de ADN proviral, ya que todos ellos difieren respecto a los nucleósidos fisiológicos, en el extremo 3'-OH del anillo de ribosa impidiendo la elongación de la cadena de ADN, ya que una vez incorporados en la cadena no se puede formar el enlace 3'-5' entre el fármaco y el nucleótido entrante (141-143). Además, estos

compuestos son profármacos que deben ser convertidos en sus derivados trifosforilados en el interior de las células antes de incorporarse al ADN proviral (141-143).

Los fármacos aprobados en este grupo son:

– **Análogos de bases pirimidínicas (Figura 19):**

- Zidovudina (Retrovir®)
- Estavudina (Zerit®)
- Zalcitabina (Hivid®)
- Emtricitabina (FTC, Emtriva®)
- Lamivudina (3TC, Epivir®)

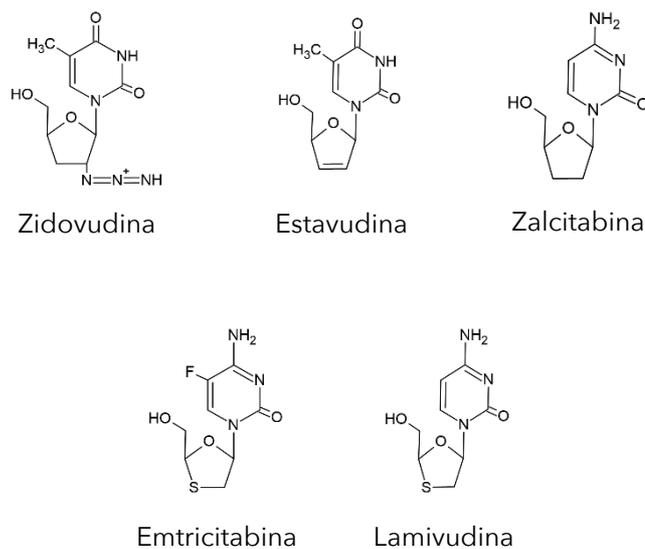
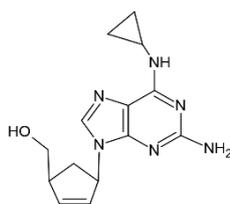


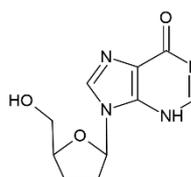
Figura 19. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (análogos de bases pirimidínicas). Los fármacos son: zidovudina, estavudina, zalcitabina, emtricitabina y lamivudina.

– **Análogos de bases púricas (Figura 20):**

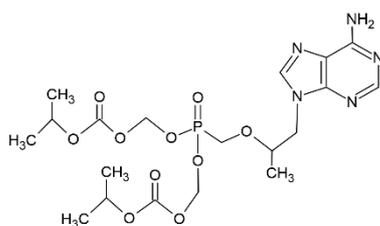
- Abacavir (ABC, Ziagen®)
- Didanosina (Videx EC®)
- Tenofovir (TFV)³, que actualmente dispone de dos formulaciones diferentes: tenofovir disoproxilo fumarato (TDF, comercializado como Viread®) y, por el que está siendo sustituido actualmente, tenofovir alafenamida (TAF, comercializado como Vemlidy®), ya que asegura concentraciones más altas del metabolito activo en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).



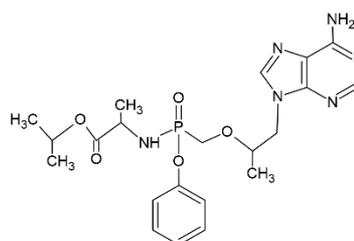
Abacavir



Didanosina



Tenofovir Disoproxil Fumarato



Tenofovir alafenamida

Figura 20. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido/-tido (análogos de bases púricas). Los fármacos son: abacavir, didanosina, tenofovir disoproxil fumarato y tenofovir alafenamida.

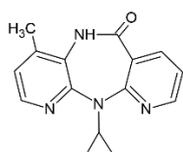
³ Al contrario que el resto de los ITIAN, TFV es un análogo de nucleótido.

3. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

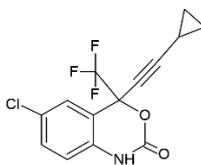
Los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido son pequeñas moléculas hidrofóbicas que actúan como inhibidores alostéricos⁴ de la transcriptasa inversa del VIH, inhibiendo su actividad ADN polimerasa y, por tanto, impidiendo la replicación viral (141-143).

En la actualidad los fármacos aprobados son (**Figura 21**):

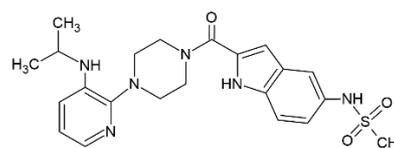
- Nevirapina (Viramune®)
- Efavirenz (Sustiva®)
- Delavirdina (Rescriptor®)
- Rilpivirina (RPV, Edurant®)
- Doravirina (DOR, Pifeltro®)
- Etravirina (Intelence®)



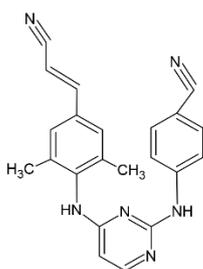
Nevirapina



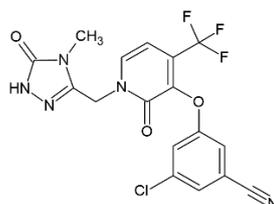
Efavirenz



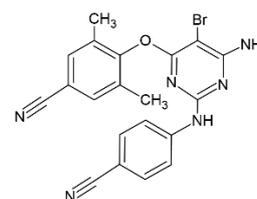
Delavirdina



Rilpivirina



Doravirina



Etravirina

Figura 21. Estructuras moleculares de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido. Los fármacos son: nevirapina, efavirenz, delavirdina, rilpivirina, doravirina y etravirina.

⁴ Moléculas que se unen a la enzima, en un sitio diferente al centro catalítico, produciendo cambios conformacionales que pueden afectar a su actividad.

4. Inhibidores de la integrasa

Este grupo de fármacos bloquean la integrasa viral, uniéndose al sitio catalítico de la enzima, y, por tanto, impiden la integración del ADN proviral en el genoma de la célula hospedadora (141-143).

Actualmente, existen 5 fármacos aprobados dentro de este grupo (**Figura 22**):

- Raltegravir (RAL, Isentress®)
- Elvitegravir (EVG, Vitekta®)
- Dolutegravir (DTG, Tivicay®)
- Bictegravir (BIC, Biktarvy®)⁵
- Cabotegravir (Vocabria®)

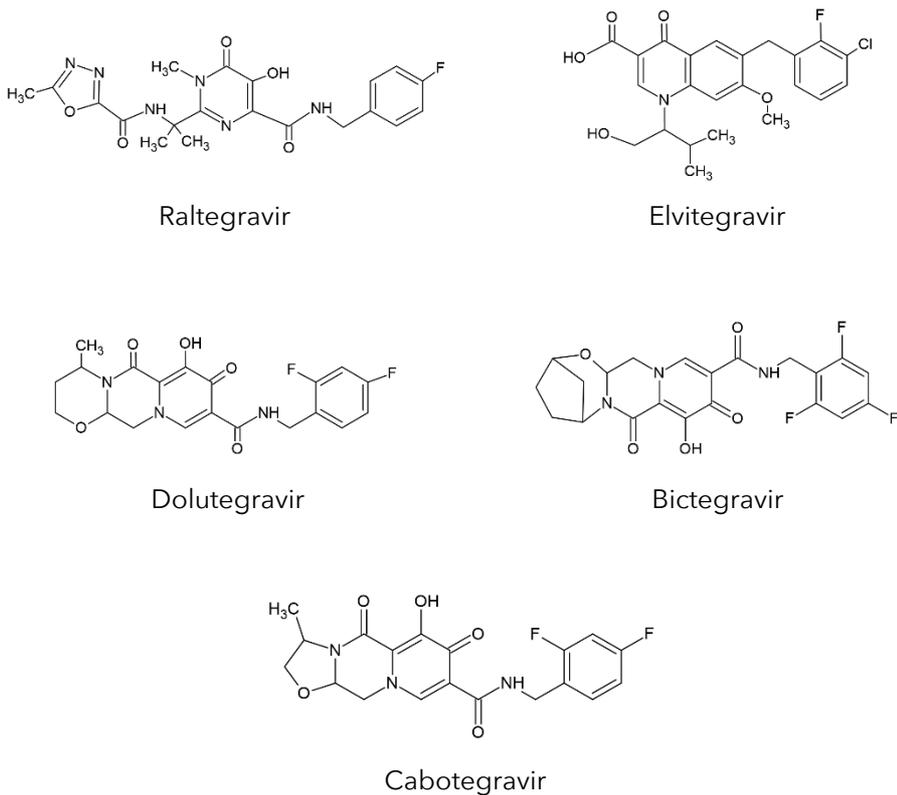


Figura 22. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la integrasa. Los fármacos son: raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, bictegravir, cabotegravir.

⁵ Únicamente se comercializa en combinación con TAF + FTC

5. Inhibidores de la proteasa

Son un grupo de compuestos no peptídicos que inhiben de forma potente y selectiva la proteasa del VIH. Estos fármacos se unen al centro catalítico de la enzima viral impidiendo la maduración de las proteínas virales necesarias para la formación de los nuevos viriones (141-143).

Con la finalidad de poder emplear concentraciones más bajas de estos fármacos, para reducir así su posible toxicidad, se suelen administrar en combinación con lo que se conocen como potenciadores farmacológicos, como cobicistat, comercializado como Tybost® y ritonavir, comercializado como Norvir® (**Figura 23**) (141,149). Los potenciadores farmacológicos compiten en el hígado por la degradación de los inhibidores de la proteasa, por lo que reduce la velocidad con la que se metabolizan y aumenta la concentración del fármaco en plasma (141).

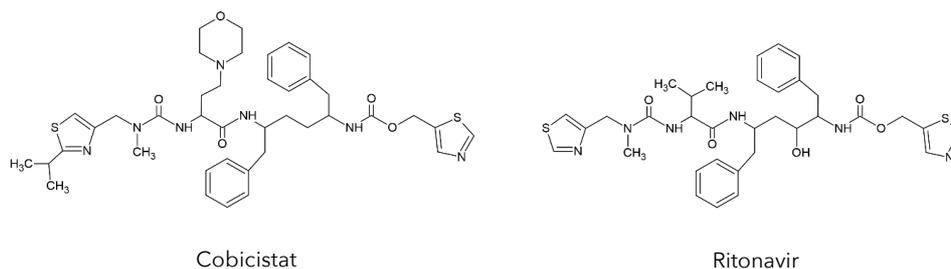
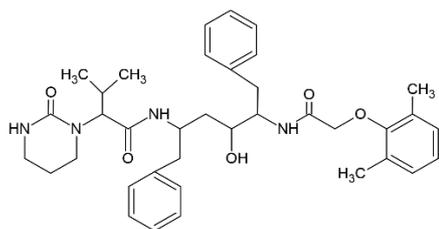


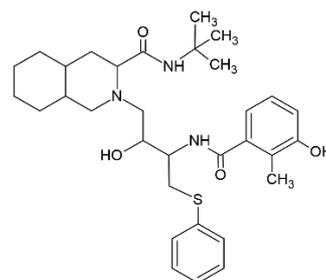
Figura 23. Estructuras químicas de los potenciadores farmacológicos. Los fármacos son: cobicistat y ritonavir.

En cuanto a los inhibidores de proteasa, se han aprobado para su uso los siguientes (**Figura 24**):

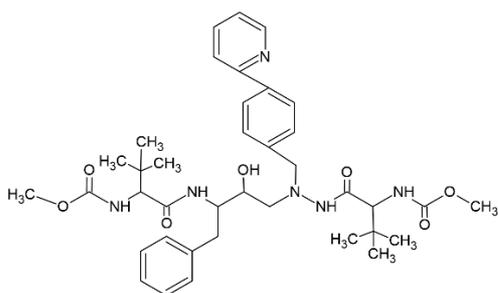
- Lopinavir, comercializado potenciado con ritonavir (Kaletra®)
- Nelfinavir (Viracept®)
- Atazanavir (ATZ, Reyataz®)
- Darunavir (DRV, Prezista®), o potenciado con cobicistat (Rezolsta®)
- Tripanavir (Aptivus®)
- Indinavir (Crixivan®)
- Saquinavir (Invitrase®)
- Fosamprenavir (Lexiva®)



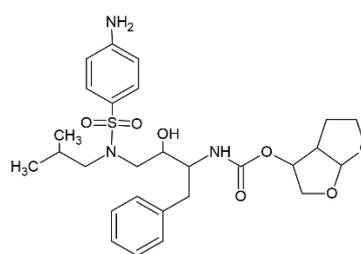
Lopinavir



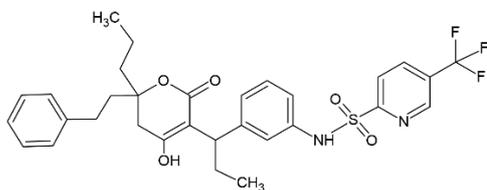
Nelfinavir



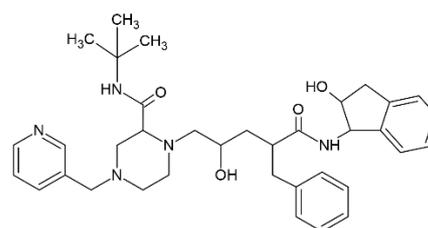
Atazanavir



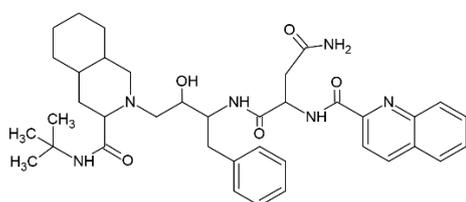
Darunavir



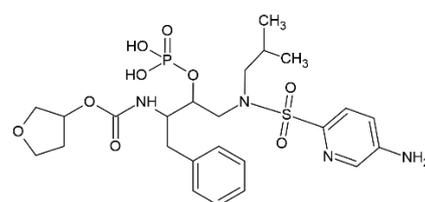
Tipranavir



Indinavir



Saquinavir



Fosamprenavir

Figura 24. Estructuras químicas de los fármacos inhibidores de la proteasa. Los fármacos son: lopinavir, nelfinavir, atazanavir, darunavir, tipranavir, indinavir, saquinavir y fosamprenavir.

2.5.2. PAUTAS POSOLÓGICAS

Según las recomendaciones de la Sociedad Antiviral Internacional, todas las personas infectadas por el VIH con una carga viral detectable, independientemente de su recuento de células CD4⁺, deben comenzar con la terapia antirretroviral lo antes posible tras el diagnóstico (150,151). Además, en 2012, se aprobó el primer fármaco (Truvada®, que consiste en la combinación TDF + FTC) para ser empleado en la profilaxis preexposición y poder así prevenir nuevas infecciones por VIH (141).

Las recomendaciones mencionadas anteriormente recogen un conjunto de pautas preferentes para la mayoría de los pacientes infectados por VIH. Estas combinaciones son las que tienen tasas más altas de supresión viral, toxicidad mínima, pocas interacciones farmacológicas y una carga reducida de comprimidos (150,151). También se favorecen combinaciones que tienen menos probabilidades de estar asociados con la aparición de resistencias del VIH, incluso cuando la adherencia al tratamiento no es óptima (150,151). Actualmente, las pautas recomendadas se basan en la combinación de 3 fármacos (2 ITIAN + inhibidor de la integrasa), o una combinación de 2 fármacos (ITIAN + inhibidor de la integrasa) (**Tabla 3**) (150).

Las pautas alternativas se emplean en situaciones especiales, como puede ser pacientes que han presentado resistencias a combinaciones, por interacciones farmacológicas con otros tratamientos ajenos a la terapia antirretroviral, pacientes coinfectados con tuberculosis o pacientes con insuficiencia renal, entre otros (150). Estas pautas se consideran alternativas, debido a posibles restricciones en su indicación y a que la eficacia de estas es inferior a las pautas preferentes (150).

Las combinaciones presentes en las pautas preferentes y alternativas se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Combinaciones de fármacos que forman las pautas preferentes y alternativas.

Pautas preferentes			
ITIAN	ITIAN	INI	Nombre comercial
TAF	FTC	BIC	Biktarvy®
TAF	FTC	RAL	Descovy® + Isentress®
TAF	FTC	DTG	Descovy® + Tivicay®
ABC	3TC	DTG	Triumeq®
	3TC	DTG	Dovato®
Pautas alternativas			
ITIAN	ITIAN	ITINN / INI / IP	Nombre comercial
TAF	FTC	DOR	Descovy® + Pifeltro®
TAF	FTC	RPV	Odefsey®
TAF	FTC	EVG/c	Genvoya®
TAF	FTC	DRV/c	Symtuza®

TAF: Tenofovir alafenamida; FTC: Emtricitabina; BIC: Bictegravir; RAL: Raltegravir; DTG: Dolutegravir; ABC: Abacavir; 3TC: Lamivudina; DOR: Doravirina; RPV: Rilpivirina; EVG/c: Elvitegravir potenciado con cobicistat; DRV/c: Darunavir potenciado con cobicistat.

Siguiendo estas indicaciones, se debe realizar una valoración individualizada de cada paciente con la finalidad de determinar que fármacos son los más adecuados, ya que, por ejemplo, dentro de las pautas preferentes, ABC está contraindicado en pacientes con la variante HLA-B*57:01 ya que hace que estos pacientes tengan un riesgo alto de sufrir reacciones de hipersensibilidad al fármaco (150). Por otro lado, DTG no está recomendado en mujeres embarazadas o en edad fértil (150).

2.5.3. TENOFOVIR

Entre los fármacos más empleados en las combinaciones de la terapia antirretroviral se encuentra el TFV. Este fármaco es un ITIAN análogo de la adenosina 5'-monofosfato, por lo que actúa inhibiendo la transcriptasa inversa del VIH (152,153). Como ya se ha comentado, actualmente se comercializa con dos formas diferentes TDF y TAF. Estas dos formas son profármacos que deben metabolizarse intracelularmente a tenofovir difosfato (TFV-DP), el metabolito activo (152,153). La posología diaria recomendada en una persona adulta es de 25 mg para TAF y de 245 mg para TDF (152,153).

TAF, comparado con TDF, llega de manera más eficiente a las células diana del VIH ya que es más estable en plasma y eso permite que tenga una actividad 10 veces mayor (152,153). Tras la absorción, la mayor parte del TDF se convierte rápidamente en el plasma por las esterasas plasmáticas en TFV, y después intracelularmente a la forma activa TFV-DP (152). Por el contrario, TAF permanece estable en el plasma y solo se convierte en TFV intracelularmente por la catepsina A y después en TFV-DP (**Figura 25**) (152,153). TFV es un dianión a pH fisiológico y esto hace que presente baja permeabilidad y biodisponibilidad (152). Debido a esto, la administración de TAF resulta en concentraciones de TFV en plasma más bajas que TDF, y esto hace que TAF tenga un perfil toxicológico más favorable que TDF (152,153).

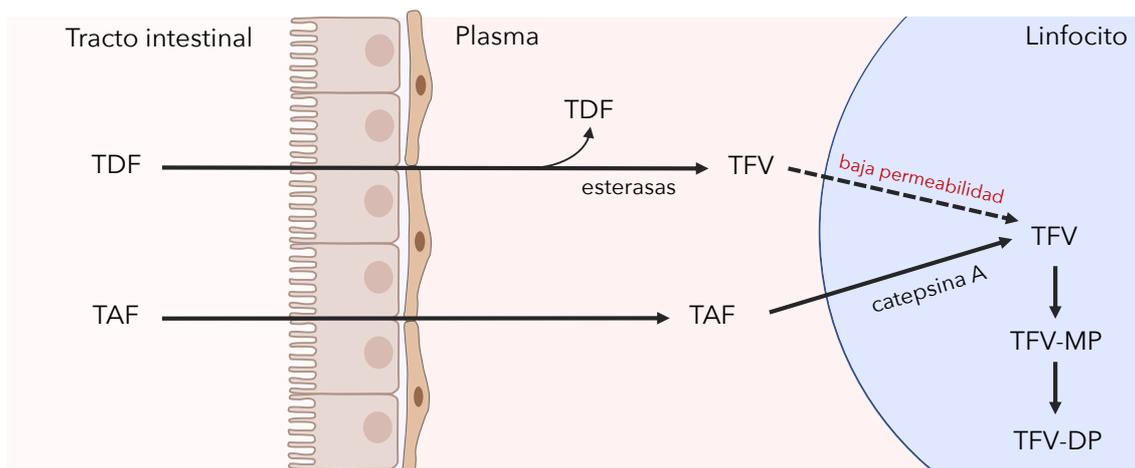


Figura 25. Metabolismo de tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF). Tras la absorción, el TDF es inestable en plasma por lo que prácticamente todo el TDF se metaboliza mediante esterasas plasmáticas a tenofovir (TFV), y este, aunque tiene baja permeabilidad, entra en los linfocitos. El TAF, tras la absorción puede permanecer estable en plasma y además presenta una mayor permeabilidad para entrar en los linfocitos, donde a través de la catepsina A se metaboliza en TFV. Finalmente, en el interior de los linfocitos el TFV se transforma mediante una serie de fosforilaciones en el metabolito activo, TFV-difosfato (TFV-DP).

La parte de TFV que no se transforma en el metabolito activo para actuar frente al VIH se elimina por vía renal, por filtración glomerular aproximadamente el 66% y por secreción por el túbulo proximal renal el 33% restante (152).

2.5.4. ABACAVIR

Otro de los fármacos empleado en las pautas preferentes es el ABC. Este fármaco es un ITIAN análogo de la base púrica guanina, por lo que actúa inhibiendo la transcriptasa inversa del VIH (154,155). Este compuesto es un profármaco que debe metabolizarse intracelularmente a su metabolito activo, carbovir 5'-trifosfato (CBV-TP) (154,155).

ABC es un compuesto lipofílico que además también presenta una alta solubilidad en agua, y puede atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva (154-156). Estas propiedades hacen que tenga una alta biodisponibilidad, entorno al 83%, tras su absorción (155). Todo ello facilita que pueda acceder a diferentes tejidos, e incluso atravesar la barrera hematoencefálica. La posología diaria recomendada en una persona adulta es de 600 mg, lo que permite alcanzar una concentración máxima en plasma de 4,1-5,46 µg/ml (155,157,158).

Tras su absorción, ABC se metaboliza principalmente en el hígado por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH) y uridina difosfato glucoroniltransferasa (UGT) presentes en los hepatocitos, que dan lugar a diferentes metabolitos inactivos que se excretan en la orina y las heces (155,156). Por otro lado, el 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 26**) (155,156).

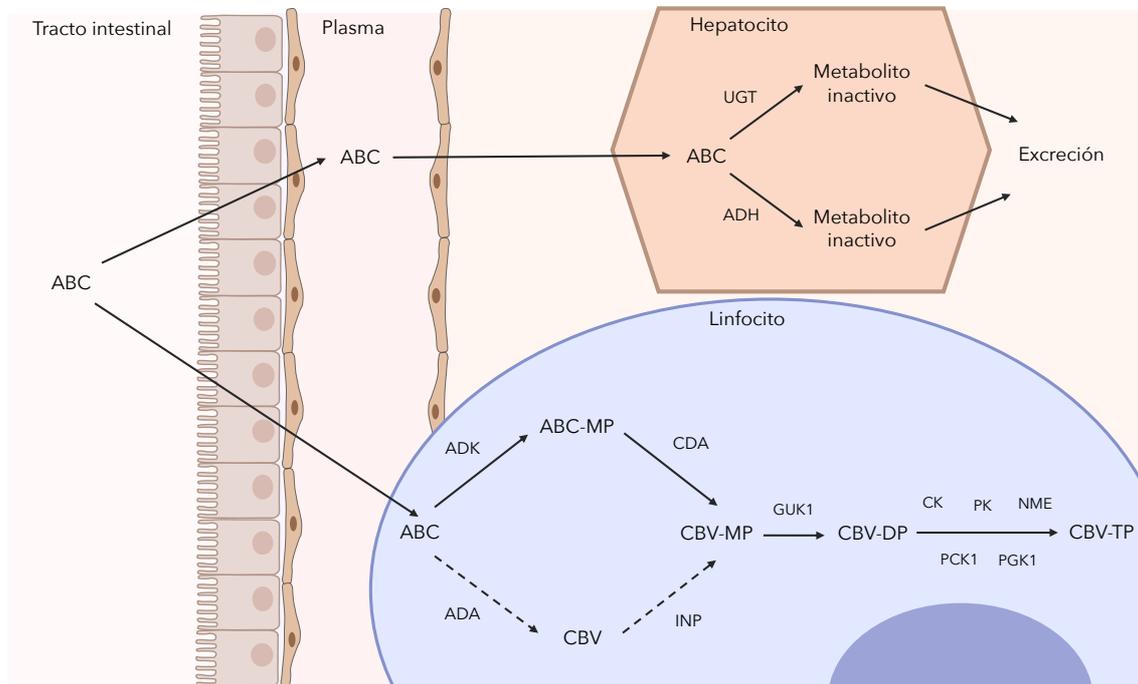


Figura 26. Metabolismo de abacavir (ABC). Tras la absorción, parte del ABC presente en plasma se transporta al hígado, donde en los hepatocitos mediante las enzimas uridina difosfato glucuroniltransferasa (UGT) y alcohol deshidrogenasa (ADH) se transforman en metabolitos inactivos destinados a la excreción. Por otro lado, el ABC se transporta a los linfocitos donde se metaboliza a carbovir-monofosfato (CBV-MP), mediante la ruta primaria (línea continua), a través de la enzima adenosina fosfotransferasa (ADK) que metaboliza el ABC en abacavir-monofosfato (ABC-MP), y después la desaminasa de citidina (CDA) da lugar al CBV-MP; o por vía secundaria (línea discontinua), en la que la desaminasa de adenosina (ADA) metaboliza el ABC en CBV y luego la enzima inosina fosfotransferasa (INP) lo transforma en CBV-MP. A continuación, las vías se unifican y el CBV-MP, se fosforila mediante la enzima guanilato quinasa (GUK1) dando lugar al carbovir-difosfato (CBV-DP), y seguidamente este es fosforilado por diferentes quinazas (creatín quinasa (CK), piruvato quinasa (PK), nucleósido difosfato quinasa (NME), fosfoglicerato quinasa (PGK1) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK1)) produciendo el metabolito activo, carbovir-trifosfato (CBV-TP).

2.6. COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

La terapia antirretroviral, que hasta la fecha se ha administrado a más de 27,5 millones de personas, ha salvado millones de vidas y ha mejorado drásticamente la esperanza y la calidad de vida de los pacientes infectados por VIH (139,140). Sin embargo, la terapia antirretroviral ha estado históricamente relacionada con diferentes efectos adversos, además, los pacientes envejecen y aparecen patologías que pueden agravarse con la terapia antirretroviral. Todo esto ha hecho que actualmente la comunidad científica se esté centrando mucho en el estudio de la toxicidad de estos fármacos debido a varios factores. Primero, debido a que la erradicación del VIH parece poco probable con la terapia actual, y por tanto el tratamiento debe ser crónico para preservar los beneficios clínicos (159). En segundo lugar, debido a que la gravedad de la epidemia por el VIH condujo a la aceleración de la autorización de muchos agentes antirretrovirales, a menudo con muy poco conocimiento sobre la seguridad a largo plazo (159). En este sentido, datos obtenidos de un estudio de cohorte prospectivo mostraron que hasta el 44% de los pacientes con terapia antirretroviral sufren reacciones adversas relacionadas con la terapia, siendo de moderados a severos en el 20% de los casos (160,161). Además, el 23% de estos pacientes presentan algunos valores anómalos en los análisis de sangre que requieren atención o intervenciones médicas directas (160,161).

El perfil de eventos adversos varía entre los diferentes grupos de fármacos e incluso entre fármacos del mismo grupo (161). Los principales efectos adversos graves que se han asociado a la terapia son: enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, osteoporosis, miopatía, y toxicidad en el sistema nervioso (159,161-163).

Todo esto promueve que los objetivos actuales en la terapéutica del VIH consistan en encontrar las combinaciones de fármacos más eficaces y con menos efectos adversos, y también estudiar los mecanismos toxicológicos de la terapia con el fin de minimizar las comorbilidades asociadas a su administración.

3. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES EN LOS PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH

3.1. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN

La patogénesis de la enfermedad cardiovascular en la infección por el VIH es multifactorial e incluye factores de riesgo tradicionales (como pueden ser el estilo de vida y la edad, entre otros) y los efectos directos del VIH (164). Más recientemente, también se ha asociado estos efectos adversos a la terapia antirretroviral (164). Todos estos factores actúan, al menos en parte, a través del sistema inmunitario e inflamatorio.

Esta descrito que la infección por VIH está asociada con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (164-167). Este riesgo, que incluye infarto de miocardio e ictus, está aumentado 2,2 veces en las personas infectadas por VIH con respecto a las personas no infectadas (164,168). La infección por el VIH induce una activación inmune persistente, que se puede producir a pesar de la eficacia de la terapia, debido a niveles bajos de viremia y coinfecciones (167,169-171). La activación constante de las células de la inmunidad innata y adaptativa, tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T y plaquetas, da como resultado un aumento de citocinas proinflamatorias y profibróticas. Estas citocinas pueden contribuir a la disfunción endotelial, la hipercoagulación y a la remodelación fibrótica aumentado así el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares (169,170). De hecho, un estudio demostró que los pacientes con VIH tienen elevados los niveles de biomarcadores inflamatorios y coagulatorios (167,172). Además, el estudio sobre las estrategias para el manejo de la terapia antirretroviral demostró que la interrupción de la terapia antirretroviral resultó en un aumento en el riesgo de padecer infarto de miocardio, posiblemente debido al aumento de la viremia que puede desembocar en el desarrollo del proceso inflamatorio (164,173).

En general, es difícil desentrañar los efectos exactos del VIH y los diferentes fármacos antirretrovirales sobre el riesgo de enfermedades cardiovasculares en los pacientes.

La toxicidad de la terapia puede inducir un nuevo riesgo de enfermedades cardiovasculares o exacerbar el impacto negativo de otros factores de riesgo como la hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, alteraciones de los lípidos y obesidad (164,174).

3.2. COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS AL ABACAVIR

En cuanto a la asociación de la terapia antirretroviral y las enfermedades cardiovasculares, en 2003 se describió en pacientes con infección por VIH que un mayor tiempo de exposición a la terapia antirretroviral combinada estaba asociado con un mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares, y concretamente infarto de miocardio (175). En este sentido, en primer lugar, se apuntó a los inhibidores de la proteasa como fármacos responsables ya que estos inducen dislipidemia (175). Sin embargo, en 2005, un estudio realizado por la Organización mundial de la salud (OMS) analizó 34 pacientes infectados por VIH que habían sufrido infarto de miocardio (176). Todos estos pacientes estaban recibiendo ABC en su tratamiento, aunque con diferentes combinaciones, y observaron que 9 de ellos no incluían inhibidores de proteasa en sus pautas. Con estos datos concluyeron que no se podía descartar la asociación entre ABC y el infarto de miocardio y que se requerían estudios que analizaran este aspecto en más profundidad. En los años siguientes se publicaron diferentes estudios que analizaban esta asociación. En 2008, un estudio del grupo de Recopilación de datos y eventos adversos de los fármacos contra el VIH (D:A:D), en el que se analizaron más de 30000 pacientes, advirtió la asociación de ABC - tanto en el tratamiento actual como en los últimos 6 meses - con un mayor riesgo de padecer infarto de miocardio que desaparecía a los 6 meses de cesar el tratamiento (177). No obstante, un mayor tiempo de uso del fármaco no inducía un mayor riesgo de padecer infarto de miocardio. Ese mismo año, un estudio observacional nombrado SMART/INSIGHT también demostró que el riesgo de enfermedades cardiovasculares estaba duplicado en los pacientes en tratamiento con ABC y no en pacientes en tratamiento con TDF (178). Sin embargo, también se

publicaron otros estudios que refutaban la asociación de ABC con las enfermedades cardiovasculares. Entre los estudios que no apoyaron esta asociación, se mostró que la incidencia de eventos cardiovasculares era similar en los pacientes en tratamiento con ABC/3TC o TDF/FTC (179-181). Sin embargo, la edad media de los pacientes en estos estudios era significativamente menor (sobre 40 años) que en el estudio del grupo D:A:D (50 años). Por otro lado, el otro estudio que no encontró asociación entre ABC y los eventos cardiovasculares, reportó un aumento marginal en el riesgo de infarto de miocardio en pacientes en tratamiento con ABC, pero que no se confirmó tras el ajuste por edad y predisposición a factores cardiovasculares (182).

Todo esto generó una de las mayores controversias en la terapéutica del VIH, que, no obstante, impulsó un cambio en las guías clínicas, de forma que el uso de ABC no se recomendaba en pacientes con riesgo cardiovascular (183,184). Sin embargo, se continuó realizando estudios con el fin de esclarecer la asociación de ABC con el riesgo cardiovascular. En esta línea, en 2010, de nuevo el grupo D:A:D publicó un estudio en el que evaluaba el perfil vascular de todos los ITAN disponibles hasta la fecha, confirmando que el mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio estaba asociado al uso de ABC, y no a otros ITAN, ampliamente empleados en el tratamiento, como TDF (185). Además, en este estudio se igualó las características de los pacientes de los diferentes grupos, como por ejemplo los niveles de colesterol y triglicéridos, la tensión arterial o la afección por diabetes mellitus. Así mismo, analizando la evolución de esta misma cohorte, el grupo D:A:D publicó en 2016 un nuevo estudio en el que ya se incluía los cambios producidos en la práctica clínica debido a la reducción de las prescripciones de ABC en pacientes con mayor riesgo cardiovascular (186). De igual forma, demostraron que el uso reciente de ABC estaba asociado con un aumento de 1,98 en el riesgo de sufrir infarto de miocardio.

Todos estos resultados confirman que la cardiotoxicidad de ABC se asocia con la existencia de comorbilidades u otros factores de riesgo adicionales (187,188). No obstante, estos estudios no analizaron los posibles mecanismos por los cuales ABC causa esta toxicidad cardiovascular. En este sentido, se demostró que el fármaco

presenta un perfil lipídico neutro y no interfiere en la sensibilidad a la insulina (189,190). Más adelante, los estudios se centraron en analizar los niveles de diferentes biomarcadores cardiovasculares en sangre de pacientes en tratamiento con ABC, sin obtener resultados claros y en algunos casos contradictorios (por ejemplo, en cuanto a los niveles de IL-6 o dímero-D), hecho que alimentó la controversia en torno a este fármaco (191-209).

Por otro lado, la mayoría de los estudios apuntan a que ABC tiene un perfil vascular de inflamación aguda (178,210). En esta línea, se han realizado diferentes estudios *in vitro* con células humanas de donantes sanos, *ex vivo* con muestras de pacientes con VIH con diferentes tratamientos o *in vivo* con modelos animales, analizando los efectos de ABC en la activación plaquetaria, la acumulación leucocitaria y la función endotelial.

En cuanto a los estudios referentes a los efectos de ABC sobre la función plaquetaria, hay que distinguir entre aquellos que se realizaron *ex vivo* con muestras de pacientes en tratamiento con el fármaco y aquellos que se realizaron *in vitro* con muestras de donantes sanos. Por un lado, en los estudios *ex vivo* se observó un aumento en la agregación de las plaquetas, tras la estimulación con diferentes agonistas plaquetarios (ADP, colágeno, epinefrina, TRAP o el agonista del receptor de tromboxano A₂), en los pacientes en tratamiento con ABC comparándolos con otros tratamientos, principalmente TDF (193,211-213). Sin embargo, estos estudios han mostrado resultados contradictorios en cuanto a los efectos producidos tras la estimulación con los diferentes agonistas. Asimismo, en los estudios *ex vivo* se observó que las plaquetas extraídas de pacientes en tratamiento con ABC presentan una mayor expresión de P-selectina y CD40L, y una disminución del guanosín monofosfato cíclico (cGMP) intraplaquetario, comparado con los pacientes en tratamiento con TDF, además de un aumento en la expresión de GPIIb/IIIa en comparación con los pacientes sin tratamiento (193,211,212,214).

Por otro lado, en los estudios realizados *in vitro* cuando se analizan los efectos de ABC *per se* no se observaron cambios ni en la agregación, ni en la expresión de P-selectina y GPIIb/IIIa, ni en la movilización de calcio en plaquetas (215-217). Tampoco se observaron cambios en la agregación plaquetaria cuando esta fue estimulada con agonistas como ADP, colágeno o TRAP tras el tratamiento con ABC (215-217). No obstante, el fármaco indujo un aumento en la expresión de P-selectina y CD63 tras la estimulación con colágeno (217).

En los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de los mecanismos por los que ABC presenta este perfil de toxicidad vascular mediante estudios *in vitro*. En este sentido, se demostró que concentraciones clínicamente relevantes de ABC inducen un aumento en las **interacciones leucocito-endotelio** (disminuyendo la velocidad de rodamiento, y aumentando así el rodamiento y la adhesión de los leucocitos sobre el endotelio vascular) (218,219). También se observó que ABC inducía un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1 en leucocitos e ICAM-1 en células endoteliales, y que estas eran las moléculas de adhesión responsables de las mencionadas interacciones (218,219). En estos estudios se analizó la posible implicación de los receptores purinérgicos en los efectos de ABC, debido a la similitud estructural del fármaco con los ligandos fisiológicos de estos receptores, las purinas endógenas (ATP, ADP, etc.) (209). En este sentido, en primer lugar, se demostró que las interacciones leucocito-endotelio inducidas por ABC se debían a la acción de este fármaco sobre los receptores P2X₇, descartando otros receptores como P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2Y₂, P2Y₆ y P2Y₁₁ (220). Más adelante analizando en detalle la activación del receptor P2X₇ por ABC, se observó que el fármaco actúa como un modulador alostérico de este receptor haciéndolo más sensible a concentraciones bajas de ATP (221).

En cuanto a los efectos de ABC sobre las células endoteliales, se ha descrito que ABC induce, además del aumento en ICAM-1, una disminución en la expresión de la eNOS, aumentando así el estrés oxidativo, y también un aumento en los niveles de factor tisular tras la estimulación con TNF- α , tanto en las mismas células como en las

micropartículas liberadas por estas (195,218,222,223). Además, se demostró que ABC induce **interacciones plaqueta-endotelio**, mediadas por las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina en el endotelio y GPIIb/IIIa y GPIb α en plaquetas (215). Asimismo, estas interacciones se deben al efecto de ABC sobre las células endoteliales - no sobre las plaquetas - y concretamente a través del receptor P2X₇ (215).

Adicionalmente, un estudio reciente ha demostrado que ABC induce un aumento en las **interacciones plaqueta-neutrófilo** a través del receptor P2X₇, y que esta interacción se debe al efecto del fármaco sobre los neutrófilos, y no sobre las plaquetas. Las moléculas de adhesión implicadas en dichas interacciones son P-selectina en plaquetas y PSGL-1 en neutrófilos (224).

Por último, en los estudios *in vivo* en modelos animales se demostró que ABC es capaz de inducir la formación de trombos en un modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃, y que además este efecto es dependiente del receptor P2X₇ (225).

Con todos estos resultados podemos concluir que ABC estaría induciendo una inflamación vascular actuando sobre los leucocitos y sobre el endotelio - a través del receptor P2X₇ en ambos tipos celulares - promoviendo la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales. Además, la activación de estos dos tipos celulares conduciría también a la adhesión de las plaquetas tanto a células endoteliales como a leucocitos. Todos estos procesos, a pesar de que ABC no induce la agregación plaquetaria, debido a que forman parte de los procesos de la inmutrombosis pueden desembocar en la formación de trombos (**Figura 27**).

Los efectos descritos para ABC sobre parámetros de inflamación vascular (interacciones leucocito-endotelio) así como sobre los procesos previos a la formación de trombos (interacciones plaqueta-leucocito y plaqueta-endotelio) han sido realizados utilizando muestras de sangre de donantes sin infección por VIH. Por ello, consideramos de especial relevancia el análisis de los efectos de ABC sobre

estos parámetros simulando lo que sucede en la práctica clínica realizando el análisis en muestras de pacientes infectados por VIH en tratamiento crónico con el fármaco. Sin embargo, debido a que los pacientes no reciben solo un fármaco (la terapia antirretroviral consiste en tres fármacos) los efectos no se podrían atribuir directamente a ABC. Por ello, también consideramos pertinente el análisis de dichos parámetros sobre muestras de pacientes infectados por HIV a los que se les añade ABC *in vitro*.

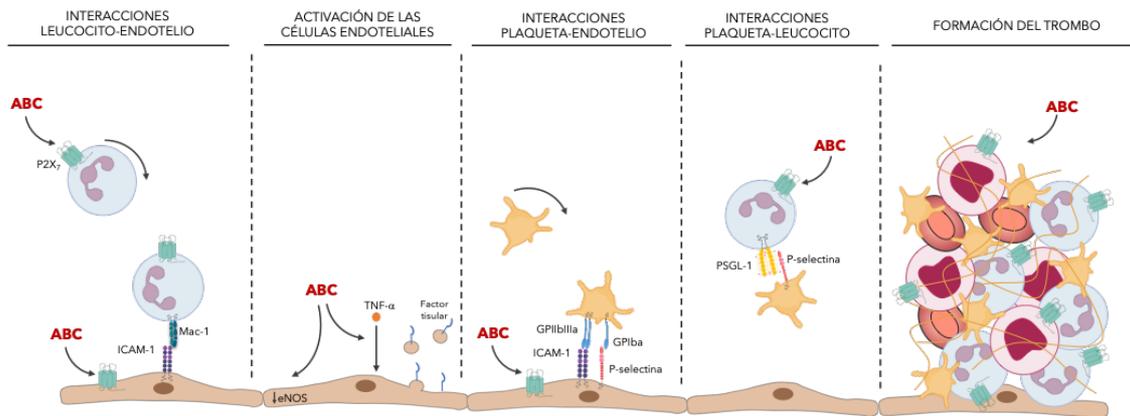


Figura 27. Efectos descritos de Abacavir (ABC) sobre las células vasculares. ABC induce las interacciones de leucocitos sobre el endotelio, actuando a través del receptor P2X₇, y mediante las moléculas de adhesión Mac-1 en leucocitos e ICAM-1 en las células endoteliales. En cuanto a las células endoteliales, ABC induce una disminución en la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y tras la estimulación con TNF- α , un aumento en la expresión de factor tisular en la superficie de las células y de las micropartículas liberadas por las células endoteliales. Además, ABC, induce a través del receptor P2X₇ endotelial, la adhesión de plaquetas sobre el endotelio, mediante las interacciones de las moléculas de adhesión GPIIb/IIIa y GPIb α en plaquetas, y P-selectina e ICAM-1 en el endotelio. Por otro lado, ABC induce la interacción de neutrófilos con plaquetas, actuando a través del receptor P2X₇ en los neutrófilos, y mediante las moléculas de adhesión P-selectina en plaquetas y PSGL-1 en neutrófilos. Por último, también se ha demostrado que ABC induce la formación de trombos, en un modelo de trombosis murino, a través del receptor P2X₇.

Por otro lado, también existe una carencia de estudios sobre el mecanismo por el cual ABC es capaz de inducir la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo. Así, aunque se observó que estas interacciones se debían al efecto de ABC sobre los neutrófilos y no directamente sobre las plaquetas, y que además para producir la activación de las plaquetas no se requería el contacto directo entre estos dos tipos celulares, la posible implicación en dichos efectos del secretoma liberado por los neutrófilos tratados con el fármaco permanece sin esclarecer.

Por último, debido a que se ha descrito que ABC actúa como modulador alostérico del receptor P2X₇ induciendo este tipo de interacciones, también sería interesante evaluar si el mecanismo descrito para ABC se podría extrapolar a procesos fisiológicos o fisiopatológicos que tuvieran como protagonista al ATP.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue doble, por un lado, evaluar el efecto inflamatorio y/o protrombótico del fármaco antirretroviral Abacavir (ABC) en muestras de pacientes infectados por VIH; y, por otro lado, analizar el mecanismo por el que ABC induce la activación plaquetaria.

Particularmente, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Estudiar el estado inflamatorio y trombogénico de muestras de pacientes infectados por VIH en los que ABC, en comparación con Tenofovir, forme parte de la terapia antirretroviral.
- 2.** Evaluar el efecto sobre los procesos inflamatorios y trombogénicos de ABC adicionado *in vitro* en muestras de pacientes infectados por VIH.
- 3.** Analizar el mecanismo por el cual ABC induce la activación de las plaquetas. Para ello, se abordaron los siguientes objetivos:
 - 3.1.** Estudiar la posible liberación de un secretoma activo por parte de los neutrófilos en respuesta al ABC.
 - 3.2.** Determinar la implicación del receptor purinérgico P2X₇ de los neutrófilos en la liberación del secretoma.
 - 3.3.** Evaluar la composición del secretoma y la implicación de sus proteínas en los efectos de ABC.
 - 3.4.** Dilucidar los mecanismos de señalización del secretoma sobre las plaquetas.
- 4.** Comprobar si los efectos de ABC se pueden extrapolar al agonista endógeno de los receptores purinérgicos, ATP.
- 5.** Evaluar los efectos de ABC y ATP sobre la liberación de NETs.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CARDIOVASCULAR DE ABC EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH

1.1. COHORTE DE PACIENTES

1.1.1. PACIENTES INFECTADOS POR VIH

Se reclutaron pacientes infectados por VIH del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico Universitario de Valencia, que cumplieran los siguientes criterios:

- Diagnóstico de infección por VIH
- Edad >18 años
- Carga viral en plasma indetectable (< 50 copias/mL)
- Sin coinfección por hepatitis B o C
- Terapia antirretroviral continua durante al menos los últimos 6 meses
- Sin antecedentes de riesgo cardiovascular

Tanto los datos biológicos como los parámetros inmunológicos y hematológicos se importaron directamente del sistema informático del Hospital Clínico Universitario de Valencia, minimizando así el sesgo de recopilación.

1.1.1.1. COHORTE DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON ABC O TFV

El propósito de los ensayos con esta cohorte fue comparar las muestras de dos grupos de pacientes infectados por VIH con diferentes tratamientos antirretrovirales: un grupo que incluía ABC en la terapia y otro grupo que incluía TFV. Asimismo, las muestras de cada uno de estos grupos también se compararon con las de un grupo control (pacientes sin infección por VIH).

1.1.1.2. COHORTE DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO *IN VITRO*

Las muestras obtenidas de los pacientes que conforman esta cohorte, que procedían de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron, *in vitro*, con ABC 5 µg/mL o salino durante 1 h o 4 h a 37°C (158,218). La finalidad de los ensayos realizados con los pacientes de esta cohorte fue evaluar el efecto de ABC *in*

vitro sobre muestras con la presencia del virus, ya que este es un aspecto clave en las comorbilidades presentes en estos pacientes.

1.1.2. DONANTES NO INFECTADOS POR VIH

Los donantes sin infección por VIH se reclutaron del Hospital Clínico Universitario de Valencia o del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, según la muestra biológica extraída. De estos donantes se obtuvieron tanto los cordones umbilicales, para la obtención de células endoteliales, como sangre entera periférica, para la obtención de leucocitos y plaquetas. Los cordones umbilicales procedían del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y la sangre entera del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. Los donantes de los que se extrajo las muestras sanguíneas debían cumplir los siguientes requisitos:

- Edad >18 años
- Sin medicación antiinflamatoria al menos 14 días antes de la extracción

1.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.2.1. SANGRE

Las muestras de sangre entera periférica se recogieron, en tubos de citrato sódico como anticoagulante, tanto de los pacientes infectados por VIH como de los donantes sin infección.

1.2.1.1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS

Los leucocitos que se aislaron en este estudio fueron leucocitos polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para el aislamiento de estas dos poblaciones leucocitarias se partió de la sangre extraída, o bien de donantes control (sin infección por VIH) o bien de pacientes infectados por VIH, y las células se aislaron mediante gradiente de densidad.

Para ello, en primer lugar, se adicionó dextrano al 3% (en suero fisiológico) sobre la sangre entera en una proporción 2:1 (**Figura 28-1**). La separación de la gran parte de los eritrocitos del resto de células sanguíneas se consiguió tras unos 40 min a temperatura ambiente, quedando los eritrocitos depositados en la parte inferior (**Figura 28-2**). Posteriormente, se recogió la fase superior donde se encuentran el resto de las células sanguíneas y se depositó cuidadosamente, evitando su mezclado, sobre Ficoll-Paque Plus (**Figura 28-3**) y se centrifugó (583 g, 25 min). Este paso permite la separación de las diferentes poblaciones leucocitarias por el gradiente de densidad y tras la centrifugación los PMN se encuentran en el precipitado y los PBMC en la interfase formando un anillo blanquecino (**Figura 28-4**) (218).

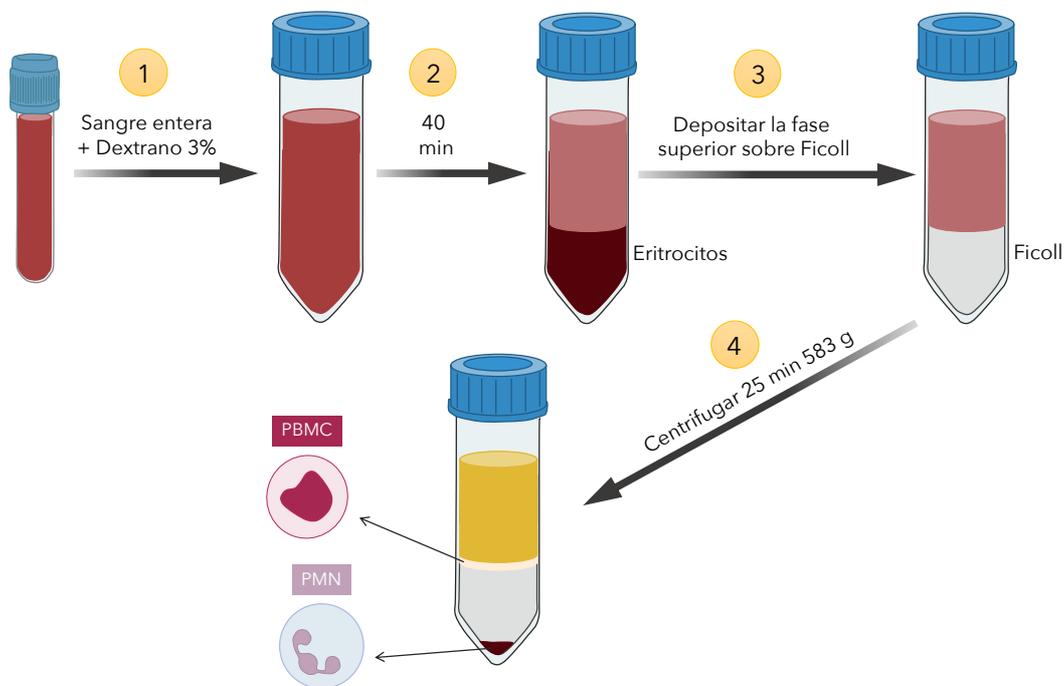


Figura 28. Fases del aislamiento de leucocitos (PMN y PBMC) a partir de sangre entera. En primer lugar, la sangre entera se mezcla con dextrano al 3% y se incuba durante 40 min, permitiendo la separación de dos fases, en la inferior se encuentra la mayoría de los eritrocitos mientras que la fase superior es rica en leucocitos. A continuación, esta fase superior se deposita sobre Ficoll-Paque Plus, sin que se produzca el mezclado de las fases, y se centrifuga durante 25 min a 583 g. Tras el centrifugado se obtiene en el precipitado los leucocitos polimorfonucleares (PMN) con algunos restos de eritrocitos, y en el halo blanquecino los leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para el aislamiento de los PBMC, se recolectó la interfase y se centrifugó (583 g, 10 min). Tras esta centrifugación los PBMC se encuentran en el precipitado, lo que permite realizar un lavado con una solución salina de Hanks equilibrada (HBSS), sin

Ca²⁺ ni Mg²⁺, y finalmente se resuspendieron en medio RPMI suplementado con FBS (10% v/v), penicilina/estreptomicina (1% v/v), glutamina (1% v/v) y piruvato sódico (1%v/v); o en una solución con una proporción 1:1 de solución salina tampona de Dulbecco con Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS+) y de solución salina tampona de Dulbecco sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (DPBS-), más albumina sérica humana (0,1% v/v); dependiendo del ensayo para el que se fueran a emplear posteriormente (Véase apartado 1.3.1.1. *Estudio de las interacciones leucocito-endotelio*).

Por otro lado, para obtener los PMN, al precipitado obtenido se le añadió solución de lisis (8 g/L de NH₄Cl, 249 mg/L de NaHCO₃ y 1,69 g/L de EDTA Na₂·4H₂O), con la finalidad de lisar los eritrocitos remanentes. En primer lugar, se incubó durante 5 min y a continuación se centrifugó (259 g, 5 min) (218,224). Posteriormente, los PMN sedimentados se lavaron con HBSS, sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, y finalmente se resuspendieron, dependiendo del ensayo para el que se fueran a emplear ulteriormente, en RPMI suplementado tal y como se ha mencionado anteriormente, en la solución salina tamponada de Dulbecco (1:1), o en suero salino.

El recuento de las células, para poder obtener las concentraciones necesarias para su uso posterior, se realizó mediante una cámara de Neubauer, diluyendo las células obtenidas tras la extracción en azul de tripano, que tiñe las células muertas de azul y nos permite distinguirlas de las células viables.

1.2.1.2. EXTRACCIÓN DE PLAQUETAS

Para la obtención de plaquetas se partió de la sangre extraída (bien de donantes control o bien de pacientes infectados por VIH) y se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP), y en algunos casos a partir del PRP se obtuvieron también plaquetas lavadas.

En primer lugar, para la obtención del PRP los tubos de citrato sódico con la sangre entera se centrifugaron (220 g con desaceleración suave, 10 min). Tras la centrifugación, se recogió el PRP que constituye la fase superior amarillenta (**Figura 29**) (215,224). En segundo lugar, para la obtención de plaquetas lavadas, el PRP se

centrifugó (700 g, 10 min), depositando las plaquetas en el precipitado, que se resuspendió en suero salino, obteniendo así las plaquetas lavadas (215).

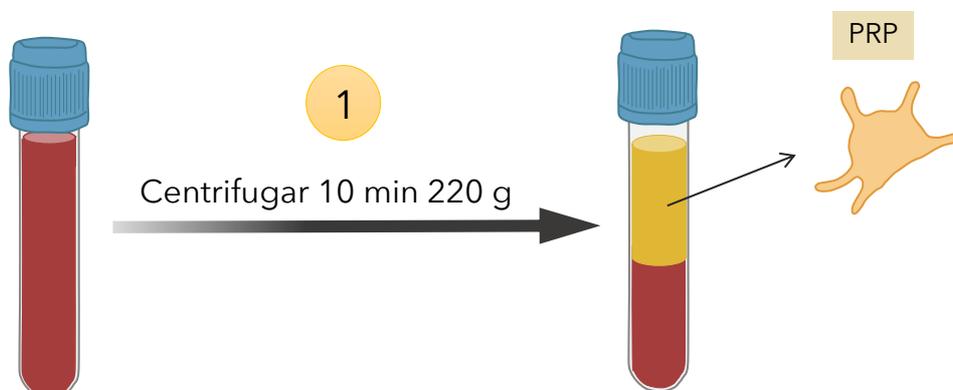


Figura 29. Extracción de plasma rico en plaquetas (PRP). La sangre entera se centrifuga durante 10 min a 220 g para obtener el PRP. Tras el centrifugado en la parte superior se obtienen las plaquetas en forma de PRP.

1.2.2. CORDONES UMBILICALES

Los cordones umbilicales obtenidos de donantes sin infección por VIH se recogieron en frascos con fosfato salino.

1.2.2.1. EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales empleadas en este estudio se obtuvieron de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC). Para la extracción se trabajó con una porción del cordón umbilical fresco y las células se obtuvieron de la única vena presente en los cordones umbilicales (226,227).

El aislamiento de las HUVEC se realizó por disgregación enzimática con colagenasa (226,227). En primer lugar, se realizó un lavado de la vena del cordón umbilical con fosfato salino (PBS, 37°C), y posteriormente se introdujo en la vena la solución de colagenasa (1 mg/mL) (**Figura 30**) dejándola actuar durante 17 min, manteniendo el cordón umbilical a 37°C en el incubador. Transcurrido este tiempo de incubación, se recogió la solución de colagenasa masajeando suavemente el cordón umbilical para favorecer la disgregación de las células endoteliales de la pared de la vena. Para neutralizar la actividad de la colagenasa se añadió medio basal de células endoteliales

(EBM-2), suplementado con suero fetal bovino (FBS). A continuación, la solución con las células extraídas se centrifugó (259 g, 5 min) y el precipitado obtenido se resuspendió en 5 mL de EBM-2 suplementado, según las indicaciones del fabricante, con FBS (2% v/v), hidrocortisona (0,4% v/v), factor básico de crecimiento de fibroblastos humano (0,4% v/v), factor de crecimiento del endotelio vascular (0,1% v/v), factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (0,1% v/v), ácido ascórbico (0,1% v/v), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (0,1% v/v), sulfato de gentamicina y anfotericina B (GA-1000) (0,1% v/v), heparina (0,1% v/v), penicilina (50 U/mL), estreptomina (50 µg/ml) y fungizona (2,5 µg/ml).



Figura 30. Cordón umbilical humano. Sección del cordón umbilical con colagenasa en la vena para la extracción de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC).

Las HUVEC resuspendidas en el medio anteriormente mencionado se cultivaron en un frasco de cultivo celular T-25, que se dispuso en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Las HUVEC se mantuvieron en el incubador permitiendo así que las células se adhieran al frasco de cultivo y crezcan hasta alcanzar el 100% de confluencia. En este estudio únicamente se emplearon HUVEC del primer pase de los cultivos primarios. Por lo tanto, una vez se alcanzó la confluencia deseada del cultivo primario las células se despegaron del frasco de cultivo mediante el uso de tripsina, y finalmente estas células se cultivaron en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 25 mm de diámetro (o bien de cristal o bien de plástico) pre-tratados con fibronectina

(5 mg/mL); y se almacenaron en el incubador hasta que se alcanzó la confluencia necesaria para realizar los ensayos.

1.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

1.3.1. ADHESIÓN EN CÁMARA DE FLUJO PARALELO

Las interacciones de los leucocitos y las plaquetas con las células endoteliales se evaluaron mediante una cámara de flujo paralelo, que permite simular el flujo presente en los vasos sanguíneos del organismo, exponiendo una monocapa de células endoteliales a un flujo constante y homogéneo de leucocitos o plaquetas (215,218,228,229).

La cámara de flujo empleada presenta una hendidura en la que se inserta un cubreobjetos circular que contiene una monocapa de HUVEC en confluencia, y también dispone de un canal por el que se hace pasar el flujo con la solución de leucocitos o plaquetas aislados (**Figura 31**). Una vez montada la cámara, una porción de 5 x 25 mm de la monocapa de HUVEC queda expuesta al flujo generado mediante una bomba de infusión (Harvard Apparatus PHD 2000), que permite establecer un flujo controlado de 0,36 mL/min (0,7 dinas/cm²), simulando el flujo sanguíneo. La cámara montada se coloca sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S), que dispone de un objetivo 40x empleado para la visualización de estas interacciones. Además, este microscopio está conectado a una cámara (Sony Exware HAD), que permite registrar las imágenes mediante el *software NIS Elements AR program* (**Figura 31**).

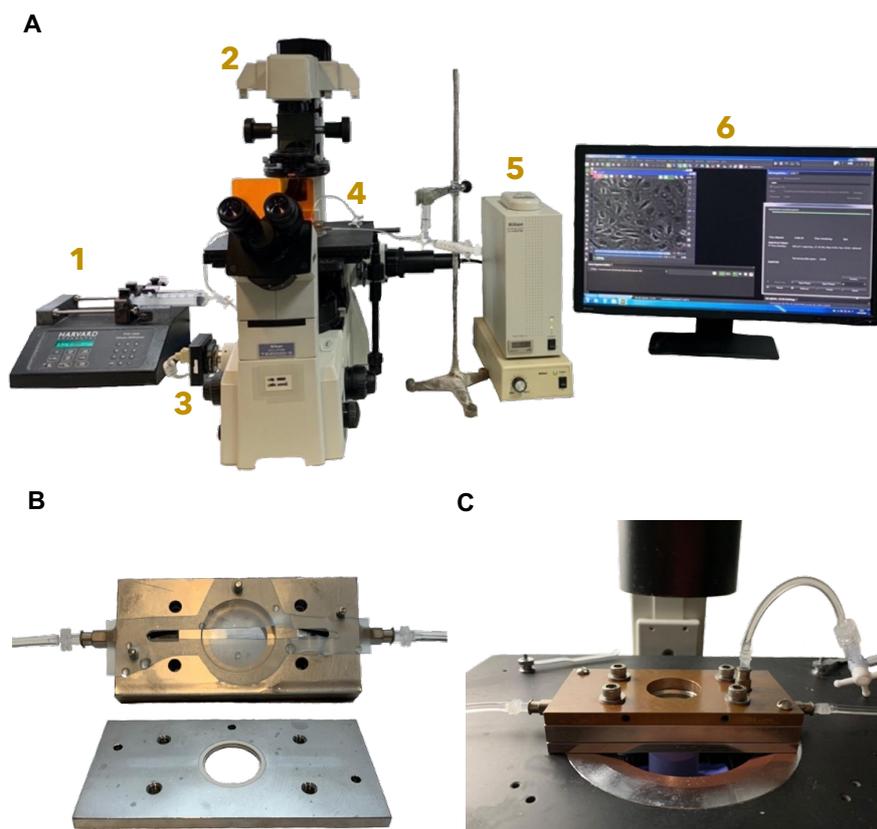


Figura 31. Equipo para evaluar la adhesión en la cámara de flujo paralelo. **A.** Equipo formado por: 1. Bomba de infusión (Harvard Apparatus PHD 2000); 2. microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S); 3. Cámara (Sony Exware HAD); 4. Cámara de flujo paralelo; 5. Equipo de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFIE); 6. Ordenador con el *software NIS Elements AR program*. **B.** Componentes de la cámara de flujo paralelo. **C.** Cámara de flujo paralelo montada sobre el microscopio.

1.3.1.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO

Para llevar a cabo el estudio de las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales se usaron HUVEC confluentes cultivadas en cubreobjetos circulares de plástico. Por otro lado, los leucocitos empleados en esta técnica, tanto los PMN como los PBMC, deben encontrarse en una solución salina tamponada de Dulbecco (1:1) (descrita en el apartado 1.2.1.1. *Aislamiento de leucocitos*). Previo al desarrollo del ensayo, los PMN y los PBMC fueron resuspendidos en este medio a razón de $1 \cdot 10^6$ células/mL y $0,5 \cdot 10^6$ células/mL, respectivamente (218,227).

Con la finalidad de evaluar estas interacciones, una vez comenzado el flujo de los leucocitos sobre las células endoteliales se inicia la grabación de las imágenes. Estas

grabaciones se realizaron durante 4 min en el mismo campo, en el que posteriormente se analizaron los parámetros de velocidad de rodamiento y rodamiento leucocitario. Transcurridos esos 4 min, se grabaron 5-6 campos adicionales que permitieron analizar el parámetro de adhesión leucocitaria.

Los parámetros anteriormente mencionados se analizaron de la siguiente manera:

- **Velocidad de rodamiento:** es el tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100 μm de la monocapa de células endoteliales. Este valor se obtiene calculando la media de 20 leucocitos consecutivos, y se mide en $\mu\text{m/s}$.
- **Rodamiento:** es el número de leucocitos que son visibles en el flujo, ya que estos leucocitos presentan una velocidad inferior al estar interaccionando con las células endoteliales. Este valor se obtiene contando los leucocitos visibles que circulan con el flujo en un mismo campo durante 1 min, y se mide en células/min.
- **Adhesión:** es el número de leucocitos que permanecen estacionados sobre la monocapa de células endoteliales durante un periodo igual o superior a 30 s. Este valor se obtiene contando el número de leucocitos estacionados en 5-6 campos diferentes, y se mide en células/ mm^2 .

1.3.1.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los leucocitos - PMN y PBMC - aislados de sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se resuspendieron, en el último paso de su extracción, con la solución salina tamponada de Dulbecco, y se perfundieron directamente en la cámara de flujo (**Figura 32a**).

En el caso de los PMN y PBMC aislados de sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron con ABC 5 $\mu\text{g/mL}$ o salino durante 4 h a 37°C, *in vitro* (158,218). A continuación, los PMN y PBMC se

resuspendieron en la solución salina tamponada de Dulbecco, y se perfundieron en la cámara de flujo (**Figura 32b**).

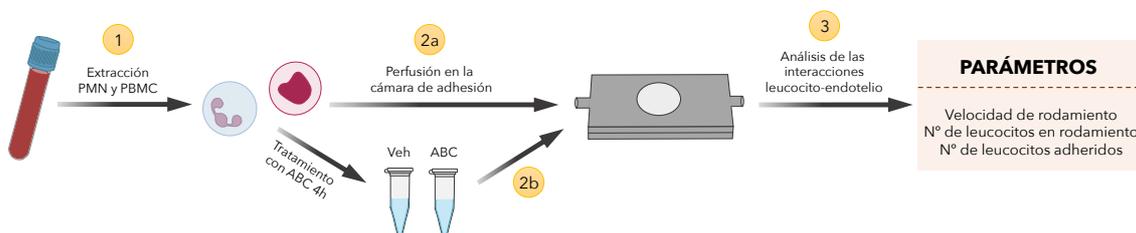


Figura 32. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones leucocito-endotelio en muestras de pacientes infectados por VIH.

1.3.1.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-ENDOTELIO

El estudio de las interacciones de las plaquetas con el endotelio se realizó utilizando una monocapa de HUVEC confluentes cultivadas en cubreobjetos circulares de cristal ya que se va a emplear fluorescencia. En cuanto a las plaquetas empleadas en esta técnica, deben ser marcadas con fluorescencia para poder visualizarlas en el microscopio, ya que por su tamaño no pueden ser visualizadas a simple vista con el objetivo 40x. Para ello, el PRP se incubó en oscuridad durante 30 min a 37°C con un anticuerpo frente a CD41 (marcador específico de plaquetas) conjugado con el marcador fluorescente Alexa®488, que pudo ser detectado gracias a un sistema de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFIE) acoplado al microscopio empleado (**Figura 31**) (215). Tras el tiempo de incubación se realizó la centrifugación para la obtención de las plaquetas lavadas, que ya están preparadas para su uso en la cámara de adhesión.

La solución de plaquetas lavadas y marcadas se perfundieron durante 5 min sobre la monocapa de HUVEC en la cámara de adhesión. A continuación, se realizó un lavado con suero salino durante otros 5 min, con la finalidad de eliminar las plaquetas en suspensión no adheridas a las células endoteliales. Finalmente, para la evaluación de las interacciones plaqueta-endotelio se tomaron imágenes de 5-6 campos diferentes, tanto en campo claro como con fluorescencia. El parámetro analizado para evaluar estas interacciones fue la adhesión de las plaquetas (células/mm²). Al igual que los

leucocitos, las plaquetas se consideran adheridas a las células endoteliales cuando estas permanecen estacionadas sobre la monocapa de células endoteliales durante al menos 30 s.

1.3.1.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Por un lado, el PRP extraído de sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se marcó fluorescentemente con el anticuerpo CD41-Alexa[®]488 y a continuación las plaquetas lavadas se perfundieron directamente en la cámara de flujo (**Figura 33a**).

Por otro lado, las plaquetas - PRP - aisladas de sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron con ABC 5 µg/mL o salino durante 1 h a 37°C, *in vitro* (158,215). Durante los últimos 30 min, se añadió el marcador fluorescente de las plaquetas CD41-Alexa[®]488. Posteriormente, se obtuvieron por centrifugación las plaquetas lavadas, y se perfundieron en la cámara de flujo (**Figura 33b**). En algunos casos, se realizó el tratamiento con ABC tanto de las plaquetas (1 h a 37°C) como de las HUVEC plaquetas (4 h a 37°C) (215), con la finalidad de determinar sobre qué tipo celular actuaba ABC, para inducir estas interacciones.

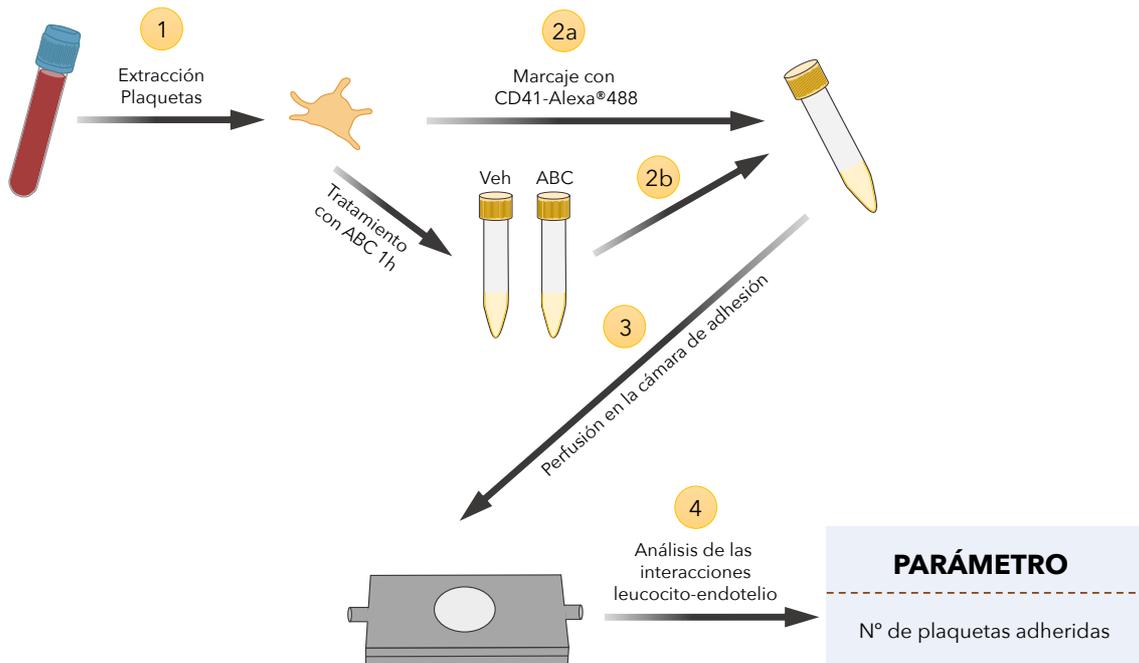


Figura 33. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones plaqueta-endotelio en muestras de pacientes infectados por VIH.

1.3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio de las interacciones de las plaquetas con los leucocitos y la expresión de las diferentes moléculas de adhesión se realizó mediante citometría de flujo. El citómetro de flujo (BD FACSCalibur™) permite identificar las diferentes poblaciones leucocitarias - neutrófilos, monocitos y, linfocitos y restos celulares (**Figura 34A-B**) - y la de plaquetas (**Figura 34C**), de acuerdo con sus características de tamaño y granulosidad (*Forward Scatter [FSC]* y *Side Scatter [SSC]*, respectivamente). Esta identificación queda registrada en histogramas por el *software BD CellQuest™ Pro*. Puesto que en la población de linfocitos también se encuentran plaquetas y otros restos celulares, en los análisis que se exponen a continuación no se evaluó esta población, debido a la incapacidad de distinguir únicamente a los linfocitos (230).

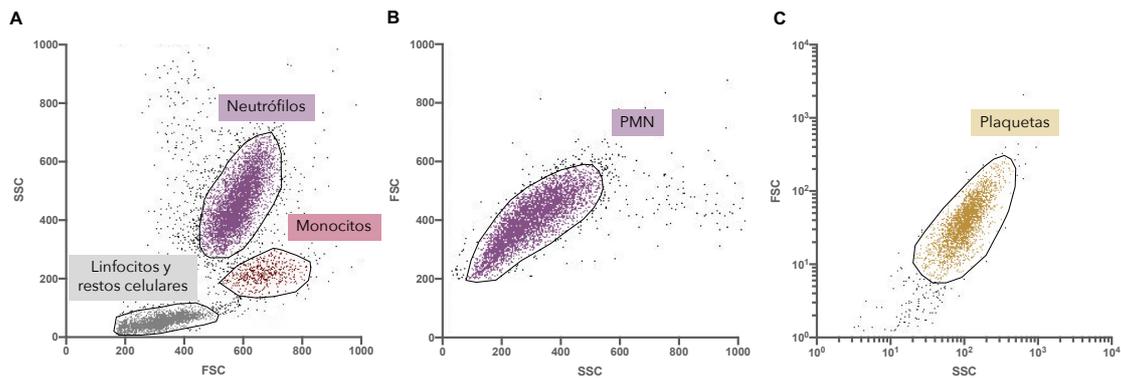


Figura 34. Histogramas de las diferentes poblaciones de células identificadas mediante el citómetro de flujo. **A.** Histograma obtenido a partir de sangre entera en el que se pueden diferenciar: Neutrófilos, monocitos y, linfocitos y restos celulares, en función de sus características de tamaño (*Forward scatter* [FSC]) y granulosidad (*Side scatter* [SSC]). **B.** Población de PMN obtenida a partir de muestras de PMN aislados. **C.** Población de plaquetas.

1.3.2.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO

Para el estudio de las interacciones de las plaquetas con los leucocitos, se empleó el anticuerpo CD41, que como se ha comentado previamente es un marcador específico de plaquetas, conjugado con ficoeritrina (PE). Por tanto, la presencia del anticuerpo CD41 en las poblaciones leucocitarias es un indicativo de la formación de complejos plaqueta-leucocito (224).

1.3.2.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se incubaron en oscuridad durante 30 min con el anticuerpo CD41-PE. Posteriormente, las muestras se lisaron y fijaron con la solución de lisis *FACS Lysing Solution*, para después ser analizadas en el citómetro de flujo (**Figura 35a**).

En el caso de la sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, las muestras se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o salino durante 1 h a 37°C, *in vitro* (158,224). Consecutivamente, las muestras se marcaron con CD41-PE, se lisaron y fijaron tal y como se ha mencionado anteriormente (**Figura 35b**).

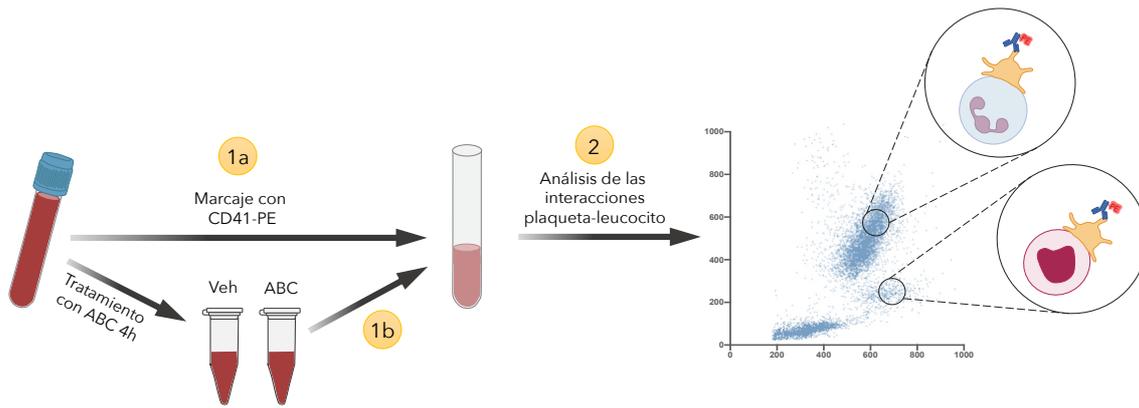


Figura 35. Protocolo experimental para el estudio de las interacciones plaqueta-leucocito en muestras de pacientes infectados por VIH.

Se registraron 10.000 eventos por muestra. Como parámetro se analizó en el caso de la cohorte de pacientes en tratamiento con ABC o con TFV el porcentaje de leucocitos positivos para CD41, lo que indica el número de leucocitos que están formando complejos con las plaquetas. En el caso de la cohorte del tratamiento *in vitro* con ABC se analizó la mediana de fluorescencia que permite evaluar la cantidad de plaquetas adheridas a los leucocitos.

1.3.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LEUCOCITOS

El análisis de las moléculas de adhesión leucocitarias LFA-1, Mac-1, gp150,95, VLA-4 y L-selectina, se realizó por citometría de flujo usando anticuerpos fluorescentes marcados con PE o fluoresceína isotiocianato (FITC) frente a las subunidades que forman estas moléculas de adhesión (CD11a-FITC, CD11b-PE, CD11c-PE, CD18-FITC, CD49d-PE y CD62L-FITC, respectivamente). Las muestras se incubaron con uno de estos anticuerpos en oscuridad durante 30 min. Tras la incubación con los anticuerpos, las muestras se lisaron y fijaron con la solución de lisis *FACS Lysing Solution*, para finalmente ser analizadas en el citómetro de flujo. Se registraron 10.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el correspondiente anticuerpo en las diferentes poblaciones de leucocitos (**Figura 34**).

1.3.2.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Las muestras de sangre entera procedente de los pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se incubaron con los diferentes anticuerpos por separado y tras el lisado y la fijación de las células se analizaron en el citómetro de flujo (**Figura 36a**).

Las muestras de sangre entera procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o salino durante 4 h a 37°C (158,218). Posteriormente, las muestras se marcaron y se lisaron, del mismo modo que se ha explicado anteriormente (**Figura 36b**).

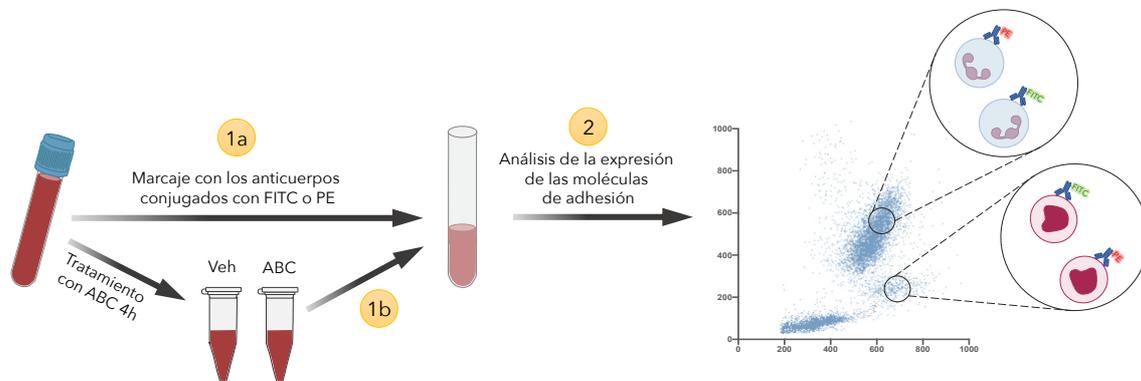


Figura 36. Protocolo experimental para el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias (en neutrófilos y monocitos) en muestras de pacientes infectados por VIH.

1.3.2.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PLAQUETAS

El estudio de la activación plaquetaria se analizó como la expresión de P-selectina, y la expresión de la molécula de adhesión que está implicada en la agregación plaquetaria, GPIIb/IIIa, y se llevó a cabo por citometría de flujo usando anticuerpos fluorescentes marcados con FITC frente a estas moléculas de adhesión (CD62P-FITC y PAC-1-FITC, respectivamente) (215). Se registraron 30.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el correspondiente anticuerpo en la población de plaquetas identificada por el citómetro de flujo (**Figura 34**).

1.3.2.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Las muestras de sangre entera procedente de los pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se incubaron en oscuridad durante 30 min con los diferentes anticuerpos por separado. Posteriormente, las muestras se lisaron y fijaron con la solución de lisis *FACS Lysing Solution*, para después ser analizadas en el citómetro de flujo (**Figura 37a**).

En el caso de las plaquetas - PRP - procedentes de pacientes infectados por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o salino durante 1 h a 37°C (158,215). Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:10 en HBSS y seguidamente se incubaron con los diferentes anticuerpos por separado en oscuridad durante 30 min. Después, las muestras se diluyeron de nuevo 1:10 con HBSS y seguidamente se analizaron en el citómetro de flujo (**Figura 37b**).

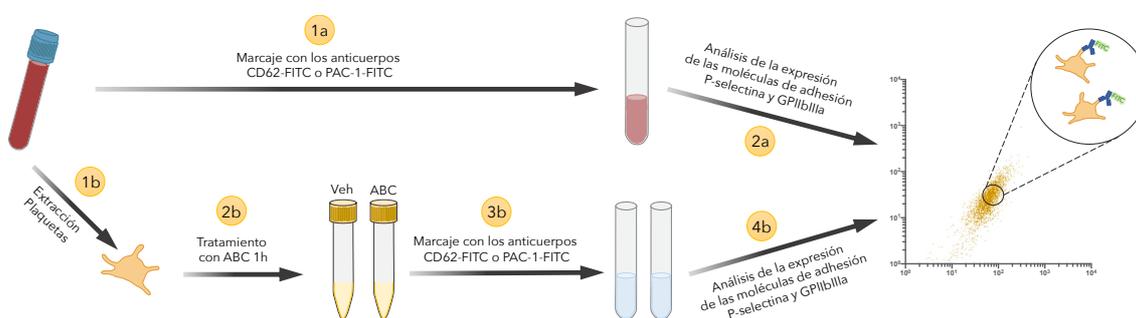


Figura 37. Protocolo experimental para el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión plaquetarias en muestras de pacientes infectados por VIH.

1.3.3. AGREGOMETRÍA

1.3.3.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-PLAQUETA

La agregación plaquetaria se evaluó mediante un agregómetro de impedancia (Chrono-Log Model 590-2D) (**Figura 38A**) (215). Este método se basa en la medición de un cambio en la resistencia eléctrica causado por la formación de agregados plaquetarios sobre una pareja de electrodos de platino (**Figura 38A**).

Para llevar a cabo los ensayos de agregación plaquetaria, las muestras de sangre entera se diluyeron 1:1 con suero salino, y se depositaron en las cubetas del agregómetro colocándose en los respectivos canales de muestras (**Figura 38A**), lo que permite mantener las muestras a 37°C y en agitación. Una vez las muestras están en el agregómetro, este se calibra ajustando al valor de 0% en el registro y tras esto, el electrodo se calibra con un pulso de 20 Ω que se debe ajustar al valor de 50%. En el registro obtenido con el *software AggroLink*[®], la variación de la impedancia que corresponde a la formación de agregados se representa como una curva que parte del nivel basal de cada muestra ajustado al valor de 0% (no hay agregación) y que se irá representando de forma decreciente conforme se vayan formando los agregados plaquetarios (**Figura 38B**). En las curvas registradas se pueden medir los siguientes parámetros (**Figura 38B**):

- **Pendiente:** representa la velocidad de agregación o la intensidad de esta, se mide en Ω/min .
- **Amplitud:** corresponde a la respuesta máxima de la agregación, y se mide en Ω .
- **Área bajo la curva (AUC):** este parámetro unifica los dos anteriores, y se mide en $\Omega \cdot \text{min}$.

Previo a la evaluación de la agregación plaquetaria, una vez el agregómetro está calibrado, las muestras se dejan estabilizar durante 4 min, y transcurrido este periodo se adicionaron los agonistas plaquetarios: ADP (5 μM), colágeno (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o ácido

araquidónico ($0,5 \mu\text{g/mL}$). La respuesta generada sobre la agregación de cada uno de estos agonistas se registró durante 5 min.

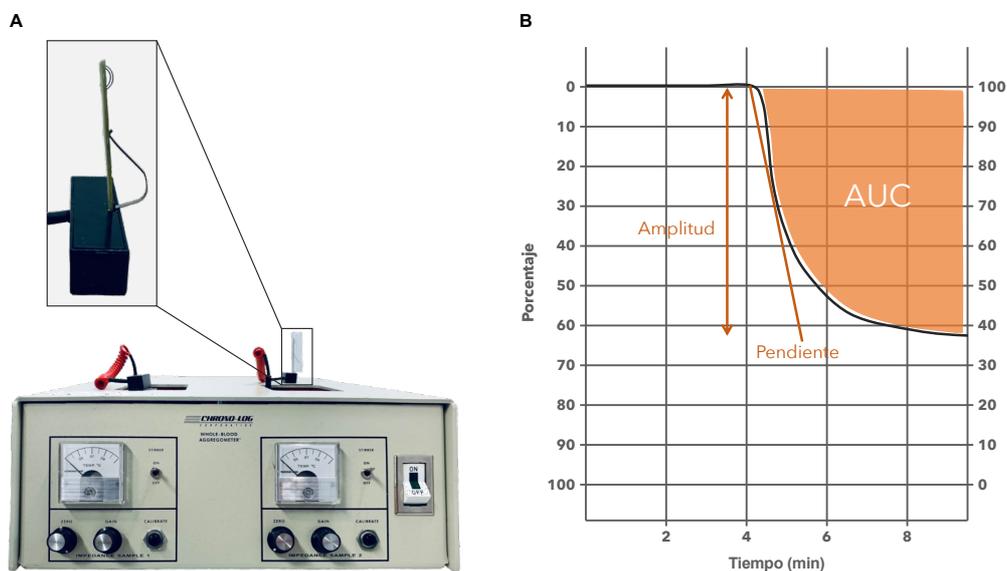


Figura 38. Agregometría de impedancia. A. Vista frontal del agregómetro donde se aprecian los mandos del agregómetro, y en la parte superior los canales para las muestras. Se muestra ampliado el electrodo formado por dos alambres de platino, que permite detectar los agregados plaquetarios. **B.** Registro de la curva de agregación. Se representa la amplitud, la pendiente y el área bajo la curva (AUC) de la respuesta generada por la agregación plaquetaria.

1.3.3.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Por un lado, las muestras de sangre entera procedente de los pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, se procesaron para ser analizadas directamente en el agregómetro de impedancia, con el objetivo de observar las respuestas generadas bajo la influencia de los agonistas plaquetarios (ADP, colágeno y ácido araquidónico) (**Figura 39a**).

Por otro lado, las muestras de sangre entera de pacientes con infección por VIH en tratamiento que no incluyera ABC, se trataron previo al ensayo de agregación con ABC $5 \mu\text{g/mL}$ o salino durante 1h a 37°C , *in vitro* (158,215). A continuación, las muestras se procesaron en el agregómetro de impedancia tal y como se ha comentado anteriormente (**Figura 39b**).

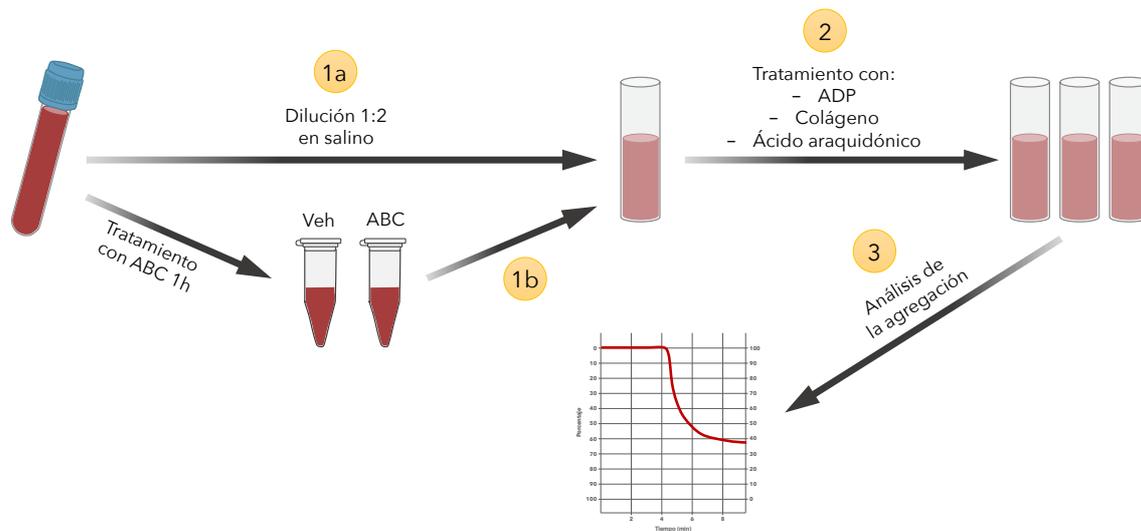


Figura 39. Protocolo experimental para el estudio de la agregación plaquetaria en muestras de pacientes infectados por VIH.

2. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP INDUCEN EFECTOS PRO-TROMBÓTICOS

2.1. COHORTE DE DONANTES

2.1.1. DONANTES NO INFECTADOS POR VIH

Para la caracterización del mecanismo por el que ABC induce efectos pro-trombóticos se emplearon muestras de sangre procedente de donantes sin infección por VIH. Estos donantes se reclutaron del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana y debían cumplir los siguientes requisitos:

- Edad >18 años
- Sin medicación antiinflamatoria al menos 14 días antes de la extracción

2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.2.1. SANGRE

2.2.1.1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS

El aislamiento de los leucocitos, en este caso únicamente PMN, a partir de sangre entera se llevó a cabo del mismo modo que en el estudio de la toxicidad cardiovascular de ABC en pacientes infectados por VIH (Véase apartado 1.2.1.1. *Aislamiento de leucocitos*).

2.2.1.2. EXTRACCIÓN DE PLAQUETAS

La extracción de las plaquetas, en forma de PRP, se realizó tal y como se detalla para el estudio de la toxicidad cardiovascular de ABC en pacientes infectados por VIH (Véase apartado 1.2.1.2. *Extracción de plaquetas*).

2.2.1.3. OBTENCIÓN DE SECRETOMAS

Para la obtención del secretoma liberado por los PMN, se partió de una solución de PMN resuspendidos en suero salino a una concentración de $0,5 \cdot 10^6$ células en $200 \mu\text{L}$. Tras los correspondientes tratamientos de los PMN, estos se centrifugaron (259 g , 6 min), y se recogió el sobrenadante que constituye el secretoma liberado por estos neutrófilos (**Figura 40**) (224).



Figura 40. Obtención de los secretomas. Tras el tratamiento de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en solución salina, las muestras se centrifugan durante 6 min a 259 g . Esta centrifugación permite obtener los PMN en el precipitado, mientras que en el sobrenadante se obtiene el secretoma liberado por estos PMN.

2.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.3.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio de las interacciones de las plaquetas con los leucocitos, la activación plaquetaria, la expresión de los diferentes receptores, la movilización de Ca^{2+} , la producción de ROS y la formación de poros en la membrana celular se realizó mediante la citometría de flujo. Tal y como se ha detallado previamente (Véase apartado 1.3.2. *Citometría de flujo*), el citómetro de flujo (BD FACSCalibur™) permite identificar las diferentes poblaciones leucocitarias - neutrófilos, monocitos y linfocitos y restos celulares (**Figura 34A-B**) - y la de plaquetas (**Figura 34C**), de acuerdo con sus características de tamaño y granulosidad.

2.3.1.1. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO

La adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos se evaluó mediante la misma técnica que en el estudio de la toxicidad cardiovascular de ABC en muestras de pacientes con infección por VIH (Véase apartado 1.3.2.1. *Estudio de las interacciones plaqueta-leucocito*).

2.3.1.1.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para el estudio de los efectos del secretoma liberado por neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) o tratados con ATP (SN_{ATP}), estos secretomas se obtuvieron como se ha descrito previamente (Véase apartado 2.2.1.3. *Obtención de secretomas*). Para ello, los PMN aislados de sangre entera procedente de donantes control (sin infección por VIH), se trataron con ABC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ATP (0,5 - 10 μM), ADP (5 μM) o con salino durante 1 h a 37°C (158,221,224). Tras la incubación, se extrajeron los secretomas y se pusieron en contacto con un conjunto de plaquetas y leucocitos, durante 15 min a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 10 min con el anticuerpo CD41-PE, y después las muestras se fijaron con la solución *FACS Lysing Solution*, para finalmente ser analizadas en el citómetro de flujo. Se registraron 5.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el

anticuerpo en la población de PMN aislados que fueron identificados por el citómetro de flujo (**Figura 41A**).

Con la finalidad de evaluar la implicación de los receptores purinérgicos, y de las ADAM10 y ADAM17 en los efectos inducidos por los secretomas, los PMN fueron pre-tratados previo al tratamiento con ABC o ATP, durante 30 min a 37°C, con los antagonistas de los receptores purinérgicos: P2X₁ (NF449, 100 µM), P2X_{2/3} (A317491, 25 nM), P2X₄ (5-BDBD, 1,5 µM), o P2X₇ (A804598, 1 µM), o con los inhibidores de ADAM10 (GI254023X, 10 µM) y/o ADAM17 (TAPI-1, 2 µM) (**Figura 41B**) (215,220,224,231,232).

Para el estudio de la implicación de LOX-1 en los efectos inducidos por los secretomas, los secretomas fueron pre-tratados, previo a su adición con el conjunto de plaquetas y PMN, durante 30 min a 37°C, con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (10 µg/mL) o con su isotipo control (**Figura 41B**) (117,224).

Por último, para el análisis del mecanismo activado en las plaquetas por los secretomas. Las plaquetas - PRP - fueron pre-tratadas durante 15 min a 37°C, previo a la adición de los secretomas, con los inhibidores de HSP70 (VER-155005, 20 µM) o de la liberación de gránulos (glioxilato, 100 µM), o con los antagonistas del receptor P2X₁ (NF449, 100 µM), P2Y₁ (MRS2500, 100 µM) o P2Y₁₂ (AR-C 66096, 10 µM) (**Figura 41B**) (215,224,233,234).

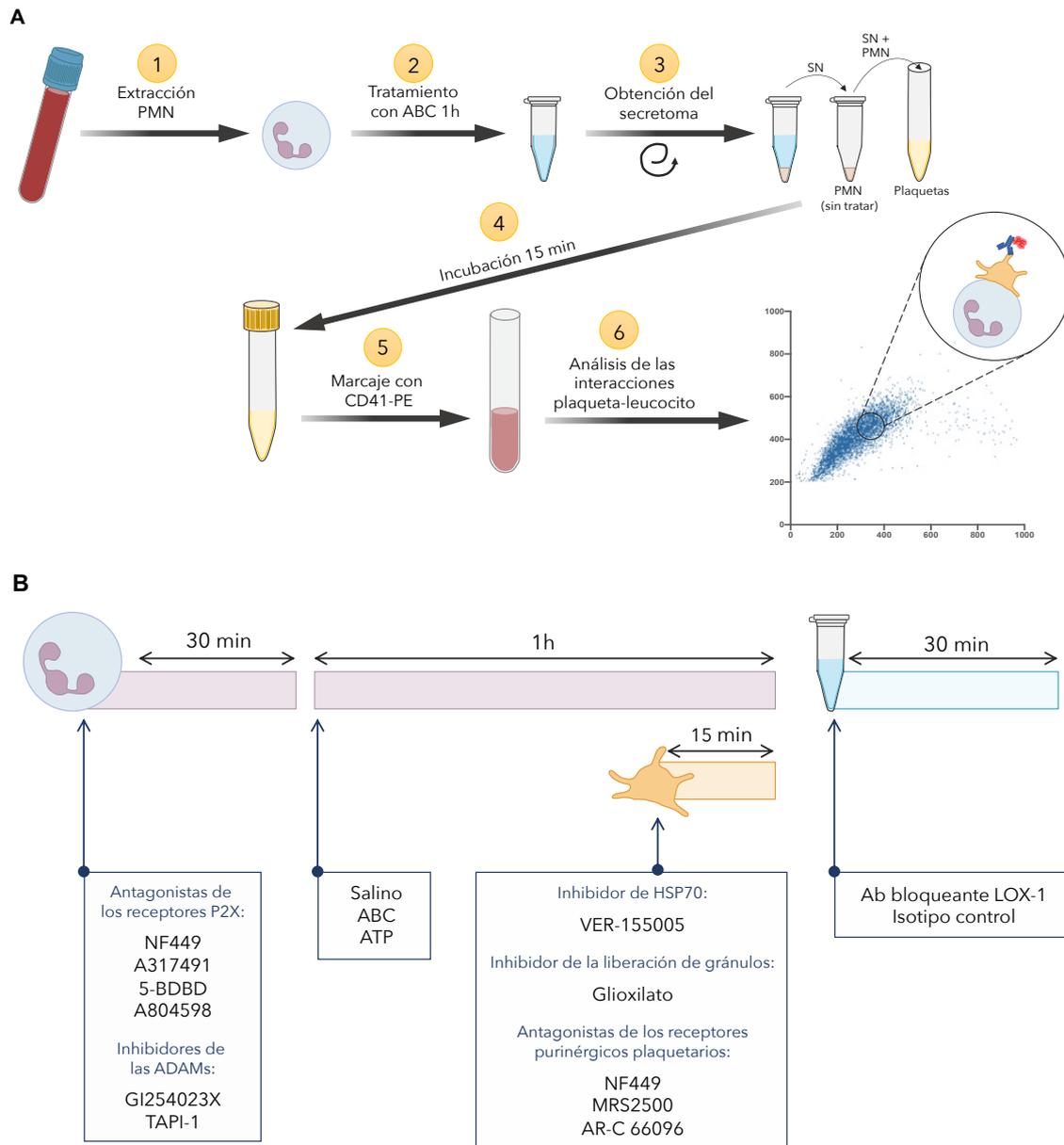


Figura 41. Protocolo experimental para el estudio del mecanismo por el que el secretoma de neutrófilos tratados por abacavir (ABC) induce las interacciones plaqueta-neutrófilo. A. Pasos para el análisis de los efectos del secretoma sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. **B.** Tratamientos de los diferentes tipos celulares para analizar los mecanismos por los que el secretoma induce las interacciones plaqueta-neutrófilo.

2.3.1.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación plaquetaria se analizó como la expresión de P-selectina, tal y como se ha explicado previamente (Véase apartado 1.3.2.3. *Análisis de la activación plaquetaria y de la expresión de moléculas de adhesión en plaquetas*).

2.3.1.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para el estudio de los efectos del SN_{ABC} o SN_{ATP} sobre la activación plaquetaria, estos secretomas se obtuvieron como se describe en el apartado 2.2.1.3. *Obtención de secretomas*. Para ello, los PMN aislados de sangre entera procedente de donantes control (sin infección por VIH), se trataron con ABC (5 µg/mL), o con salino durante 1 h a 37°C, *in vitro* (158,215,224). Tras la incubación, se extrajeron los secretomas y se pusieron en contacto con plaquetas - PRP -, durante 15 min a 37°C. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:10 en HBSS y fueron incubadas en oscuridad durante 10 min con el anticuerpo CD62P-FITC, seguidamente las muestras se diluyeron 1:10 con HBSS, para finalmente ser analizadas en el citómetro de flujo (**Figura 42A**).

Con el fin de evaluar la implicación de los receptores purinérgicos, y de las ADAM10 y ADAM17 en los efectos inducidos por los secretomas, los PMN fueron pre-tratados previo al tratamiento con ABC, durante 30 min a 37°C, con los antagonistas de los receptores purinérgicos: P2X_{2/3} (A317491, 25 nM), o P2X₇ (A804598, 1 µM), o con los inhibidores de ADAM10 (GI254023X, 10 µM) y/o ADAM17 (TAPI-1, 2 µM) (**Figura 42B**) (215,224,231,232).

Para el estudio de la implicación de LOX-1 en los efectos inducidos por los secretomas, los secretomas fueron pre-tratados, previo a su adición sobre plaquetas, durante 30 min a 37°C, con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (10 µg/mL) o con su isotipo control (**Figura 42B**) (117,224).

Por último, para el análisis del mecanismo activado en las plaquetas por los secretomas. Las plaquetas fueron pre-tratadas durante 15 min a 37°C, previo a la adición de los secretomas, con los inhibidores de HSP70 (VER-155005, 20 µM) o de la liberación de gránulos (glioxilato, 100 µM), o con los antagonistas del receptor P2X₁ (NF449, 100 µM), P2Y₁ (MRS2500, 100 µM) o P2Y₁₂ (AR-C 66096, 10 µM) (**Figura 42B**) (215,224,233,234).

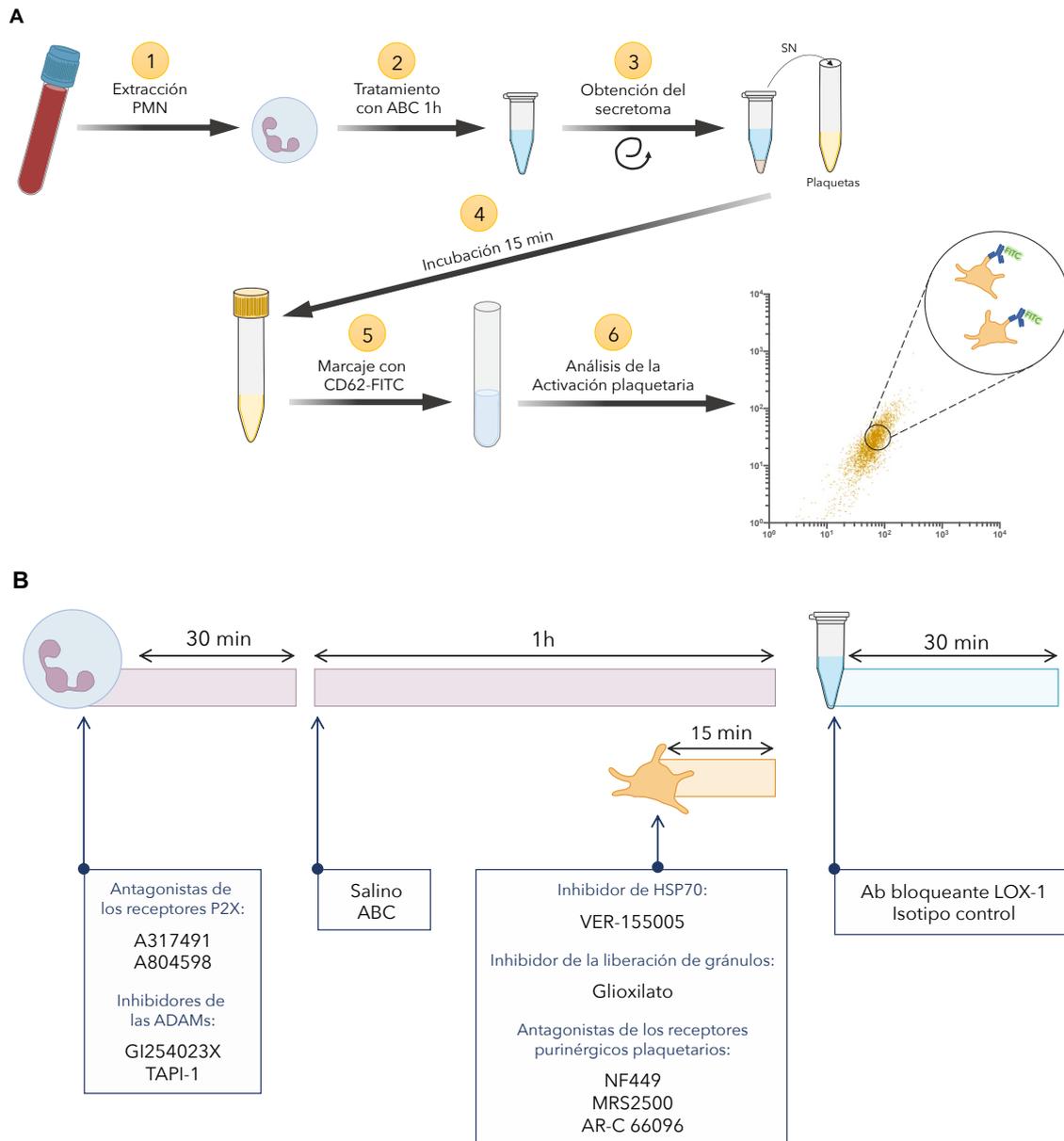


Figura 42. Protocolo experimental para la evaluación de los mecanismos por los que el secretoma de neutrófilos tratados con abacavir (ABC) induce la activación. A. Pasos para el análisis de los efectos del secretoma sobre la activación plaquetaria. **B.** Tratamientos de los diferentes tipos celulares para analizar los mecanismos por los que el secretoma induce la activación plaquetaria.

2.3.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X₇, LOX-1, ADAM10 Y ADAM17

El análisis de la expresión del receptor purinérgico P2X₇, el receptor LOX-1, y las metaloproteasas ADAM10 y ADAM17, se llevó a cabo por citometría de flujo empleando anticuerpos fluorescentes frente a cada uno de estos receptores, específicamente P2X₇-FITC, LOX-1-FITC, ADAM10-PE y ADAM17-PE,

respectivamente (224,235). Las muestras - sangre entera, en el caso del estudio de la expresión de P2X₇, LOX-1, ADAM10 y ADAM17 en leucocitos, o el PRP (diluido 1:10 en HBSS) para el análisis de la expresión de P2X₇ y LOX-1 en plaquetas - se incubaron con uno de estos anticuerpos en oscuridad durante 30 min. Tras la incubación con los anticuerpos, las muestras, o bien se lisaron y fijaron con la solución de lisis *FACS Lysing Solution* en el caso de la sangre entera, o bien se diluyeron con HBSS en el caso del análisis del PRP, para finalmente ser analizadas en el citómetro de flujo. Se registraron 10.000 y 30.000 eventos por muestra en sangre entera y PRP, respectivamente. Por último, se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el correspondiente anticuerpo en las diferentes poblaciones de leucocitos o en la población de plaquetas.

Para evaluar los efectos de ABC y ATP sobre de la expresión del receptor P2X₇, LOX-1, ADAM10 y ADAM17 en leucocitos o plaquetas, las muestras de sangre entera o PRP se trataron con ABC (0,5 - 10 µg/mL), ATP (0,5 - 10 µM), PAF (1 µM) o con salino durante 1 h o 4 h a 37°C, y en algunos casos se pre-trató la sangre entera con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) durante 30 min (221,224).

2.3.1.4. EVALUACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO

La movilización de Ca²⁺ en PMN se analizó por citometría de flujo utilizando el marcador FLUO-4 acetoximetil éster (AM) (215). Este marcador, tras su internalización en las células, permite detectar los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular, ya que las esterasas intracelulares escinden el grupo AM, que en presencia de Ca²⁺ emite fluorescencia.

Para la evaluación de la movilización de Ca²⁺, los PMN aislados de donantes control (sin infección por VIH) fueron tratados con ABC (0,5 - 10 µg/mL), ATP (0,5 - 10 µM) o con salino durante 1 h a 37°C, y en algunos casos los PMN se pre-trataron con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) durante 30 min. El marcador FLUO-4

AM (5 μM) se añadió tras el tiempo de tratamiento y se dejó incubar durante 30 min. Tras esta incubación los PMN se fijaron con la solución *FACS Lysing Solution*, para finalmente ser analizados en el citómetro de flujo. Se registraron 5.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el marcador en la población de PMN, identificada por el citómetro de flujo.

2.3.1.5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La producción de ROS en leucocitos se evaluó por citometría de flujo utilizando el marcador 1,2,3-Dihidrorodamina (236). Este marcador, tras su internalización en las células, permite detectar la producción de ROS, puesto que en su presencia se convierte en una molécula fluorescente.

Para el estudio de la producción de ROS en leucocitos, la sangre entera procedente de donantes control (sin infección por VIH) fue tratada con ABC (0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ATP (0,5 - 10 μM) o con salino durante 1 h a 37°C, y en algunos casos pre-tratada con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μM) durante 30 min. Tras el tratamiento de la sangre, se añadió el marcador 1,2,3-Dihidrorodamina (50 μM) incubando las muestras en oscuridad durante 20 min a 37°C. Seguidamente, las muestras se colocan en hielo durante 10 min para inactivar la reacción. Posteriormente, la sangre entera se lisó y fijó con la solución *FACS Lysing Solution*, para finalmente analizar la fluorescencia de 1,2,3-Dihidrorodamina en el citómetro de flujo. Se registraron 10.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el marcador en la población de neutrófilos, identificada por el citómetro de flujo.

2.3.1.6. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA CELULAR

La formación de poros en la membrana celular de los PMN se analizó por citometría de flujo utilizando el marcador de alto peso molecular YO-PRO-1 (237). Este marcador es un indicador de la formación de poros puesto que es incapaz de atravesar la

membrana plasmática intacta, mientras que, si se produce la formación o apertura de poros suficientemente grandes YO-PRO-1 puede atravesar la membrana e internalizarse en las células, permitiendo así detectar la fluorescencia que emite.

Para la evaluación de la internalización de YO-PRO-1 - indicativo de la formación de poros en la membrana - los PMN aislados de donantes sin infección por VIH fueron tratados con ABC (0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ATP (0,5 - 10 μM) o con salino durante 1 h a 37°C, y en algunos casos los PMN se pre-trataron con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μM) durante 30 min. El marcador YO-PRO-1 (10 μM) se añadió durante la hora de incubación con los fármacos. Tras esta incubación los PMN se fijaron con la solución FACS Lysing Solution, para finalmente ser analizados en el citómetro de flujo. Se registraron 5.000 eventos por muestra, y se analizó la mediana de fluorescencia emitida por el marcador en la población de PMN, identificada por el citómetro de flujo.

2.3.2. PROTEÓMICA

2.3.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de la composición de los secretomas liberados por el efecto de ABC, los PMN extraídos de donantes control (sin infección por VIH) se pre-trataron con el antagonista del receptor P2X₇, A804598 1 μM , o con salino durante 30 min a 37°C. Tras este periodo de incubación, los PMN se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o con salino durante 1h a 37°C. Por otro lado, para el estudio de la composición de los secretomas liberados por el efecto de ATP, los PMN se trataron con ATP 5 μM o con salino durante 1h a 37°C. Finalizado el tiempo de tratamiento se recogieron los secretomas, tal y como se explica en el apartado 2.2.1.3. *Obtención de secretomas*.

Previo al análisis de proteómica se debe cuantificar la cantidad de proteína presente en cada muestra, para ello se empleó el método de Bradford. Este es un método colorimétrico basado en el cambio de color del colorante empleado cuando este se une a las proteínas. Por lo tanto, la cuantificación proteica se realizó determinando la

absorbancia de la solución a 595 nm utilizando un espectrofotómetro de placas (Multiskan™ Ascent 354, Thermo Fisher), y para determinar la concentración específica de cada muestra se empleó una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA 31,25-1000 µg/mL).

2.3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS SECRETOMAS

El estudio de la composición del secretoma liberado por PMN se realizó en el servicio de Proteómica perteneciente al Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia.

Para realizar este análisis, 10 µg de proteína por muestra se sometieron a una digestión enzimática con tripsina. El resultante de la digestión se analizó por cromatografía líquida empleando una columna C18-CL de fase reversa (3 µm C18-CL, 75 µm · 0,5 mm, Nikon) acoplado a dos espectrómetros de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, Absciex) (LC-MS/MS). Las señales generadas por los péptidos eluidos se registraron mediante el *software Peak View*®. Posteriormente, las secuencias de los péptidos se identificaron con sus correspondientes proteínas mediante el *software ProteinPilot*®, que realizó una búsqueda de las proteínas detectadas en cada una de las muestras por separado, y también una búsqueda común con las proteínas detectadas en todas las muestras. Los péptidos que alcanzaron un valor $\geq 95\%$ de confianza en su identificación proteica, se seleccionaron para obtener los niveles en el secretoma de su proteína correspondiente, mediante el *software Marker View*® con el que se obtuvo el área de cada péptido (224,238).

2.3.2.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Una vez identificadas las proteínas, con el repositorio central de datos sobre proteínas *UniProt* se realizó la búsqueda para obtener la información disponible sobre la función de las proteínas seleccionadas.

Por otro lado, mediante la base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID) se realizó el análisis con las proteínas seleccionadas para obtener los términos *gene ontology* (GO) que definen los componentes celulares a los que pertenecen las proteínas, y las funciones biológicas y moleculares alteradas por los diferentes tratamientos (239,240).

2.3.3. ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

2.3.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de los niveles de IL-1 β en los secretomas liberados por el efecto de ABC o de ATP, los PMN extraídos de donantes control (sin infección por VIH) se trataron con ABC (0,5 - 10 μ g/mL), ATP (0,5 - 10 μ M), o con salino durante 4h a 37°C (158,221). Transcurrido este periodo se recogieron los secretomas, tal y como se detalla en el apartado 2.2.1.3. *Obtención de secretomas*.

2.3.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA 1 β (IL-1 β)

Los niveles de IL-1 β se analizaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), empleando el kit comercializado por Invitrogen, y siguiendo sus indicaciones. El ensayo consiste en depositar las muestras o los patrones con concentraciones conocidas de la proteína en la placa pre-tratada con los anticuerpos de captura para la IL-1 β , y añadir consecutivamente el anticuerpo de detección conjugado con biotina. La placa se incubó durante al menos 12 h a temperatura ambiente con los secretomas y el anticuerpo de detección. Tras una serie de lavados para eliminar las proteínas y los anticuerpos que no se habían unido, se añadió la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa, y se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, permitiendo así que la estreptavidina se una a la biotina presente en los anticuerpos de detección. Posteriormente, tras una nueva serie de lavados se añadió una solución de biotinil-tiramida, para amplificar la señal generada, y se incubó en agitación y oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, de nuevo tras unos lavados se añadió una nueva solución de amplificación, que en este caso contiene, de nuevo, estreptavidina conjugada con

peroxidasa. Esta se unirá a la nueva biotina generada en la reacción anterior, incubando en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se realizaron los últimos lavados y se añadió el sustrato para la reacción de la peroxidasa, la tetrametilbenzidina, incubando la placa en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió una solución con ácido fosfórico para cesar la reacción de la peroxidasa, y subsecuentemente se realizó la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro de placas (Multiskan™ Ascent 354, Thermo Fisher) a 450 y 620 nm. Los valores de absorbancia de cada muestra se obtuvieron restando la absorbancia a 620 nm a la de 450 nm.

2.3.4. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El estudio de los efectos de ABC y ATP sobre la liberación de NETs se realizó mediante la técnica de inmunocitoquímica con PMN aislados de sangre procedente de donantes control (sin infección por VIH). Para la detección específica de NETs es indispensable realizar un marcaje conjunto de al menos dos marcadores típicos de la liberación de las NETs, por ello en este caso se empleó el doble marcaje del ADN de las NETs - mediante el DAPI - y la MPO - mediante el anticuerpo frente a esta proteína conjugado con FITC - que es una proteína que está típicamente unida a la estructura de las NETs (241).

2.3.4.1. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NETs

En primer lugar, los PMN aislados se depositaron, a una concentración de $4 \cdot 10^5$ células/mL, sobre los pocillos de una placa de 24 pocillos, con cubreobjetos circulares de 10 mm de diámetro. La placa se incubó durante 15 min a 37°C, para permitir que los PMN se adhirieran a los cubreobjetos. Una vez se había comprobado en un microscopio invertido que los PMN estaban adheridos, las células se trataron con ABC (5 - 10 μ g/mL), ATP (5 - 10 μ M), PMA (100 nM), ionomicina (1 μ M) o con salino durante 1 h o 4 h a 37°C. Transcurrido el periodo de tratamiento, se realizaron lavados consecutivos de 10 min con PBS, con 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS, y con

0,05% de Tritón X-100 en PBS. Tras estos lavados se realizó la fijación de los neutrófilos con PFA (4%) durante 10 min, después se realizó otro lavado con PBS y consecutivamente se añadió la solución de bloqueo (constituida por 5% de BSA, 5% de suero de asno y 0,05% de Tritón X-100) y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se añadió el anticuerpo frente a MPO conjugado con FITC, y se incubaron las muestras en oscuridad durante al menos 12 h a 4°C. Tras el marcaje con el anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS, posteriormente se añadió DAPI (0,25 µg/mL) y se incubaron las muestras en oscuridad durante 2 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos nuevos lavados con PBS de 5 min, y finalmente se procedió al montaje de los cubreobjetos sobre los portaobjetos con el medio de montaje ProLong™ Diamond Antifade (241). Por último, las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Leica DMI8) con los objetivos 20x y 40x, y para proceder al análisis de las NETs, mediante el *software* Leica LAS X se tomaron imágenes de 5-6 campos diferentes por muestra, y con cada uno de los láseres necesarios para la detección del DAPI y de la señal emitida por el anticuerpo MPO-FITC.

3. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP PROMUEVEN LA TROMBOSIS EN UN MODELO *IN VIVO*

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los ratones empleados en este estudio fueron de la cepa *wild-type* C57BL/6, machos, de unas 9 semanas de edad, y de entre 20-30 g de peso (procedentes de la compañía Charles River). Estos ratones se estabularon en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universidad de Valencia, bajo condiciones estandarizadas de ventilación, luz y temperatura, y con alimento y agua *ab libitum*.

3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.2.1. MICROSCOPIA INTRAVITAL

La evaluación de los efectos y los mecanismos inducidos por ABC y ATP en la formación de trombos en un modelo murino *in vivo* se realizó mediante microscopía intravital, empleando un microscopio ortostático (Nikon Optiphot-2 SMZ1) que disponía de un objetivo 20x y un ocular 10x, acoplado a una cámara (Nikon DS-Fi3) que permite registrar las imágenes mediante el *software NIS-Elements Basic Research (Figura 43)*.

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (100mg/kg), administrada vía intraperitoneal (225). Una vez anestesiado el ratón, este se colocó en posición supina y se realizó una incisión en la zona testicular para extraer el testículo y extender el músculo cremastérico sobre un pedestal translúcido (**Figura 43**). Para garantizar la viabilidad del tejido expuesto, se perfundió de forma continua durante todo el proceso una solución salina tamponada con bicarbonato (pH 7,4, 37°C, 2 mL/min), mediante una bomba de infusión (Isco Pump/Diluter/Dispenser Model WIZ) y un baño termostático. Con el tejido cremastérico expuesto, el pedestal se coloca sobre el microscopio para visualizar y seleccionar las arteriolas a evaluar. Las arteriolas debían de tener un diámetro entre 20 - 35 μm .

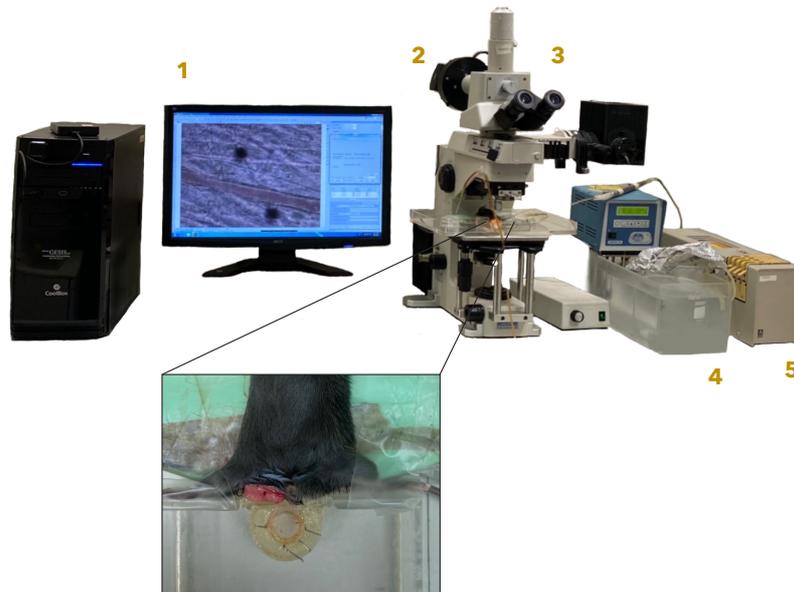


Figura 43. Equipo de microscopía intravital. El equipo necesario está formado por: 1. Ordenador con el software *NIS-Elements Basic Research*; 2. Videocámara; 3. Microscopio ortostático; 4. Baño termostático; 5. Bomba de infusión. Se muestra ampliada la zona donde se encuentra el cremáster expuesto sobre el pedestal translúcido, donde se observan algunos microvasos.

3.2.1.1. MODELO DE TROMBOSIS *IN VIVO*

Para evaluar los efectos de ABC y ATP sobre la formación de trombos se desarrolló un modelo murino de trombosis inducido por FeCl_3 (225,242,243). Este modelo está ampliamente descrito y es uno de los modelos murinos de trombosis más empleados y validados (244). El FeCl_3 actúa produciendo daño endotelial, ya que induce la liberación de ROS que da lugar a la disfunción endotelial (245).

La concentración de FeCl_3 empleada fue de 25 mM, ya que en estudios previos se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de FeCl_3 (25 - 100 mM) y se comprobó que esta concentración (25 mM) no producía la formación de trombos *per se* (**Figura 44**) (225). Por lo que, para este estudio en el que se pretende evaluar si ABC y ATP son capaces de inducir la formación de trombos, se requería de una concentración de FeCl_3 que no indujera *per se*, sino que predispusiera a la formación de trombos de otros agentes o afecciones con potenciales efectos trombogénicos que *per se* tampoco son capaces de inducir estos efectos.

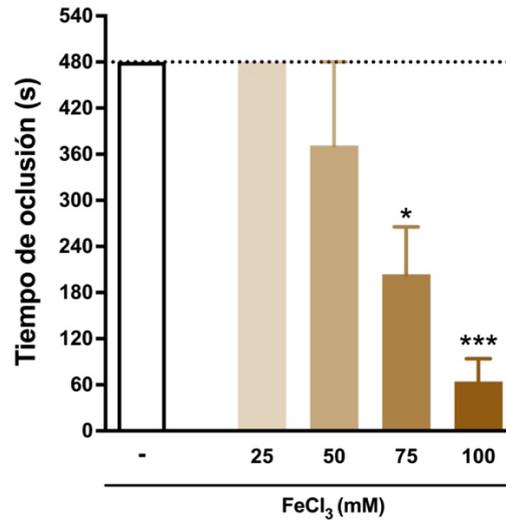


Figura 44. Curva dosis-respuesta de FeCl₃. El cremáster de los ratones fue exteriorizado y se superfundió con 80 μ L de FeCl₃ (25-100 mM). Las arteriolas seleccionadas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min. Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media \pm EEM, (n \geq 4). *p<0,05 o ***p<0,001 con respecto al vehículo (test de Kruskal-Wallis).

Para evaluar el efecto de ABC y ATP sobre la formación de trombos, se llevó a cabo, por un lado, un modelo de tratamiento agudo en el que se inyectó ABC (5 μ g/mL, 4 h) a los ratones por vía intraescrotal; mientras que ATP (0,1 - 1 μ M, 1 h) y rofecoxib (0,1 mg/Kg, 2 h) fueron inyectados por vía intraperitoneal (225). Con la finalidad de estudiar los mecanismos implicados en la trombosis inducida por estos fármacos, en algunos casos los ratones fueron pre-tratados durante 30 min vía intraperitoneal con: diferentes antagonistas de los receptores purinérgicos - P2X₁ (NF449, 10 mg/kg), P2X_{2/3} (A317491, 0,1 μ g/kg), P2X₄ (5-BDBD, 1 mg/kg), P2X₇ (A804598, 1 μ g/kg), P2Y₁ (MRS2500, 2 mg/kg), P2Y₁₂ (clopidogrel, 8,5 mg/kg) -, el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (100 μ g/mL) o con su control del isotipo, con un inhibidor de HSP70 (VER-155008, 50 mg/kg), con un inhibidor de la liberación de gránulos (clodronato, 10 mg/kg), o con DNasa I (1000 U/mL) (**Figura 45**) (224,225,246-248).

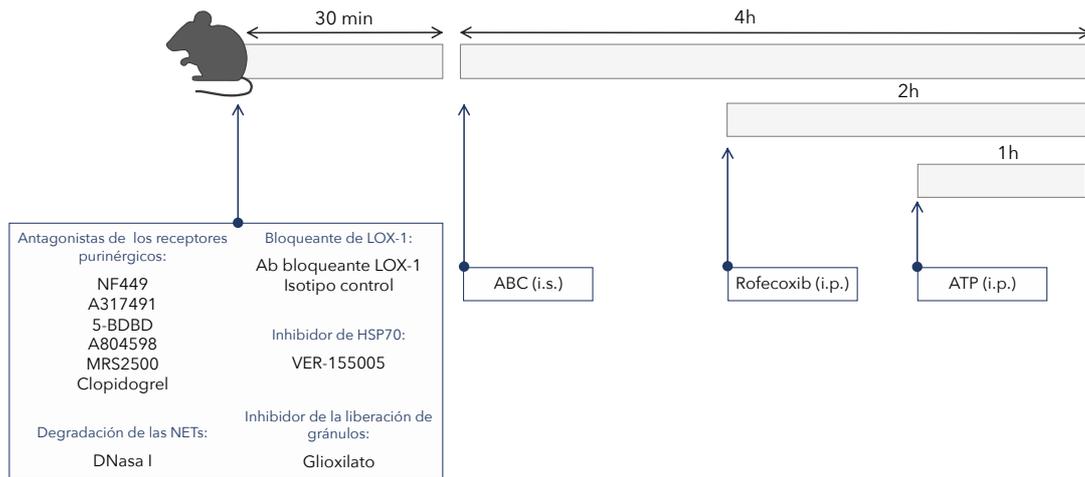


Figura 45. Protocolo experimental del tratamiento agudo en el modelo murino de trombosis. Los ratones se pre-tratan, durante 30 min, en cada caso con el antagonista, inhibidor o anticuerpo bloqueante correspondiente, y posteriormente se inyecta o bien abacavir (ABC) (4h) por vía intraescrotal (i.s.), o adenosina trifosfato (ATP) (1h) por vía intraperitoneal (i.p.), o rofecoxib (2h) por vía intraperitoneal.

Por otro lado, en el modelo de tratamiento crónico, los ratones fueron tratados diariamente durante 1 mes con ABC (3 mg/día) por administración oral, equivalente a la dosis del tratamiento humano⁶, o con ATP (0,5 µM) por vía intraperitoneal (249,250). En este modelo, algunos ratones también fueron tratados vía intraperitoneal con un antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µg/kg) o con el anticuerpo bloqueante frente a LOX-1 (100 µg/mL).

Transcurrido el tiempo de tratamiento del modelo agudo o al día siguiente de la finalización del mes de tratamiento en el modelo crónico, se realizó la cirugía descrita previamente a los ratones y, posteriormente, se comenzó a grabar la zona del cremáster con la arteriola seleccionada y en ese momento se perfundieron 80 µL de FeCl₃ 25 mM sobre la arteriola seleccionada (225). Las imágenes para evaluar la formación de trombos se registraron hasta que se produjo la oclusión del vaso o hasta un máximo de 8 min si esto no se producía. La formación de trombos se evaluó mediante el parámetro de tiempo de oclusión que es el tiempo en segundos requerido para que se produjera el cese del flujo en las arteriolas. Por tanto, un tiempo de oclusión de 480 s – que corresponde al tiempo máximo de grabación – indica que en esos animales no hubo formación de trombos.

⁶ $Dosis\ animal\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = dosis\ humana\ \left(\frac{mg}{kg}\right) \cdot \frac{km\ humano}{km\ animal}$; donde $km\ humano = 37$ y $km\ ratón = 3$

4. MATERIAL

4.1. ANTICUERPOS Y MARCADORES FLUORESCENTES

Los anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados en el desarrollo experimental se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados.

Anticuerpos y marcadores fluorescentes	Casa comercial
CD41 purificado LOX-1-FITC Ac bloqueante frente a LOX-1 Humano Isotipo control del Ac bloqueante frente al LOX-1 Humano MPO-FITC	Abcam
CD11a-FITC CD11b-PE CD11c-PE CD18-FITC CD49d-PE CD62L-FITC CD62P-FITC PAC-1-FITC CD41-PE	BD Bioscience
1,2,3-Dihidrorodamina YO-PRO-1	Beckman Coulter
Alexa® 488 FLUO-4 AM	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific
ADAM10-PE ADAM17-PE Ac bloqueante frente a LOX-1 Murino Isotipo control del Ac bloqueante frente al LOX-1 Murino	Life Technologies™ Thermo Fisher Scientific
P2X ₇ -FITC DAPI	R&D Systems
	Sigma-Aldrich

LOX-1: Receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada; FITC: Fluoresceína isotiocianato; PE: Ficoeritrina; AM: Acetoximetil éster; ADAM: Desintegrinas y metaloproteinasas.

4.2. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Los fármacos, antagonistas e inhibidores empleados para el tratamiento de las células se detallan en la **Tabla 5**. El ABC utilizado en el tratamiento crónico del modelo animal se obtuvo a partir del fármaco Ziagen® (ABC 300 mg) obtenido a través del servicio de farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El resto de los reactivos y materiales específicos necesarios para el desarrollo experimental se recogen en las **Tabla 6** y **Tabla 7**, respectivamente.

Tabla 5. Fármacos, antagonistas e inhibidores utilizados en el tratamiento de las células.

Fármacos, antagonistas e inhibidores	Casa comercial
TAPI-1	Abcam
Ácido araquidónico	
ADP	Chrono-Log
Colágeno	
ABC	Sequoia Research Products
A317491	
ATP	
Clodronato	
DNasa I	Sigma-Aldrich
Glioxilato	
Ionomicina	
PMA	
Rofecoxib	
5-BDBD	
A804598	
AR-C 66096	
Clopidogrel	Tocris
GI254023X	
MRS2500	
NF449	
VER-155005	

ADP: Adenosina difosfato; ABC: Abacavir; ATP: Adenosina trifosfato; PMA: Forbol miristato acetato.

Tabla 6. Reactivos empleados.

Reactivos	Casa comercial
FACS Lysing Solution	BD Bioscience
Suero Fisiológico	Braun
Albúmina sérica bovina	Fisher Scientific
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare
Colagenasa	
PBS	
Tripsina	Gibco™
Azúl de tripano	Thermo Fisher Scientific
Penicilina/streptomicina/ anfotericina	
HBSS con rojo fenol	
ProLong™ Diamond Antifade	Invitrogen™
Kit de ELISA de alta sensibilidad de IL-1 beta humana	Thermo Fisher Scientific
DPBS+	
DPBS-	
HBSS	Lonza
EBM-2	
Suero Fetal bovino	
Ketamina	Merial
Triton X-100	
MgSO ₄	
NaHCO ₃	
NH ₄ Cl	
EDTANa ₂ ·4H ₂ O	Panreac Química
HCl	
NaCl	
KCl	
Reactivo de Bradford	Pierce™ Thermo Fisher Scientific
Suero salino	
Paraformaldehído	
FeCl ₃	
Dextrano	
DMSO	Sigma-Aldrich
Fibronectina	
RPMI 1640	
Xilacina	
Suero de asno	
Albúmina sérica humana	

PBS: Tampón de fosfato salino; HBSS: Solución salina de Hanks equilibrada; DPBS+: Solución salina tampona de Dulbecco con Ca²⁺ y Mg²⁺; DPBS-: Solución salina tampona de Dulbecco sin Ca²⁺ ni Mg²⁺; EBM-2: Medio basal de células endoteliales; DMSO: Dimetilsulfóxido.

Tabla 7. Material específico utilizado.

Material	Casa comercial
Tubos con citrato sódico	BD Vacutainer
Cubreobjetos circulares de 10 mm de diámetro	Karl Hecht™ Thermo Fisher Scientific
Cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro de plástico	Nunc™ Thermo Fisher Scientific
Cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro de cristal	

5. COMITÉS ÉTICOS

En primer lugar, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valencia, y el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia evaluaron y aprobaron los proyectos en los que se enmarca los estudios de la presente Tesis Doctoral que incluyen muestras biológicas de origen humano. Asimismo, todos los donantes y pacientes que participaron en el estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado.

En segundo lugar, el Comité de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia, bajo la supervisión de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana, evaluó y aprobó los estudios con animales de experimentación incluidos en la presente Tesis Doctoral, certificando que cumplían la normativa vigente relativa al Real Decreto 53/2013.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM); y en algunas ocasiones los resultados se representaron como porcentaje (%) del valor obtenido para el vehículo o control empleado, considerándose este el 100% (224). En cuanto al tamaño muestral fue variable entre los experimentos, indicándose en cada caso en las figuras presentadas en el apartado IV. Resultados.

En el estudio de la cohorte que analiza pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC o TFV, y donantes sin infección por VIH se emplearon las siguientes pruebas estadísticas: ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación múltiple T3 de Dunnett - en las comparaciones de los tres grupos del estudio-, t test paramétrico no pareado con la corrección de Welch - en las comparaciones de dos de los grupos del estudio -, y Chi-cuadrado - en las comparaciones de los parámetros demográficos cualitativos -.

En el caso de la cohorte en la que se evalúan los efectos de ABC *in vitro* sobre muestras de pacientes infectados por VIH se usó t test paramétrico pareado para las comparaciones entre los dos grupos experimentales, y cuando hubo más de dos grupos para comparar se utilizó ANOVA paramétrico de una vía de medidas repetidas con la corrección de Greisser-Greenhouse y con el test de comparación múltiple de Tukey.

Por otro lado, en los ensayos *in vitro*, en los que los datos están normalizados respecto al valor control, y en el modelo animal *in vivo*, dado que estos datos presentaron una distribución no normal se usó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. En el análisis de los datos obtenidos por proteómica se evaluó la distribución de los datos mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk, y puesto que se observó que los datos seguían en su mayoría una distribución no normal, se empleó el test no paramétrico pareado de Friedman. Por último, la clasificación de las muestras de los estudios de proteómica se realizó, por un lado, mediante el análisis de componentes principales

- conocido como PCA - y, por otro lado, por el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales - conocido como PLS-DA -.

El análisis estadístico de los datos y su visualización se realizó mediante los *softwares* *GraphPad Prism*, *Microsoft Excel* y *RStudio*, y las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, indicándose en cada una de las figuras.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE ABACAVIR EN DIFERENTES COHORTES DE PACIENTES INFECTADOS POR VIH

1.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON ABACAVIR Y TENOFOVIR

1.1.1. TRATAMIENTO Y PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LOS PARTICIPANTES DE LA COHORTE

Esta cohorte la conforman un total de 88 individuos: 60 fueron pacientes con infección por VIH, 27 de los cuales incluían ABC en su tratamiento antirretroviral y 33 TFV; los 28 restantes fueron donantes no infectados por VIH, en adelante donantes control. La terapia y los diferentes fármacos que recibe cada paciente se muestran en la **Tabla 8**. Ninguno de los pacientes de la cohorte estaba recibiendo tratamiento con antihipertensivos, con estatinas o para la diabetes. En cuanto a las características demográficas y los parámetros de riesgo cardiovascular, no se observaron diferencias entre los dos grupos de pacientes (**Tabla 9**).

Tabla 8. Tratamiento y fármacos antirretrovirales de los pacientes que conforman la cohorte.

Número de pacientes	Grupo	Tratamiento (Nombre comercial)	Composición	
			ITIAN	Otros
25	ABC	Triumeq®		DTG
1		Kivexa® + Isentress®	ABC + 3TC	RTG
1		Kivexa® + Reyataz®		ATZ
13	TFV	Genvoya®		EVG/c
2		Symtuza®		DRV/c
4		Descovy® + Rezolsta®	TAF + FTC	DRV/c
1		Descovy® + Tivicay®		DTG
1		Descovy® + Isentress®		RTG
1		Truvada® + Tivicay®		DTG
1		Truvada® + Isentress®	TDF + FTC	RTG
10		Eviplera®		RPV

ITIAN: Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido; ABC: Abacavir; TFV: Tenofovir; 3TC: Lamivudine; TAF: Tenofovir alafenamide; FTC: Emtricitabine; TDF: Tenofovir disoproxil fumarate; DTG: Dolutegravir; RTG: Raltegravir; ATZ: Atazanavir; EVG/c: Elvitegravir potenciado con cobicistat; DRV/c: Darunavir potenciado con cobicistat; RPV: Rilpivirine.

Tabla 9. Características demográficas de los pacientes que conforman la cohorte.

	Tenofovir (TFV)	Abacavir (ABC)	p-valor
Número de pacientes	33	27	
Características demográficas			
Edad (años)	38,94 ± 1,59	42,77 ± 1,63	0,749
Sexo (%)	Mujeres: 4 (12,90%) Hombres: 27 (87,10%)	Mujeres: 6 (22,22%) Hombres: 21 (77,78%)	0,349
Índice de masa corporal (kg/m ²)	25,20 ± 0,68	26,06 ± 0,70	0,384
Historial médico de la infección por VIH			
Duración del tratamiento antirretroviral actual (meses)	46,87 ± 6,44	49,09 ± 8,53	0,837
Células T CD4 ⁺ (células/mm ³)	761,1 ± 63,75	860,7 ± 58,26	0,254
Ruta de transmisión (%)			0,143
HTSX / HO/BI	6 (18,18%) / 26 (78,79%)	9 (33,33%) / 16 (59,26%)	
IDU / HEMO	0 / 1 (3,03%)	2 (7,41%) / 0	
Historial médico no relacionado con la infección por VIH			
Fumadores	10 (32,26%)	4 (14,81%)	0,122
Diabetes mellitus	0	1 (3,70%)	
Hipertensión	3 (9,09%)	0	
Colesterol total (mg/L)	194,5 ± 7,34	202,1 ± 6,05	0,428
Triglicéridos (mg/L)	117,9 ± 11,43	118,5 ± 11,91	0,974
HDL (mg/L)	48,71 ± 2,26	51,88 ± 2,10	0,309
LDL (mg/L)	130,3 ± 5,16	134,80 ± 4,93	0,526
Riesgo de Framingham (%)	(n=20) 5,70 ± 0,80	(n=15) 5,8 ± 1,37	0,95
Hematología			
Nº Leucocitos (x10 ³ /µL)	6,50 ± 0,43	7,30 ± 0,41	0,179
Nº Monocitos (x10 ³ /µL)	0,58 ± 0,03	0,72 ± 0,15	0,375
Nº Linfocitos (x10 ³ /µL)	2,31 ± 0,13	2,52 ± 0,13	0,254
Nº Neutrófilos (x10 ³ /µL)	3,41 ± 0,34	3,95 ± 0,31	0,237
Plaquetas (x10 ³ /µL)	231,00 ± 9,13	241,10 ± 11,77	0,503
Eritrocitos (x10 ⁶ /µL)	4,92 ± 0,11	5,16 ± 0,37	0,539
Hemoglobina (g/L)	14,86 ± 0,32	16,27 ± 1,10	0,23
Tiempo de protrombina (s)	7,46 ± 0,07	7,30 ± 0,09	0,184
Actividad de la protrombina (%)	96,03 ± 0,99	96,68 ± 1,01	0,648

HTSX: Heterosexual; HO/BI: Homosexual/Bisexual; IDU: usuarios de drogas inyectadas; HEMO: Hematológico; DESC: desconocido; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad. Los resultados están expresados como la media ± EEM, p-valor obtenido con t test paramétrico no pareado con la corrección de Welch para todos los parámetros excepto para el sexo, la ruta de transmisión y los fumadores para los que se empleó el test de datos cualitativos Chi-cuadrado.

1.1.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO

Se empleó la técnica de adhesión dinámica mediante la cámara de flujo paralelo que reproduce el flujo presente en los vasos sanguíneos. Los PMNs y PBMCs extraídos de los pacientes que conforman esta cohorte (pacientes infectados por VIH bien en tratamiento con ABC o bien con TFV, o de donantes control), fueron perfundidos sobre una monocapa de células endoteliales (HUVEC) procedentes de donantes sin infección por VIH, con la finalidad de cuantificar la velocidad de rodamiento de los leucocitos, el número de leucocitos en rodamiento, y adheridos sobre el endotelio.

Los resultados mostraron que la velocidad de rodamiento de los PMNs era menor (**Figura 46A**) y que había un mayor número de PMNs en rodamiento (**Figura 46B**) en los pacientes infectados por VIH que habían tomado ABC en comparación tanto con los que habían tomado TFV como con los donantes control. Además, la adhesión de PMNs (**Figura 46C**) era mayor en el grupo de los pacientes con ABC con respecto al grupo de TFV. Cabe mencionar que el número de PMNs en rodamiento de los pacientes del grupo de TFV también estuvo incrementado en comparación con los donantes control (**Figura 46B**). Los parámetros de adhesión y velocidad de rodamiento de PMN no difirieron entre el grupo de pacientes en tratamiento con TFV y el grupo de pacientes control (**Figura 46A y B**).

En cuanto a los PBMCs, en el parámetro de la velocidad de rodamiento no hubo diferencias entre los grupos (**Figura 46D**). Por otro lado, los pacientes con ABC presentaron un número mayor de PBMCs en rodamiento (**Figura 46E**) y adheridos al endotelio (**Figura 46F**) que los pacientes en tratamiento con TFV y los donantes control. Además, el número de PBMCs en rodamiento también estuvo incrementado en los pacientes del grupo de TFV con respecto a los donantes control (**Figura 46E**).

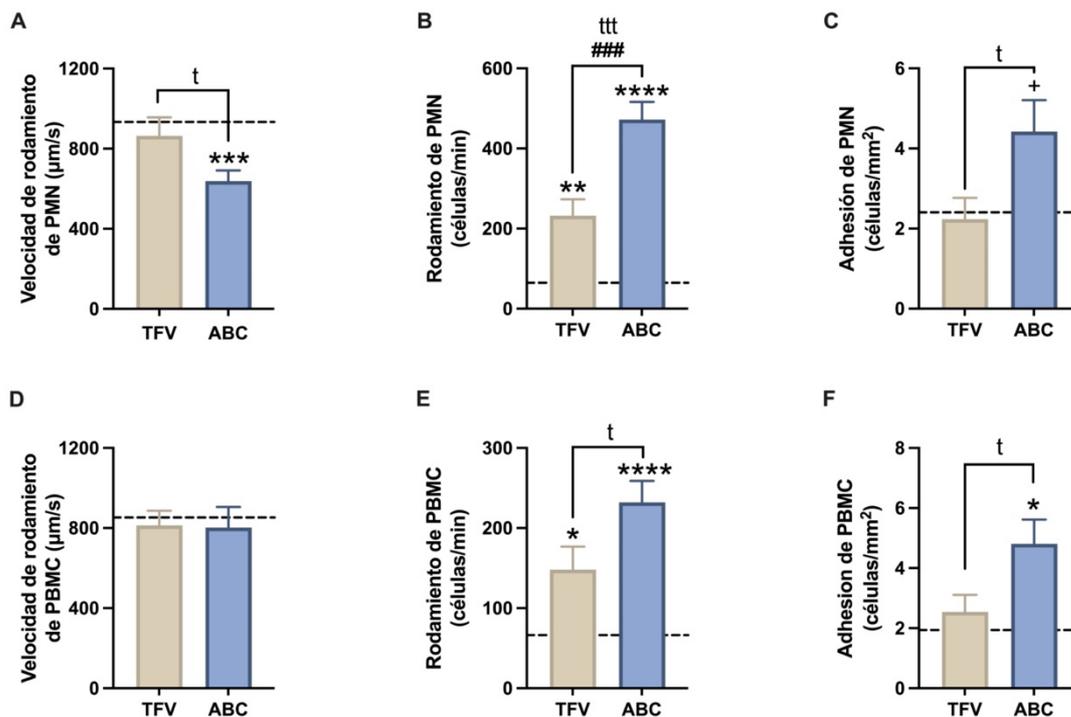


Figura 46. Interacciones leucocito-endothelio en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV). Leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), aislados de sangre de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o con TFV) o de donantes control, se perfundieron sobre un cubreobjetos que contenía una monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de donantes sin infección por VIH en una cámara de flujo paralelo. Se evaluó: **A.** la velocidad de rodamiento de PMNs, **B.** el número de PMNs en rodamiento, **C.** el número de PMNs adheridos al endotelio, **D.** la velocidad de rodamiento de PBMCs, **E.** el número de PBMCs en rodamiento, y **F.** el número de PBMCs adheridos al endotelio. Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=25-24, grupo con ABC n=25-24, grupos de donantes control n=19-22. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ o **** $p < 0,0001$ con respecto al grupo control, ### $p < 0,001$ con respecto al grupo con TFV (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación multiple T3 de Dunnett). + $p < 0,05$ con respecto al grupo control, † $p < 0,05$ o †† $p < 0,001$ con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

1.1.3. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN DE PLAQUETAS SOBRE EL ENDOTELIO

Para realizar el análisis de las interacciones plaqueta-endothelio se empleó la misma cámara de flujo que permite reproducir el flujo presente en los vasos sanguíneos. Para ello, las plaquetas extraídas de sangre de los pacientes que conforman la cohorte se marcaron con el anticuerpo CD41 conjugado con Alexa®488 para permitir su visualización en el microscopio, y a continuación se perfundieron sobre una

monocapa de células endoteliales (HUVEC) procedentes de donantes sin infección por VIH, para cuantificar el número de plaquetas adheridas al endotelio.

Las muestras de los pacientes con infección por VIH, tanto en tratamiento con ABC como TFV, presentaban un incremento en el número de plaquetas adheridas sobre el endotelio, con respecto al grupo de donantes control. Además, cabe destacar que también hubo un aumento en la adhesión de plaquetas en el grupo en tratamiento con ABC con respecto al grupo con TFV (**Figura 47**).

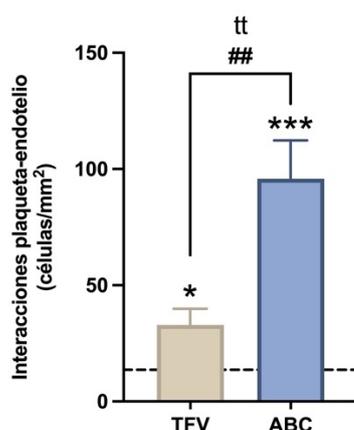


Figura 47. Adhesión de las plaquetas al endotelio en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV). Las plaquetas aisladas de sangre de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o TFV) o de donantes control, se marcaron con el anticuerpo CD41 conjugado con Alexa®488. Posteriormente se perfundieron sobre un cubreobjetos que contenía una monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de donantes sin infección por VIH, en una cámara de flujo paralelo, para cuantificar el número de plaquetas adheridas al endotelio tras el ensamblaje de la cámara de adhesión. Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=23, grupo con ABC n=22, grupos de donantes control n=27. *p<0,05 o ***p<0,001 con respecto al grupo control, ##p<0,01 con respecto al grupo con TFV (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación múltiple T3 de Dunnett). ^{tt}p<0,01 con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

1.1.4. DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO

Para analizar las interacciones plaqueta-leucocito en muestras de sangre de los pacientes que conforman la cohorte, se empleó la técnica de citometría de flujo. Las muestras de sangre entera se marcaron con el anticuerpo específico de plaquetas, CD41. El análisis de la adhesión de las plaquetas sobre los leucocitos se realizó analizando la fluorescencia emitida por el anticuerpo CD41-PE en las diferentes poblaciones de leucocitos, identificadas en el citómetro por sus características de tamaño y granulosidad (**Figura 34**).

Los pacientes con infección por VIH en tratamiento con ABC, pero no los pacientes con TFV, presentaron un aumento en las interacciones plaqueta-neutrófilo con respecto al grupo de donantes control (**Figura 48**). Además, se observó un incremento en las interacciones plaqueta-neutrófilo en el grupo de ABC comparado con el grupo de TFV (**Figura 48A**). Con respecto a las interacciones plaqueta-monocito, a pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, en el grupo de ABC se observa una tendencia en cuanto a que estas interacciones eran mayores que en el grupo de TFV (**Figura 48B**).

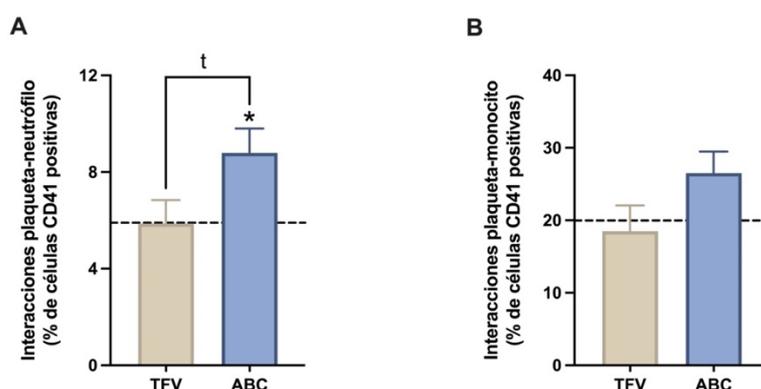


Figura 48. Interacciones plaqueta-leucocito en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV). Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o TFV) o de donantes control, se marcaron con el anticuerpo CD41-PE, marcador específico de plaquetas, para cuantificar la presencia de estas en las diferentes poblaciones de leucocitos: **A.** Neutrófilos y **B.** Monocitos, por citometría de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de células positivas para CD41-PE. Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=22, grupo con ABC n=24, grupos de donantes control n=20. * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación múltiple T3 de Dunnett). † $p < 0,05$ con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

1.1.5. ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

La agregación plaquetaria se analizó mediante un agregómetro de impedancia, tras la estimulación con ADP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, colágeno 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o ácido araquidónico 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en muestras de sangre entera de los pacientes que conforman la cohorte.

Aunque hubo una evidente tendencia al alza en la agregación plaquetaria en el grupo de los pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC con respecto a los donantes control, los resultados no fueron estadísticamente significativos (**Figura 49**). Por el contrario, la agregación plaquetaria en el grupo de TFV, presentó una tendencia a la baja con respecto a los donantes control, que fue significativa en el caso de la estimulación con ácido araquidónico (**Figura 49C**). En cuanto a las comparaciones entre el grupo de ABC con TFV, se observó un aumento significativo en el grupo de ABC en la agregación estimulada tanto por ADP, como por colágeno, como por ácido araquidónico (**Figura 49**).

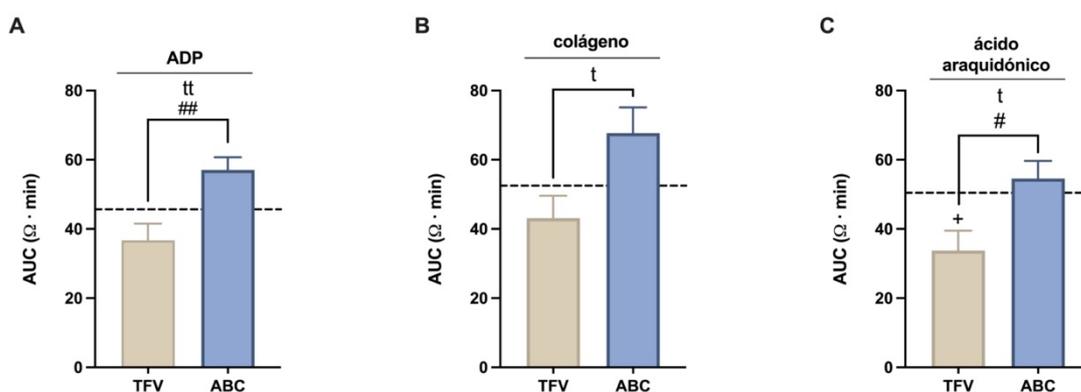


Figura 49. Agregación plaquetaria estimulada por diferentes agonistas plaquetarios en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV). Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o TFV) o de donantes control, se incubaron en el agregómetro de impedancia con: **A.** ADP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **B.** Colágeno 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o **C.** Ácido araquidónico 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos se presentan como el área bajo la curva (AUC: $\Omega \cdot \text{min}$). Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=12-19, grupo con ABC n=9-12, grupos de donantes control n=20-24. #p<0,05 o ##p<0,01 con respecto al grupo con TFV (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación multiple T3 de Dunnett). +p<0,05 con respecto al grupo control, *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

1.1.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS

Se analizó la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), gp150,95 (CD11c/CD18), VLA-4 (CD49d) y L-selectina (CD62L) que participan en las interacciones de los leucocitos con otras células vasculares, como las plaquetas y las células endoteliales. La expresión de estas moléculas de adhesión se evaluó en muestras de sangre de los pacientes que conforman la cohorte, por citometría de flujo.

La expresión de CD11b y CD18 (Mac-1) fue mayor en los pacientes infectados por VIH en tratamiento con ABC en comparación con los pacientes en tratamiento con TFV y con los donantes control, tanto en la población de neutrófilos (**Figura 50A y B**) como en la de monocitos (**Figura 50C y D**). La única excepción fue CD11b en monocitos donde se observó un aumento, pero no se alcanzó la significatividad entre los grupos de ABC y TFV (**Figura 50C**). Por otro lado, no se observaron diferencias entre el grupo de pacientes en tratamiento con ABC y con TFV, en la expresión del resto de moléculas de adhesión analizadas (CD11a, CD11c, CD62L y CD49d), en las poblaciones de neutrófilos y monocitos (**Tabla 10**).

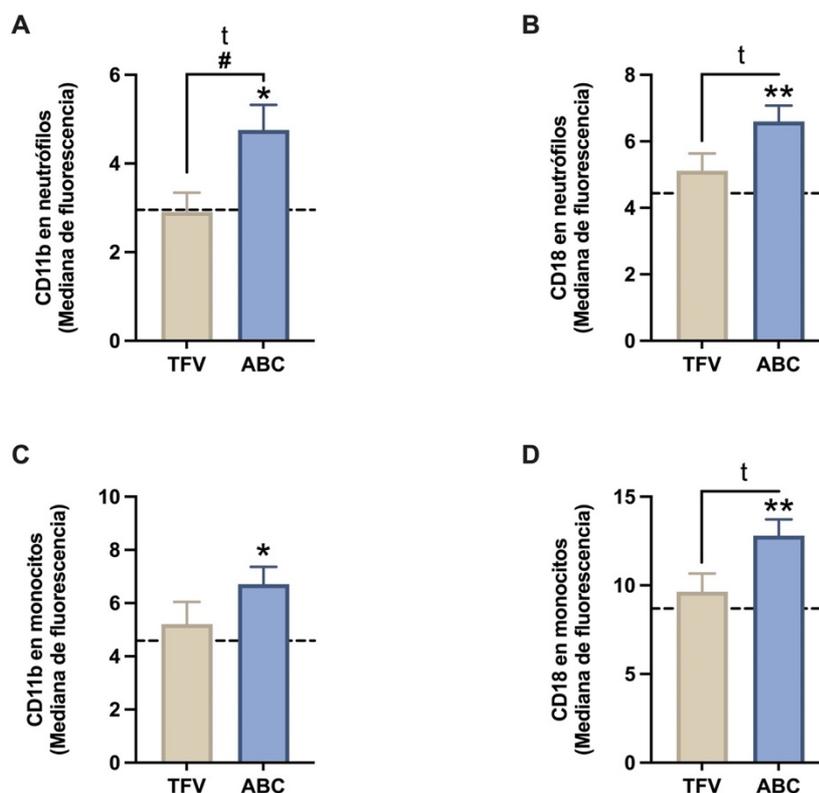


Figura 50. Expresión de la molécula de adhesión Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos y monocitos en muestras de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o con tenofovir (TFV). Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o TFV) o de donantes control, se incubaron con los anticuerpos CD11b-PE y CD18-FITC para evaluar la expresión de las moléculas de adhesión en neutrófilos (A y B) y monocitos (C y D), respectivamente, mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como la mediana de la intensidad de fluorescencia. Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=22-24, grupo con ABC n=24, grupos de donantes control n \geq 21. *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al grupo control, #p<0,05 con respecto al grupo con TFV (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación múltiple T3 de Dunnett). †p<0,05 con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

Tabla 10. Expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de sangre procedente de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) o tenofovir (TFV).

	CD11a	CD11c	CD62L	CD49d
Neutrófilos				
TFV	6,18 \pm 0,34	1,48 \pm 0,23	11,12 \pm 2,461	-
ABC	6,72 \pm 0,50	1,28 \pm 0,10	6,93 \pm 0,90	-
p-valor	0,39	0,42	0,14	-
Monocitos				
TFV	14,58 \pm 1,10	4,93 \pm 0,80	5,15 \pm 1,011	7,11 \pm 1,68
ABC	17,19 \pm 1,45	4,35 \pm 0,52	3,34 \pm 0,37	4,67 \pm 0,51
p-valor	0,16	0,55	0,14	0,18

Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=17-25, p-valor obtenido con t test paramétrico no pareado con la corrección de Welch.

1.1.7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PLAQUETARIAS

La activación plaquetaria (evaluada como el aumento de la expresión de P-selectina) y la expresión de la molécula de adhesión GPIIb/IIIa (implicada en las interacciones plaqueta-plaqueta), se evaluaron por citometría de flujo, en plaquetas de muestras de sangre de los pacientes que conforman la cohorte.

Los resultados mostraron que, independientemente del tratamiento (ABC o TFV), los pacientes con infección por VIH presentaban niveles más altos de la molécula de adhesión P-selectina comparado con los donantes control. Además, no hubo diferencias entre los pacientes con ABC y con TFV (**Figura 51A**).

Por otro lado, la expresión de GPIIb/IIIa fue mayor en el grupo de pacientes en tratamiento con ABC, en comparación tanto con los pacientes en tratamiento con TFV como con los donantes control (**Figura 51B**).

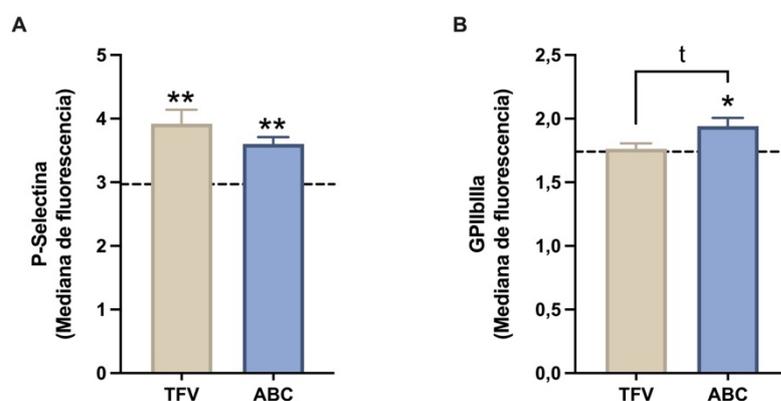


Figura 51. Expresión de las moléculas de adhesión P-selectina y GPIIb/IIIa en plaquetas de pacientes infectados por VIH en tratamiento con abacavir (ABC) y tenofovir (TFV). Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con ABC o TFV) o de donantes control, se incubaron con los anticuerpos CD62P-FITC (**A**) y PAC-1-FITC (**B**) para evaluar la expresión de estas moléculas de adhesión en la población plaquetaria, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como la mediana de la intensidad de fluorescencia. Los resultados están expresados como la media \pm EEM; la línea discontinua representa el valor medio del grupo de donantes control. Grupo con TFV n=27-28, grupo con ABC n=24-25, grupos de donantes control n=21-24. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ o con respecto al grupo control (ANOVA paramétrico de Brown-Forsythe y Welch con el test de comparación múltiple T3 de Dunnett). † $p < 0,05$ con respecto al grupo con TFV (t test no pareado paramétrico con la corrección de Welch).

1.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE ABACAVIR *IN VITRO* EN MUESTRAS DE PACIENTES INFECTADOS POR VIH

1.2.1. TRATAMIENTOS Y PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LOS PARTICIPANTES DE LA COHORTE

Esta cohorte la conforman un total de 28 pacientes. Todos ellos eran pacientes con infección por VIH que habían recibido terapia antirretroviral durante al menos 6 meses, y en este caso todos incluyeron TAF en su tratamiento, aunque en diferentes presentaciones (**Tabla 11**). La media de edad de estos pacientes fue de 47,04 años, la mayoría de ellos fueron hombres (92,86%), y además todos estos pacientes tenían un recuento de células CD4⁺ dentro de los límites recomendados en pacientes infectados por VIH (con una media de 774,2 células/mm³). Ninguno de los pacientes de la cohorte estaba recibiendo tratamiento con antihipertensivos, con estatinas o para la diabetes. Las características demográficas, el tiempo con tratamiento antirretroviral, las rutas de transmisión, y otros parámetros hematológicos y cardiovasculares se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Características demográficas y tratamiento antirretroviral de los pacientes que conforman la cohorte.

Pacientes de la cohorte	
Número de pacientes	28
Características demográficas	
Edad (años)	47,04 ± 2,62
Sexo (%)	Mujeres: 2 (7,14%) Hombres: 26 (92,86%)
Índice de masa corporal (kg/m ²)	25,98 ± 0,85
Historial médico de la infección por VIH	
Duración del tratamiento antirretroviral actual (meses)	63,22 ± 8,17
Células T CD4 ⁺ (células/mm ³)	774,2 ± 82,24
Fármacos (%)	
Genvoya (TAF+FTC+EVG/c)	16 (57,14%)
Odefsey (TAF+FTC+RPV)	8 (28,57%)
Symtuza (TAF+FTC+DRV/c)	2 (7,14%)
Byktarvy (TAF+FTC+BIC)	1 (3,57%)
Descovy + Tivicay (TAF+FTC+DTG)	1 (3,57%)
Ruta de transmisión (%)	
HTSX	4 (14,29%)
HO/BI	20 (71,43%)
UDVP	1 (3,57%)
HEMO	1 (3,57%)
DESC	2 (7,14%)
Historial médico no relacionado con la infección por VIH	
Fumadores	7 (25%)
Diabetes mellitus	1 (3,57%)
Hipertensión	2 (7,14%)
Colesterol total (mg/L)	211,2 ± 8,34
Triglicéridos (mg/L)	104,8 ± 8,34
HDL (mg/L)	55,09 ± 2,71
LDL (mg/L)	141,8 ± 6,57
Riesgo de Framingham (%)	(n=14) 5,71 ± 0,62
Hematología	
Nº Leucocitos (x10 ³ /μL)	6,63 ± 0,41
Nº Monocitos (x10 ³ /μL)	0,65 ± 0,04
Nº Linfocitos (x10 ³ /μL)	2,30 ± 0,12
Nº Neutrófilos (x10 ³ /μL)	3,48 ± 0,33
Plaquetas (x10 ³ /μL)	241,90 ± 12,43
Eritrocitos (x10 ⁶ /μL)	4,96 ± 0,12
Hemoglobina (g/L)	14,89 ± 0,20
Tiempo de protrombina (s)	7,57 ± 0,21
Actividad de la protrombina (%)	95,41 ± 1,32

TAF: Tenofovir alafenamida; FTC: Emtricitabina; EVG/c: Elvitegravir potenciado con cobicistat; RPV: Rilpivirina; DRV/c: Darunavir potenciado con cobicistat; BIC: Bictegravir; DTG: Dolutegravir; HTSX: Heterosexual; HO/BI: Homosexual/Bisexual; IDU: usuarios de drogas inyectadas; HEMO: Hematológico; DESC: desconocido; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad.

1.2.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO

Se empleó la técnica de adhesión dinámica mediante la cámara de flujo paralelo que reproduce el flujo presente en los vasos sanguíneos. Los PMNs y PBMCs extraídos de los pacientes que conforman esta cohorte, se trataron con ABC 5 $\mu\text{g/mL}$ - concentración que simula los niveles plasmáticos presentes en los pacientes en tratamiento con este fármaco) - o con salino durante 4 h.

El tratamiento de PMNs y PBMCs aislados de pacientes infectados por VIH con ABC, añadido *in vitro* durante 4h, indujo una disminución de la velocidad de rodamiento tanto de PMNs (**Figura 52A**) como de PBMCs (**Figura 52D**), y un aumento en el número de PMNs y PBMCs en rodamiento (**Figura 52B y E**, respectivamente) y adheridos al endotelio (**Figura 52C y F**, respectivamente).

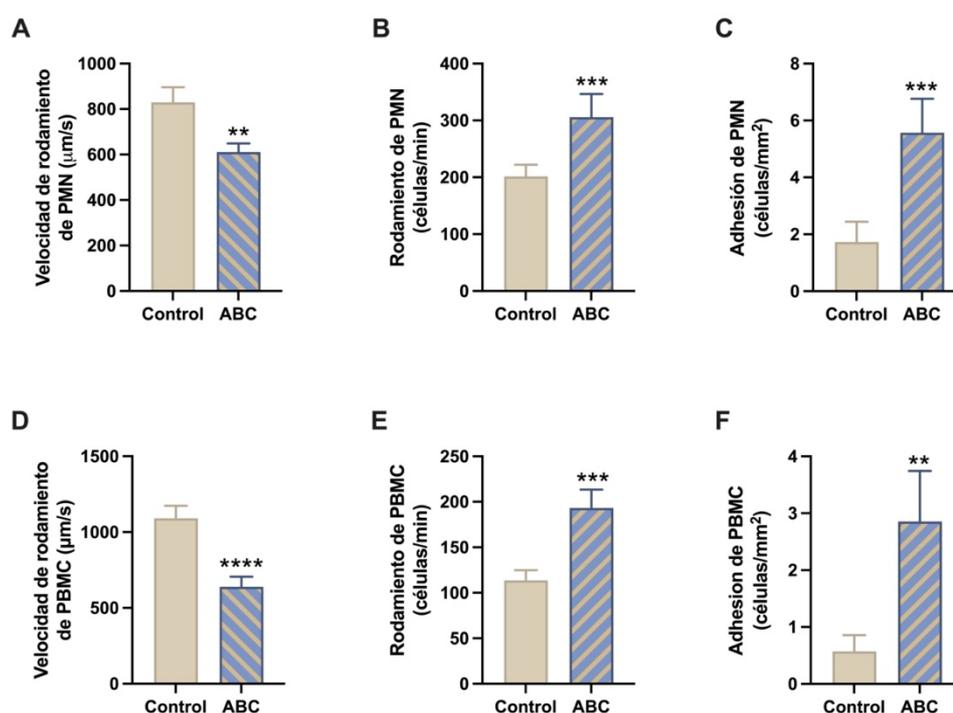


Figura 52. Efecto de abacavir (ABC) *in vitro* sobre las interacciones leucocito-endotelio en muestras de sangre de pacientes infectados por VIH. Leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y mononucleares de sangre periférica (PBMC), aislados de sangre de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con tenofovir alafenamida (TAF) -, se trataron *in vitro* con ABC 5 $\mu\text{g/mL}$ o salino (control) durante 4h y a continuación fueron perfundidos sobre un cubreobjetos que contenía una monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) procedente de donantes sin infección por VIH, y sin tratamiento con ABC, en una cámara de flujo paralelo. Se evaluó: la velocidad de rodamiento de PMNs y PBMCs (**A** y **D**, respectivamente), el número de PMNs y PBMCs en rodamiento (**B** y **E**, respectivamente), y el número de PMNs y PBMCs adheridos al endotelio (**C** y **F**, respectivamente). Los resultados están expresados como la media \pm EEM, $n=22$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ o **** $p<0,0001$ con respecto al grupo control (t test paramétrico apareado).

1.2.3. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN DE PLAQUETAS SOBRE EL ENDOTELIO

Las plaquetas extraídas de sangre de los pacientes que conforman la cohorte fueron tratadas *in vitro* con ABC 5 µg/mL o con salino, durante 1h. Posteriormente, se perfundieron sobre una monocapa de células endoteliales (HUVEC) procedentes de donantes sin infección por VIH y sin tratamiento con el fármaco, para cuantificar el número de plaquetas adheridas al endotelio.

El tratamiento de las plaquetas aisladas de pacientes infectados por VIH con ABC, añadido *in vitro* durante 1h, no afectó a la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio (**Figura 53A**). Este resultado podría parecer contradictorio con respecto a los resultados previos publicados en sangre de donantes control (215) y con respecto a los resultados obtenidos en la cohorte de pacientes en tratamiento con ABC y TFV, en los que se observó que ABC inducía un aumento de la adhesión de plaquetas sobre el endotelio.

Por ello, se realizaron diferentes tratamientos con ABC de forma que las plaquetas y las células endoteliales únicamente o ambos tipos celulares fueron tratados *in vitro* con el fármaco. En este caso, se observó un aumento en la adhesión de las plaquetas sobre el endotelio, cuando las células endoteliales fueron tratadas con ABC, únicamente las HUVEC o tanto las HUVEC como las plaquetas, pero no cuando únicamente fueron tratadas las plaquetas con el fármaco. Este hecho demuestra que ABC *in vitro* no tiene efecto directo sobre las plaquetas (**Figura 53B**).

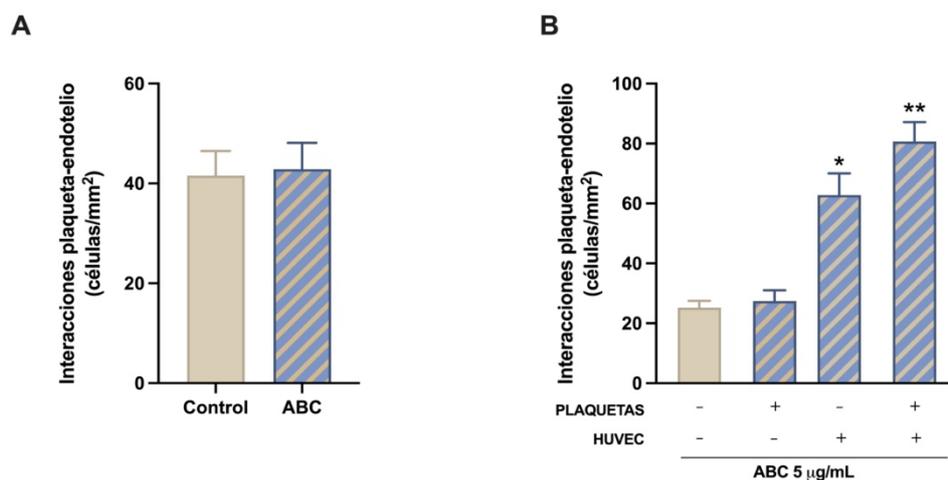


Figura 53. Análisis del efecto de abacavir (ABC) *in vitro* sobre la adhesión de las plaquetas al endotelio en pacientes infectados por VIH. **A.** Plaquetas aisladas de sangre de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con TAF -, se trataron *in vitro* con ABC 5 µg/mL o salino (control) durante 1h y a continuación fueron perfundidas sobre un cubreobjetos que contenía una monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) de donantes sin infección por VIH, y sin tratamiento con ABC, en una cámara de flujo paralelo. **B.** Únicamente las plaquetas aisladas de sangre de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con TAF) durante 1h, o únicamente las HUVEC durante 4h, o ambos tipos celulares fueron tratados con ABC 5 µg/mL. En ambos casos, las plaquetas se marcaron con el anticuerpo CD41 conjugado con Alexa[®]488, para poder ser visualizadas y cuantificar el número de plaquetas adheridas al endotelio tras el ensamblaje de la cámara de adhesión. Los resultados están expresados como la media ± EEM. A. n=25 (t test paramétrico pareado); B. n=5, *p<0,05 o **p<0,01, con respecto al grupo control (ANOVA paramétrico de una vía de medidas repetidas con la corrección de Geisser-Greenhouse y con el test de comparación múltiple de Tukey).

1.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES PLAQUETA-LEUCOCITO

Para analizar el efecto de ABC *in vitro* sobre las interacciones plaqueta-leucocito en muestras de sangre de los pacientes que conforman la cohorte, las muestras de sangre entera fueron tratadas con ABC 5 µg/mL o salino durante 1h, y se empleó la técnica de citometría de flujo.

El tratamiento de las muestras de sangre entera de pacientes infectados por VIH con ABC, añadido *in vitro* durante 1h, indujo un aumento en el número de plaquetas adheridas a los neutrófilos (**Figura 54A**), en el caso de los monocitos (**Figura 54B**), los cambios observados no fueron significativos, aunque se observó una tendencia.

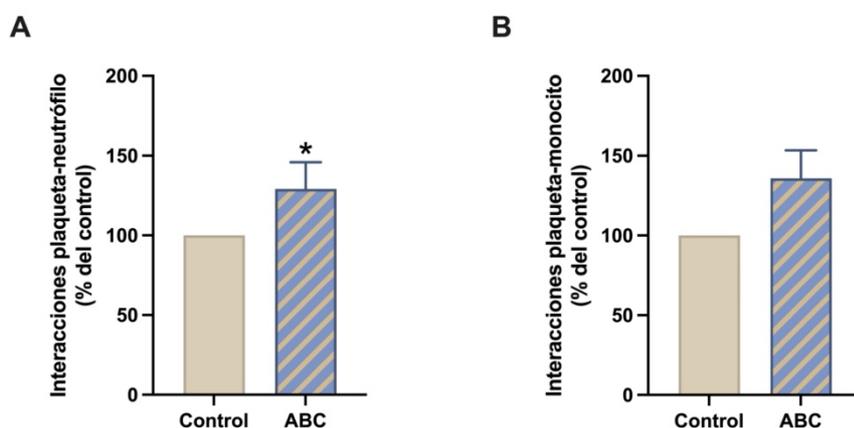


Figura 54. Determinación del efecto de abacavir (ABC) *in vitro* sobre las interacciones plaqueta-leucocito en pacientes infectados por VIH. Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con TAF -, se trataron *in vitro* con ABC 5 µg/mL o salino (control) durante 1h y posteriormente fueron marcadas con el anticuerpo CD41-PE, marcador específico de plaquetas, para cuantificar la presencia de estas en las diferentes poblaciones de leucocitos: **A.** Neutrófilos y **B.** Monocitos, por citometría de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD41-PE normalizada respecto al control (100%). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=17. *p<0,05 con respecto al control (Test Wilcoxon de rango de muestras pareadas no paramétrico).

1.2.5. ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA (INTERACCIÓN PLAQUETA-PLAQUETA)

La agregación plaquetaria se analizó mediante un agregómetro de impedancia, tras la estimulación con ADP 10 µg/mL, colágeno 2 µg/mL o ácido araquidónico 0.5 µg/mL. Las muestras de sangre entera de los pacientes que conforman la cohorte fueron tratadas con ABC o salino durante 1h, previo a la estimulación con los diferentes agonistas plaquetarios.

El tratamiento de las muestras de sangre entera de pacientes infectados por VIH con ABC, añadido *in vitro* durante 1h, no produjo cambios en la agregación inducida por ADP (**Figura 55A**), colágeno (**Figura 55B**) y ácido araquidónico (**Figura 55C**), respecto a la sangre de estos pacientes incubada con el vehículo (control).

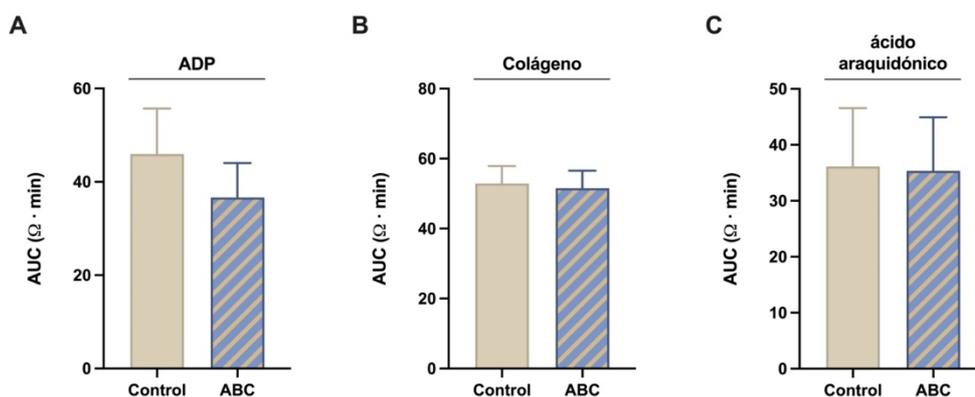


Figura 55. Estudio del efecto de abacavir (ABC) *in vitro* en la agregación plaquetaria estimulada por diferentes agonistas plaquetarios en pacientes infectados por VIH. Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con TAF -, se trataron *in vitro* con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o salino (control) durante 1h y posteriormente en el agregómetro de impedancia fueron estimuladas con: **A.** ADP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **B.** Colágeno 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o **C.** Ácido araquidónico 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos se presentan como el área bajo la curva (AUC: $\Omega \cdot \text{min}$). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. $n=10$. (t test pareado paramétrico).

1.2.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LEUCOCITOS

El efecto de ABC *in vitro* sobre la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), gp150,95 (CD11c/CD18), VLA-4 (CD49d) y L-selectina (CD62L), en muestras de sangre de los pacientes que conforman la cohorte - tratadas con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o salino durante 4h -, se evaluó por citometría de flujo.

El tratamiento de las muestras de sangre entera de pacientes infectados por VIH con ABC, añadido *in vitro* durante 4h, causó un aumento en la expresión de CD11b (**Figura 56A y 56D**) y CD11c (**Figura 56B y 56E**) en neutrófilos y monocitos. Sin embargo, solo indujo un aumento significativo de la expresión de CD18 en neutrófilos. Por otro lado, no produjo cambios en la expresión del resto de moléculas de adhesión evaluadas (**Tabla 12**).

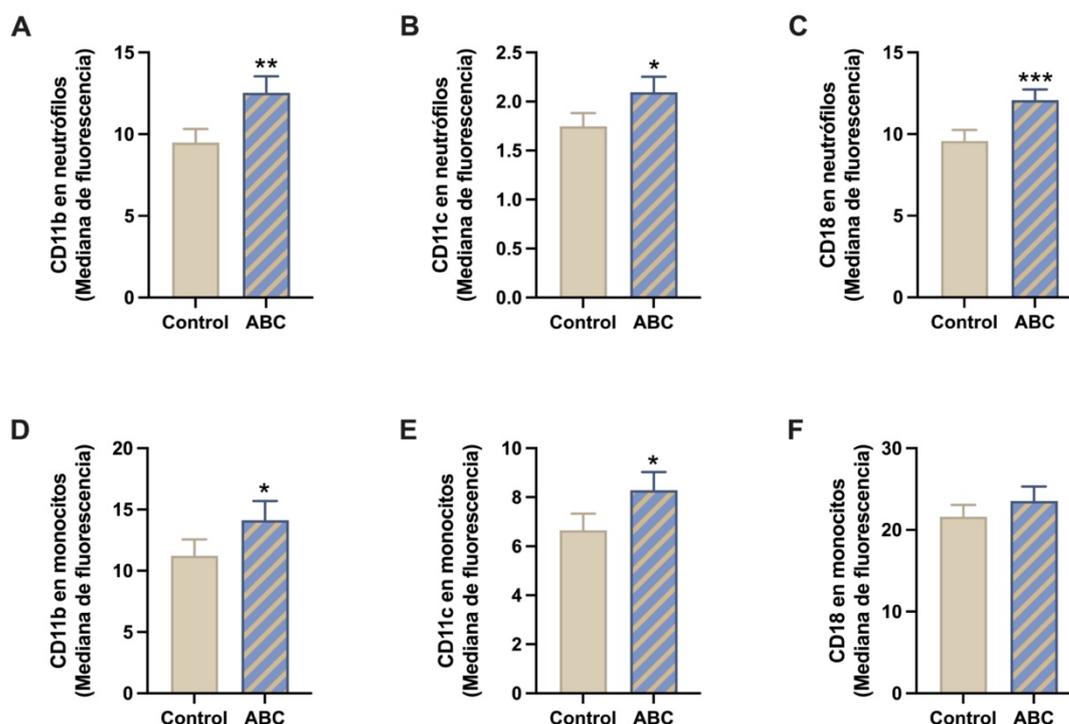


Figura 56. Análisis del efecto de abacavir (ABC) *in vitro* sobre la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1 (CD11b/CD18) y gp150,95 (CD11c/CD18) en neutrófilos y monocitos de pacientes infectados por VIH. Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con TAF -, se trataron *in vitro* con ABC 5 µg/mL o salino (control) durante 4h. Posteriormente las muestras se incubaron con los anticuerpos CD11b-PE, CD11c-PE y CD18-FITC para evaluar la expresión de las moléculas de adhesión en neutrófilos (A, B y C) y monocitos (D, E y F), respectivamente, mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como la mediana de la intensidad de fluorescencia. Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=18. *p<0,05 o **p<0,01 o ***p<0,001 con respecto al control (t test paramétrico pareado).

Tabla 12. Efecto de abacavir (ABC) *in vitro* en la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y monocitos de sangre procedente de pacientes infectados por VIH.

	CD11a	CD62L	CD49d
Neutrophils			
Control	6,50 ± 0,22	9,40 ± 0,82	-
ABC	6,30 ± 0,28	8,40 ± 0,79	-
p-valor	0,6196	0,3840	-
Monocytes			
Control	19,00 ± 0,98	2,60 ± 0,18	4,60 ± 0,29
ABC	19,00 ± 1,1	2,60 ± 0,14	4,50 ± 0,37
p-valor	0,6641	0,7755	0,9138

Los resultados están expresados como la media ± EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia. n=18, p-valor obtenido con t test paramétrico pareado.

1.2.7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PLAQUETAS

El efecto de ABC *in vitro* sobre la activación plaquetaria y la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina (CD62P) y GPIIb/IIIa, en plaquetas de sangre de los pacientes que conforman la cohorte - tratadas con ABC 5 µg/mL o salino durante 1h -, se evaluó por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que ABC, añadido *in vitro*, en sangre de pacientes infectados por VIH (en tratamiento con TAF), no tuvo ningún efecto sobre la expresión de P-selectina (**Figura 57A**) ni sobre la expresión de GPIIb/IIIa (**Figura 57B**) en plaquetas.

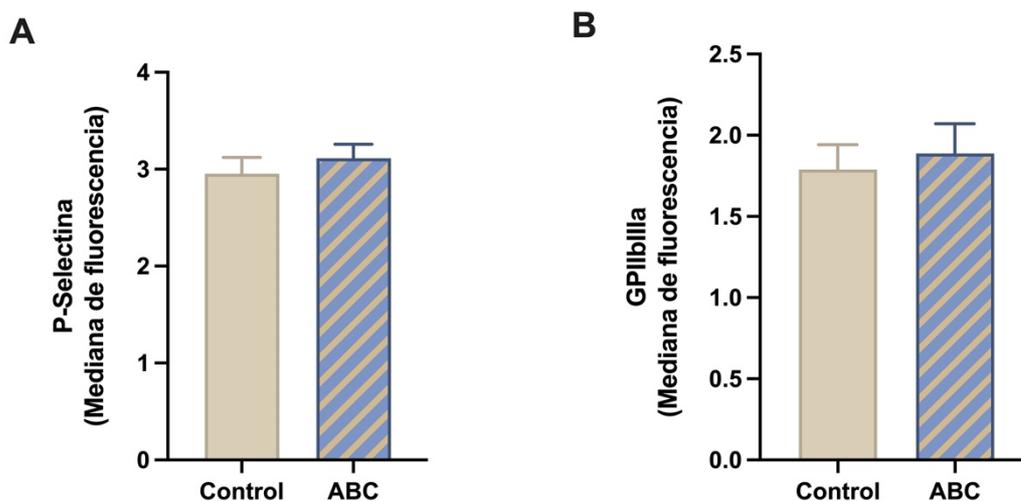


Figura 57. Evaluación del efecto de abacavir (ABC) *in vitro* en la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina y GPIIb/IIIa en plaquetas de pacientes infectados por VIH. Las muestras de sangre entera procedentes de pacientes infectados por VIH - que han estado recibiendo tratamiento con TAF -, se trataron *in vitro* con ABC 5 µg/mL o salino (control) durante 1h. Posteriormente las muestras se incubaron con los anticuerpos CD62P-FITC (**A**) y PAC-1-FITC (**B**) para evaluar la expresión de estas moléculas de adhesión en la población plaquetaria, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como la mediana de la intensidad de fluorescencia. Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=25. (t test paramétrico pareado).

2. ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL QUE ABC Y ATP INDUCEN EFECTOS PROTROMBÓTICOS

2.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PROTROMBÓTICOS DE ABACAVIR

2.1.1. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ABC

En estudios previos, se ha demostrado que ABC es capaz de inducir las interacciones plaqueta-neutrófilo, que estas interacciones se deben al efecto directo de ABC sobre los neutrófilos y no sobre las plaquetas, y que estas interacciones están mediadas por el receptor P2X₇ en neutrófilos y por las moléculas de adhesión PSGL-1 y P-selectina en neutrófilos y plaquetas, respectivamente (224).

Dado que ABC no actúa directamente sobre las plaquetas, y que el papel de los neutrófilos y su secretoma sobre la función plaquetaria y la trombosis está siendo el foco de la investigación en los últimos años, en este estudio se exploró la capacidad del secretoma liberado por los neutrófilos tratados con ABC sobre la activación plaquetaria y la inducción de las interacciones plaqueta-neutrófilo. Para ello, transcurrido el tiempo de tratamiento de los neutrófilos con ABC, se puso en contacto el secretoma liberado por los neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) con plaquetas y neutrófilos (que no habían recibido ningún tratamiento), para determinar su efecto sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Los resultados mostraron que independientemente del tratamiento de las plaquetas y/o de los neutrófilos con el fármaco, únicamente se observó un aumento en las interacciones plaqueta-neutrófilo cuando las células eran tratadas con un secretoma que provenía de neutrófilos tratados con ABC (**Figura 58A**). Además, este SN_{ABC}, también fue capaz de inducir la activación de las plaquetas (**Figura 58B**).

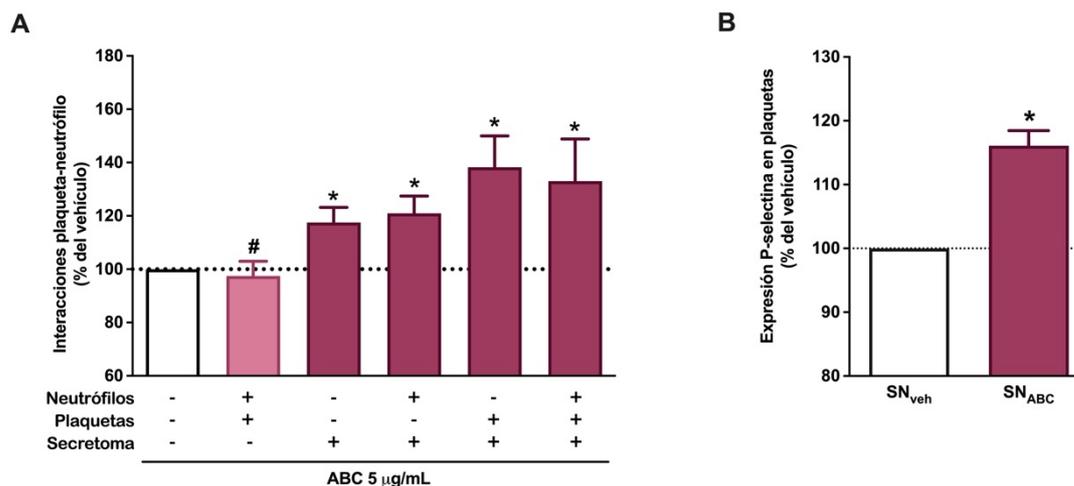


Figura 58. Efecto del secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo y la activación plaquetaria. Leucocitos polimorfonucleares y/o plaquetas, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ABC 5 µg/mL o salino durante 1h. Tras el tratamiento el secretoma de los leucocitos se recoge y se pone en contacto con plaquetas y neutrófilos que no han recibido tratamiento (**A**), o únicamente con plaquetas (**B**), durante 15 min. A continuación, las muestras se incuban con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE para cuantificar la presencia de estas en la población de neutrófilos, o con el anticuerpo CD62P-FITC para cuantificar la expresión de P-selectina en plaquetas. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD62P o CD41-PE normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=5-6. *p<0,05 con respecto al control, #p<0,05 con respecto al grupo de plaquetas y neutrófilos tratados con ABC y con el SN_{ABC} (Test Kruskal-Wallis).

2.1.2. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA LIBERACIÓN DEL SECRETOMA

Previamente se había demostrado que los efectos de ABC sobre las interacciones leucocito-endotelio, se debían al receptor purinérgico P2X₇, descartando otros receptores como los P2X₁, P2X_{2/3}, P2Y₂ y P2Y₁₁ (220). Más adelante, también se demostró la implicación del receptor P2X₇ en las interacciones plaqueta-endotelio inducidas por ABC (215).

Debido a estos resultados, en este caso se analizó la importancia del receptor P2X₇ en la generación del secretoma liberado por los neutrófilos, capaz de inducir la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo. Para ello empleamos el antagonista del receptor P2X₇, A804598, previo al tratamiento con ABC. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se puso en contacto el SN_{ABC} con plaquetas, para

determinar la expresión de P-selectina en plaquetas (marcador de la activación plaquetaria), o con plaquetas y neutrófilos sin tratar, para determinar el efecto del secretoma sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Con esto se observó que, cuando se pre-trató con el antagonista del receptor P2X₇, el sobrenadante de neutrófilos tratados con ABC no inducía ni el aumento en la expresión de P-selectina en plaquetas (**Figura 59A**), ni de las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 59B**) observados con el SN_{ABC}. Sin embargo, el pre-tratamiento de los neutrófilos con A317491 (antagonista de los receptores P2X_{2/3}), no indujo cambios con respecto a los efectos observados del SN_{ABC} (**Figura 59**). Por tanto, el receptor P2X₇ está implicado en la liberación del secretoma de los neutrófilos que es capaz de inducir la activación plaquetaria y la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos.

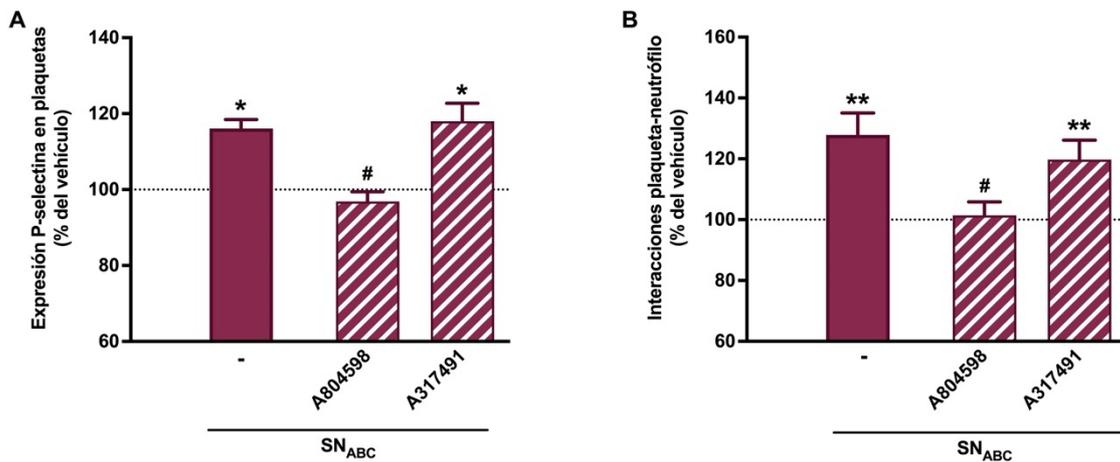


Figura 59. Implicación del receptor P2X₇ en los efectos inducidos por el secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo.

Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 µg/mL) o salino durante 1h, y en algunos casos previo al tratamiento con ABC, con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) o el antagonista del receptor P2X_{2/3} (A317491, 25 nM), durante 30 min. **A.** Tras el tratamiento el secretoma de los leucocitos se recoge y se pone en contacto (15 min) con plaquetas sin tratar. A continuación, las muestras se incuban con el anticuerpo CD62P-FITC, para cuantificar la expresión de P-selectina en plaquetas. **B.** Tras el tratamiento el secretoma de los leucocitos se recoge y se pone en contacto (15 min) con plaquetas y neutrófilos sin tratar. Después, las muestras se incuban con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD62P o CD41-PE normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=6. *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al control, #p<0,05 con respecto al grupo tratado con SN_{ABC} (Test Kruskal-Wallis).

2.1.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL SECRETOMA LIBERADO POR NETRÓFILOS TRATADOS CON ABC

Se realizó un estudio de proteómica con la finalidad de analizar la composición de proteínas presentes en el secretoma liberado por neutrófilos tratados con ABC, que induce la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo. Debido a que el receptor P2X₇ estaba implicado en la liberación de este secretoma, algunas muestras fueron pre-tratadas con el antagonista de este receptor (A804598).

2.1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El estudio de proteómica se realizó con el secretoma de cuatro grupos experimentales: control, A804598, ABC y ABC + A804598. Tras el procesamiento y análisis de los secretomas mediante un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), las secuencias de péptidos detectadas se identificaron con sus proteínas correspondientes.

En primer lugar, se analizó la agrupación de las muestras en función de los niveles de las proteínas detectadas en los secretomas. Para ello, se realizó el análisis de componentes principales que clasifica las muestras sin conocer previamente a que grupo pertenecen. Con este análisis se observó que las muestras no se agrupaban según los tratamientos experimentales, sino que lo hacían más bien por grupos de pacientes (**Figura 60A**). Esto se puede deber a que la variabilidad que existe entre los individuos es mayor que los efectos inducidos por ABC, ya que como se ha observado en los apartados anteriores el fármaco induce la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo, pero sus efectos son moderados.

A continuación, se realizó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), y en este caso clasificamos las muestras en los que consideraríamos los controles que no tienen efecto sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo (control, A804598, ABC + A804598) y los secretomas capaces de

inducir estos efectos (ABC). En este caso, el análisis PLS-DA sí que consiguió clasificar estos grupos experimentales (**Figura 60B**).

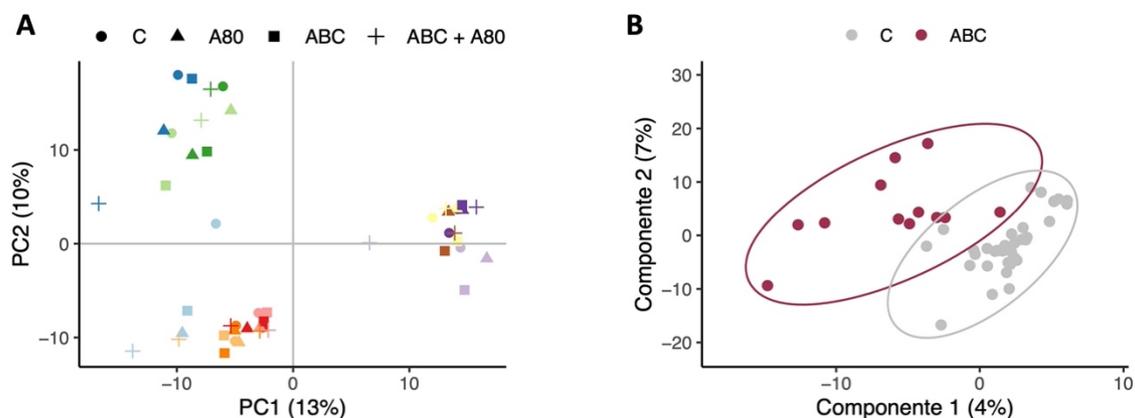


Figura 60. Clasificación de los secretomas analizados en el estudio de ABC por proteómica. A. Análisis de componentes principales para la agrupación de las muestras. La componente principal 1 (PC1) explica el 13% de la variabilidad entre las muestras y la PC2 el 10%. Las muestras de los diferentes donantes se representan con diferentes colores y las condiciones experimentales con las diferentes formas. Vehículo (C): círculo, A80 (antagonista del receptor P2X₇): triángulo, ABC: cuadrado, ABC + A80: cruz. **B.** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). La componente 1 explica el 4% de la variabilidad entre muestras, y la componente 2 el 7%.

2.1.3.2. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN LAS QUE ABC INDUCE CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN

En cuanto al análisis diferencial de las proteínas detectadas en los secretomas entre los diferentes grupos experimentales, se observó que ABC inducía cambios significativos en 7 de las proteínas detectadas. Estas proteínas son la subunidad E1 de la ATPasa de tipo V (VATE1), la proteína 11A relacionada con Ras (Rab-11A), el factor 1 relacionado con la diferenciación endotelial (EDF1), actina β 2, queratina del citoesqueleto de tipo II, la subunidad reguladora 9 no ATPasa del proteosoma 26S (PSMD9) (**Figura 61**), y LOX-1 (**Figura 62**).

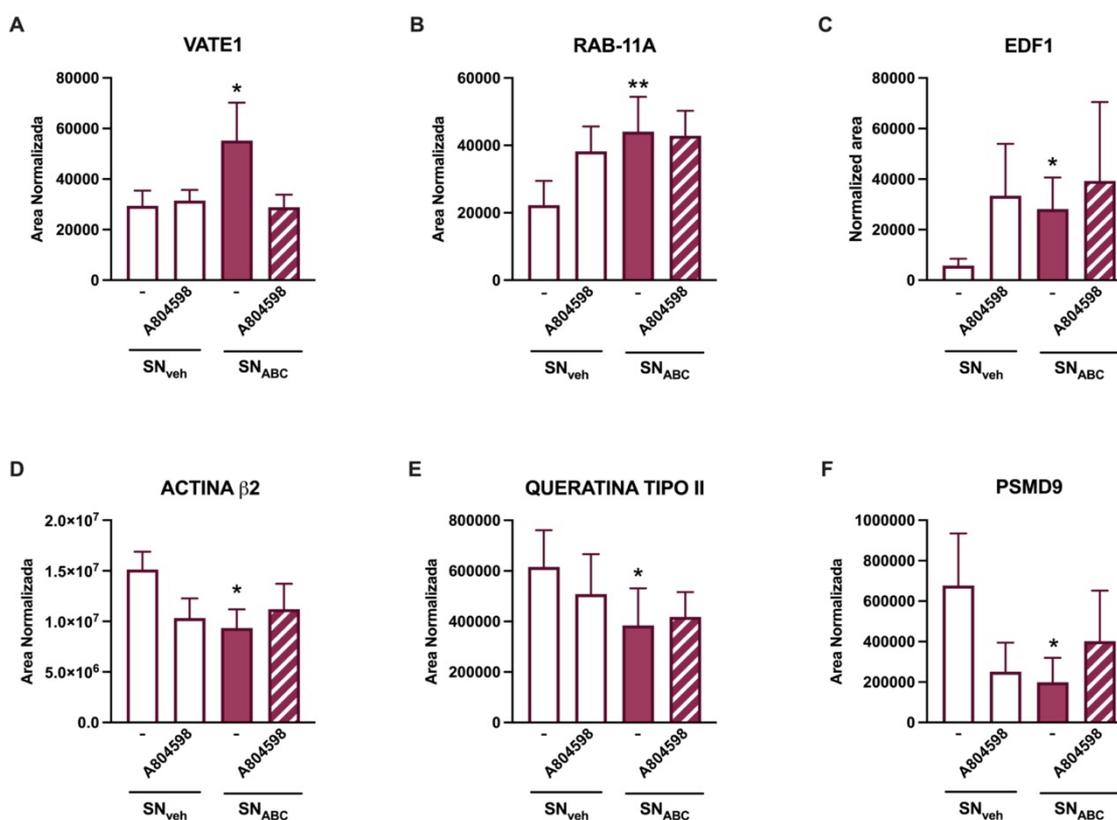


Figura 61. Proteínas en las que abacavir (ABC) induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 µg/mL) o salino durante 1h, y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. Tras el tratamiento el secretoma liberado fue procesado y analizado mediante un espectrómetro de masas (LC-MS/MS). Las proteínas fueron identificadas mediante *ProteinPilot* y las áreas con *MarkerView*. Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=12. Se representan únicamente los niveles de las proteínas en las que ABC induce cambios significativos pero el antagonista del receptor P2X₇ (A804598) no revierte sus efectos: la subunidad E1 de la ATPasa de tipo V (VATE1), la proteína relacionada con Ras (Rab-11A), el factor 1 relacionado con la diferenciación endotelial (EDF1), actina β2, queratina tipo II y la subunidad reguladora 9 no ATPasa del proteosoma 26S (PSMD9). *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al control (Test de Friedman).

VATE1 es esencial para el ensamblaje y la función catalítica de la ATPasa de tipo V (251). La ATPasa de tipo V es responsable de acidificar diferentes compartimentos intracelulares (252). En cuanto a Rab-11A, las GTPasas Rab son claves en la regulación del tráfico de membranas intracelulares, desde la formación de vesículas de transporte hasta su fusión con las membranas (253). EDF1 regula la actividad de la NOS, probablemente secuestrando calmodulina en el citoplasma, además puede actuar como coactivador transcripcional y sobre la diferenciación endotelial (254). Por otro lado, la actina es una proteína involucrada en varios tipos de motilidad celular y

la queratina pertenece a la familia de filamentos intermedios (255). PSMD9 actúa en el ensamblaje del proteosoma 26S (256).

Sin embargo, el único aumento en los niveles de las proteínas que fue revertido cuando el receptor P2X₇ estaba bloqueado fue la proteína LOX-1 (**Figura 62**). Las funciones de LOX-1 se recogen en el apartado *1.1.6 Papel de LOX-1*.

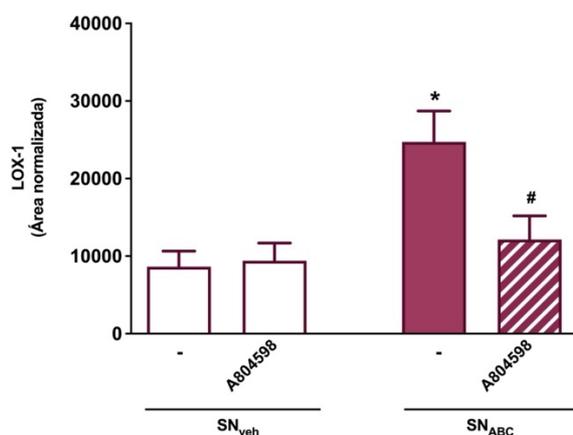


Figura 62. Proteína en la que abacavir (ABC) induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos a través del receptor P2X₇. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 µg/mL) o salino durante 1h, y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC o vehículo. Tras el tratamiento, el secretoma liberado fue procesado y analizado mediante un espectrómetro de masas (LC-MS/MS). La proteína fue identificada mediante *ProteinPilot* y las áreas con *MarkerView*. Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=12. *p<0,01 con respecto al control (SN_{veh}), #p<0,01 con respecto al grupo tratado con SN_{ABC} (Test de Friedman).

2.1.4. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ABC

Se analizó la expresión del receptor LOX-1 en neutrófilos y plaquetas. El tratamiento con ABC (5 -10 $\mu\text{g/mL}$) causó un incremento en la expresión de LOX-1 en neutrófilos (**Figura 63A**) y además este aumento se dio a través del receptor P2X₇, ya que su antagonista (A84598) revirtió el aumento producido por ABC. Sin embargo, ABC no indujo cambios en la expresión de LOX-1 en plaquetas (**Figura 63B**). Por otro lado, se analizó la implicación funcional de LOX-1 en los efectos inducidos por el SN_{ABC} sobre la activación plaquetaria y sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Los resultados mostraron que el anticuerpo bloqueante frente a LOX-1, revertía los efectos del SN_{ABC} tanto en la expresión de P-selectina en plaquetas (**Figura 63C**) como en las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 63D**), efecto que no se observó con el control del isotipo, confirmando así la implicación de LOX-1 en la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo inducidas por SN_{ABC}.

Posteriormente, se evaluaron las proteínas responsables de la escisión del receptor LOX-1 en la producción de su forma soluble (sLOX-1), ADAM10 y ADAM17. En primer lugar, se analizaron los efectos de ABC sobre la expresión de ambas proteínas, y se observó que ABC indujo un aumento en la expresión de ADAM10 (**Figura 64A**) y ADAM17 (**Figura 64B**) en neutrófilos (siendo efectivas las concentraciones de ABC 5 -10 $\mu\text{g/mL}$), aunque en ambos casos la expresión fue inferior a la que indujo el control positivo (PAF). En segundo lugar, se determinó la implicación de ambas proteínas en los efectos observados del SN_{ABC}, empleando inhibidores de ADAM10 y ADAM17 (GI254023X y TAPI-1, respectivamente). El tratamiento con estos dos inhibidores por separado no revirtió los efectos del SN_{ABC}, no obstante, el tratamiento combinado con ambos inhibidores sí consiguió revertir tanto los efectos del SN_{ABC} sobre la expresión de P-selectina en plaquetas como sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 64C-D**). Estos resultados indican que la escisión producida por ADAM10 y ADAM17 del receptor LOX-1 es esencial para promover la activación plaquetaria e inducir las interacciones plaqueta-neutrófilo por parte del SN_{ABC}.

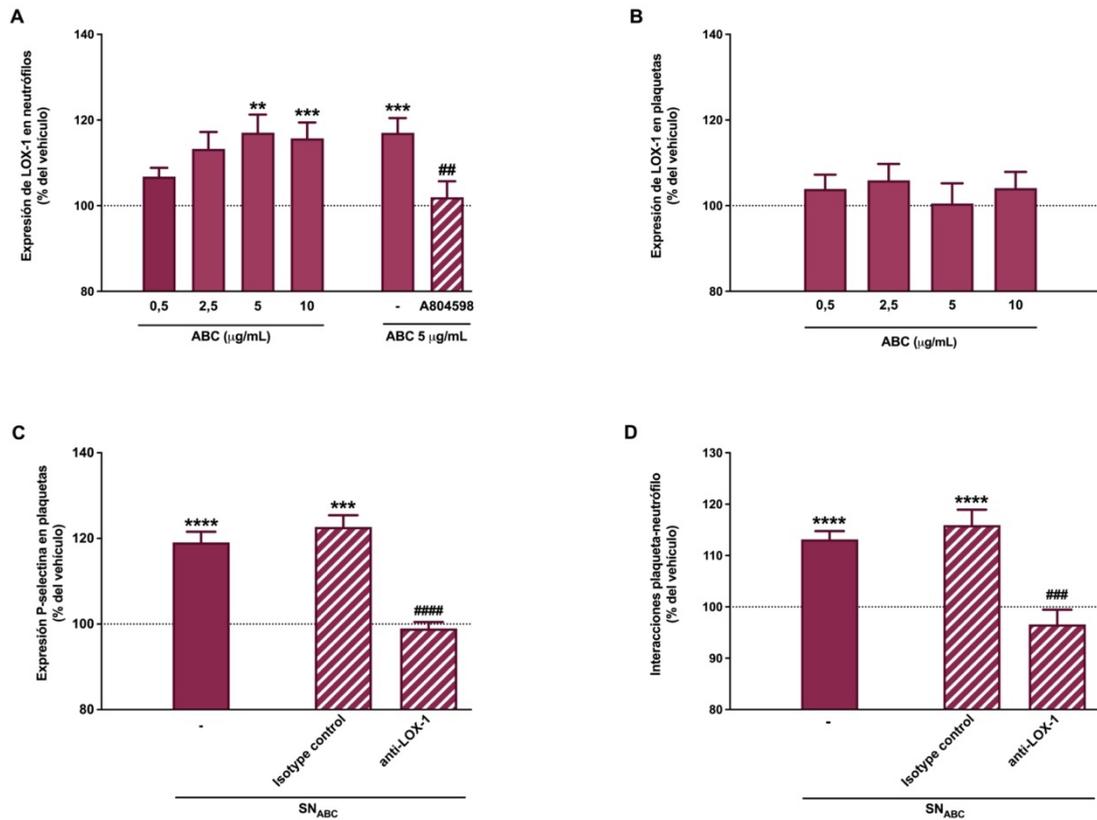


Figura 63. Efecto de abacavir (ABC) en la expresión de LOX-1 en neutrófilos y plaquetas, e implicación del receptor LOX-1 en los efectos del SN_{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo.

A. Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con abacavir (ABC 0,5 - 10 µg/mL) o salino durante 1h, y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 µM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo del receptor LOX-1-FITC, y se evaluó su expresión en neutrófilos, identificados en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **B.** Plaquetas aisladas de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 0,5 - 10 µg/mL) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo del receptor LOX-1-FITC, y se evaluó su expresión en plaquetas, identificadas en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **C y D.** Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 µg/mL) o salino durante 1h. En algunos casos el secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) fue tratado con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (10 µg/mL) o con su isotipo control, durante 30 min. Tras el tratamiento el SN_{ABC} se puso en contacto (15 min) con: **C.** plaquetas sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo CD62P-FITC, para cuantificar la expresión de P-selectina en plaquetas; **D.** plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=5-11. **p<0,01, ***p<0,001 o ****p<0,0001 con respecto al control, ##p<0,01, ###p<0,001 o ####p<0,0001 con respecto al grupo tratado con SN_{ABC} (Test Kruskal-Wallis).

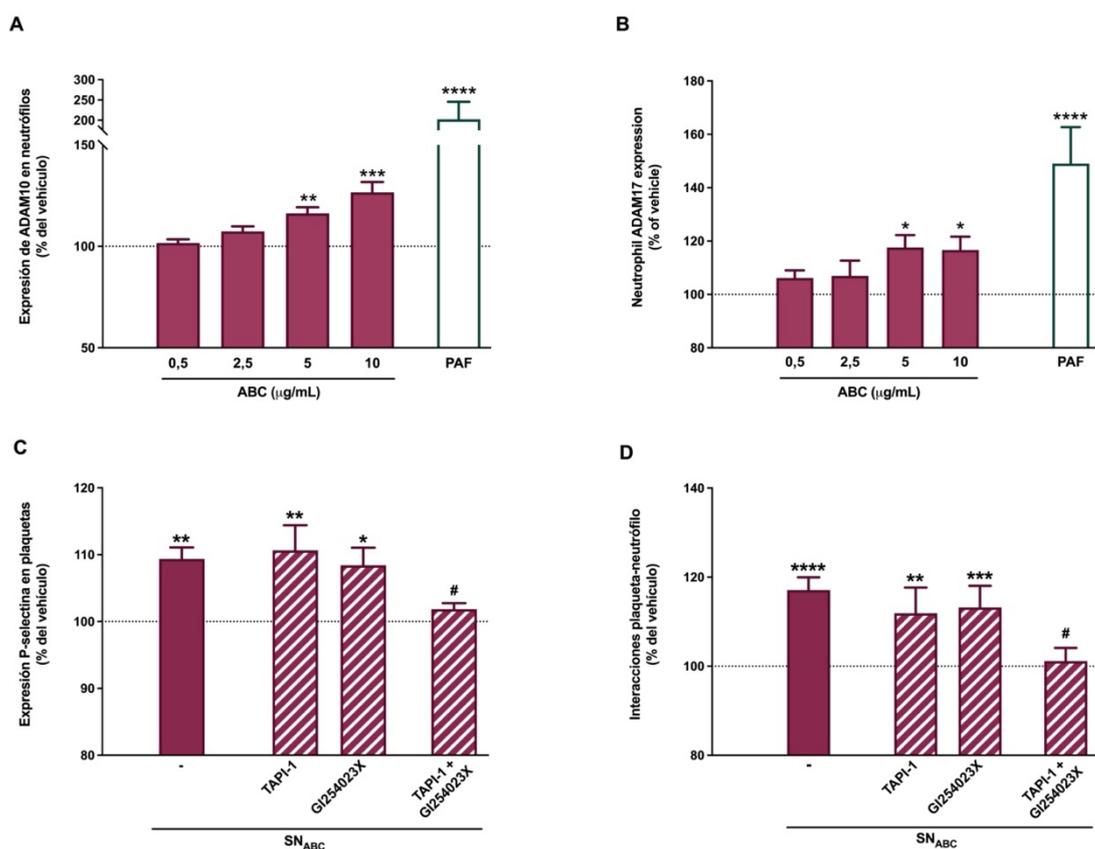


Figura 64. Efecto de abacavir (ABC) en la expresión de ADAM10 y ADAM17 en neutrófilos y su implicación en los efectos del SN_{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo. **A. y B.** Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con abacavir (ABC 0,5 - 10 $\mu\text{g/mL}$), PAF (1 μM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo de **A.** ADAM10-PE o **B.** ADAM17-PE, para evaluar su expresión en neutrófilos identificados en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **C. y D.** Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 $\mu\text{g/mL}$) o salino durante 1h, y en algunos casos se trataron con los inhibidores de ADAM10 (GI254023X, 10 μM) y/o de ADAM17 (TAPI-1, 2 μM), durante 30 min previo al tratamiento con ABC. Tras el tratamiento el secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}) se puso en contacto (15 min) con: **C.** plaquetas sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo CD62P-FITC, para cuantificar la expresión de P-selectina en plaquetas; **D.** plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=6. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 o ****p<0,0001 con respecto al control, #p<0,05 con respecto al grupo tratado con SN_{ABC} (Test Kruskal-Wallis).

Por último, en el estudio del mecanismo del SN_{ABC} responsable de la activación plaquetaria y de la inducción de las interacciones plaqueta-neutrófilo, se analizó la ruta de señalización implicada en las plaquetas. En este sentido, entre los diferentes ligandos del receptor LOX-1, se encuentra la proteína HSP70, que es una proteína implicada en la activación y desgranulación plaquetaria. Por tanto, esta proteína

podría conducir a la liberación de gránulos plaquetarios, que podrían llevar a la liberación de ADP/ATP, y en consecuencia también podrían estar implicados en este mecanismo los receptores purinérgicos de las plaquetas (P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂). Para abordar este objetivo, se empleó un inhibidor de HSP70 (VER-155008), un inhibidor de la liberación de gránulos (glioxilato), y los antagonistas de los receptores purinérgicos plaquetarios P2X₁ (NF449), P2Y₁ (MRS2500) y P2Y₁₂ (AR-C 66096). Los resultados mostraron que el uso de estos inhibidores revirtió los efectos del SN_{ABC} tanto en la expresión de P-selectina en plaquetas (**Figura 65A**) como en las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 65B**). Por lo tanto, HSP70, la liberación de los gránulos plaquetarios, y los receptores purinérgicos de las plaquetas P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ están implicados en la activación plaquetaria y en las interacciones plaqueta-neutrófilo inducidas por SN_{ABC}.

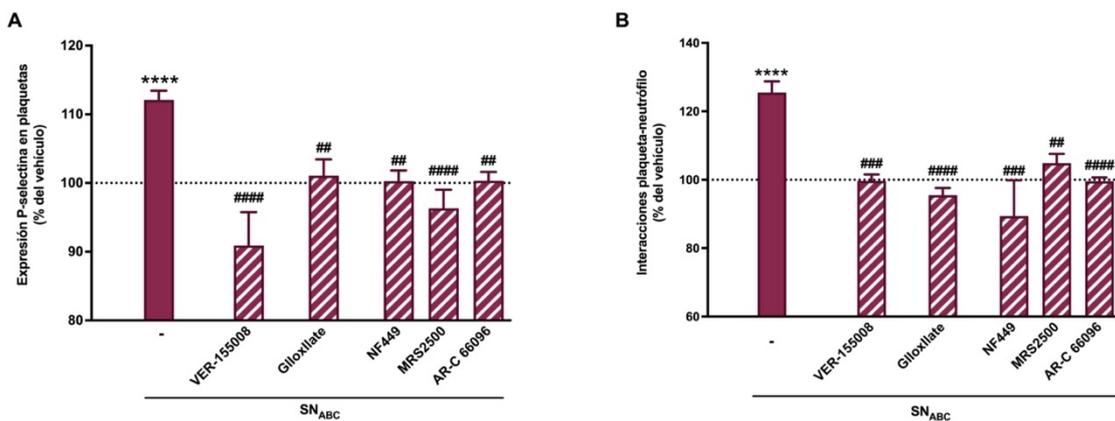


Figura 65. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos plaquetarios y los receptores purinérgicos plaquetarios P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ en los efectos del SN_{ABC} sobre la activación plaquetaria y las interacciones plaqueta-neutrófilo. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5 µg/mL) o salino durante 1h. En algunos casos se trataron las plaquetas con los inhibidores de HSP70 (VER-155008, 20 µM), de la liberación de gránulos (glioxilato, 100 µM), o de los antagonistas de los receptores P2X₁ (NF449, 100 µM), P2Y₁ (MRS2500, 100 µM) o P2Y₁₂ (AR-C 66096, 10 µM) durante 15 min previo al tratamiento con el secretoma de neutrófilos tratados con ABC (SN_{ABC}). Tras el tratamiento de los leucocitos, el SN_{ABC} se puso en contacto (15 min) con: **A.** plaquetas sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo CD62P-FITC, para cuantificar la expresión de P-selectina en plaquetas; **B.** plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=5-6. ****p<0,0001 con respecto al control, ##p<0,01, ###p<0,001 o ####p<0,0001 con respecto al grupo tratado con SN_{ABC} (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR P2X₇ EN NEUTRÓFILOS EN LOS EFECTOS DE ABC

2.1.5.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X₇

Puesto que se observó la implicación del receptor P2X₇ en los efectos inducidos por el SN_{ABC}, el siguiente paso fue analizar la expresión de estos receptores en los diferentes tipos celulares implicados ya que ABC actúa a través de los receptores P2X₇ en leucocitos, pero no presenta efectos directos sobre las plaquetas.

Aunque en todos los tipos celulares analizados se observó una cierta expresión basal del receptor, se demostró que tanto los neutrófilos como los monocitos presentaban una expresión basal mucho más alta del mismo que los linfocitos y las plaquetas (**Figura 66**). Esto podría indicar que la expresión del receptor P2X₇ en plaquetas no es suficiente para que ABC pueda ejercer sus efectos sobre ellas.

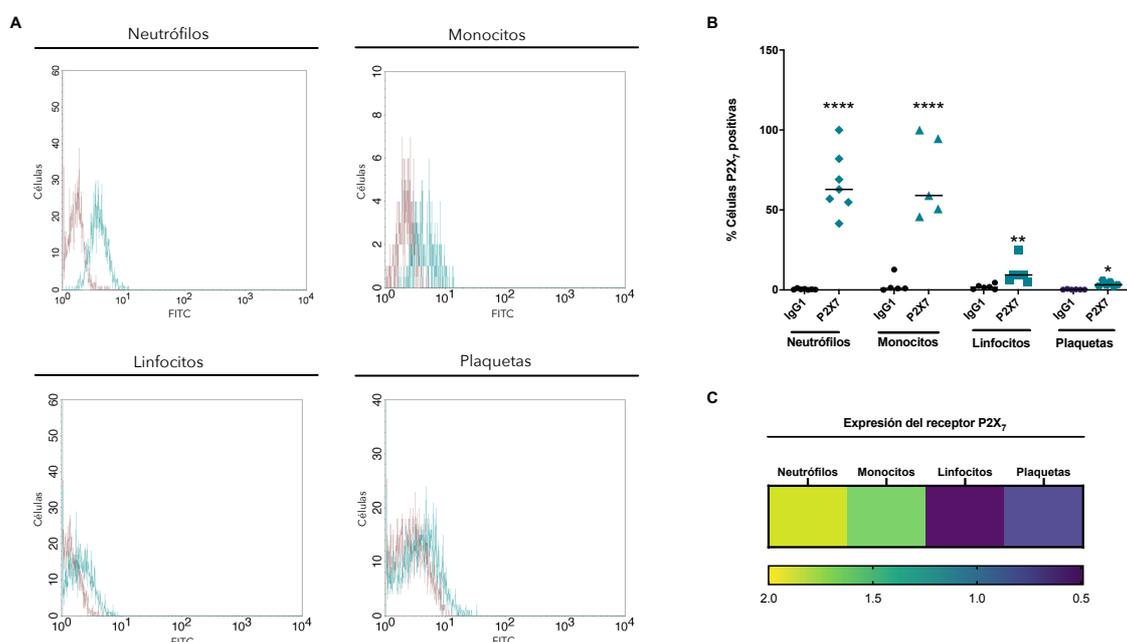


Figura 66. Expresión basal del receptor P2X₇ en leucocitos y plaquetas. Sangre entera o plaquetas aisladas de donantes sin infección por VIH, se incubaron con el anticuerpo frente al receptor P2X₇-FITC o con su isotipo control. Las diferentes poblaciones de leucocitos; neutrófilos, monocitos y linfocitos se identifican por sus características de tamaño y granulosidad por el citómetro de flujo. **A.** Histogramas representativos de la fluorescencia producida por el isotipo control y el anticuerpo del receptor P2X₇ en las diferentes poblaciones analizadas: neutrófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas. **B.** Porcentaje de células positivas para el receptor P2X₇ o para su isotipo control. **C.** Representación del incremento de la mediana de fluorescencia del receptor P2X₇ con respecto a su isotipo control. Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=5-6. *p<0,05, **p<0,01 o ****p<0,0001 con respecto al isotipo control en cada tipo celular (Test Kruskal-Wallis).

A continuación, se analizaron los efectos de ABC sobre la expresión del receptor P2X₇ en neutrófilos. Los resultados mostraron que el tratamiento con ABC durante 1h de los neutrófilos no inducía cambios en la expresión del receptor (**Figura 67A**). Sin embargo, el tratamiento durante 4h sí que indujo un incremento en la expresión del receptor P2X₇ en neutrófilos, además este efecto era concentración dependiente, siendo ABC 5 µg/mL la concentración mínima del fármaco capaz de inducir un aumento en la expresión del receptor (**Figura 67B**).

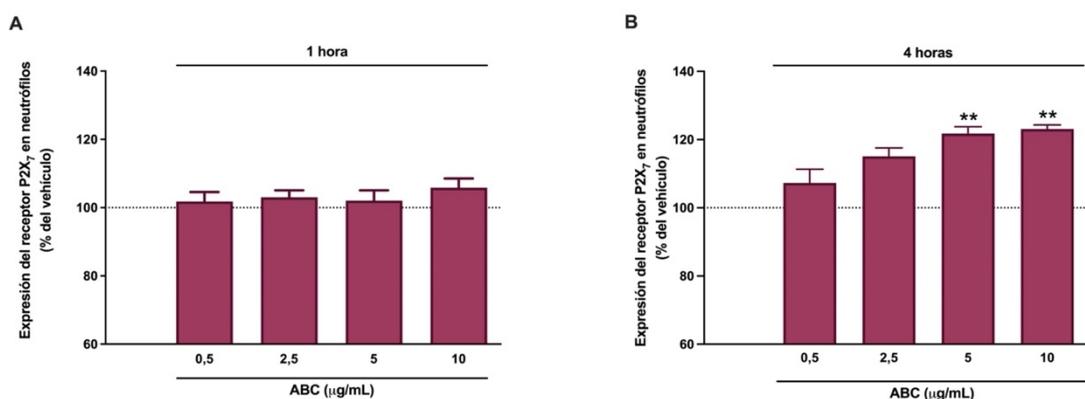


Figura 67. Efecto de abacavir (ABC) sobre la expresión del receptor P2X₇ en neutrófilos. Sangre entera procedente de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con ABC (0,5- 10 µg/mL) o salino durante: **A.** 1h o **B.** 4h. Tras el tratamiento, las muestras se incuban con el anticuerpo frente al receptor P2X₇-FITC, para cuantificar su expresión en la población de neutrófilos identificada por sus características de tamaño y granulosidad por el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de P2X₇-FITC normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=4-7. **p<0,01 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5.1.1. SEÑALIZACIÓN POST-ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR P2X₇

Como se ha mencionado en la introducción, la activación del P2X₇ conlleva la movilización de Ca²⁺, la producción de ROS y, si la activación del receptor se da por un tiempo prolongado, se produce la formación y apertura de poros en la membrana celular que permiten el paso de moléculas de elevado peso molecular (99).

Por ello, y dado que ABC induce sus efectos a través del receptor P2X₇, los siguientes pasos fueron analizar si ABC producía la movilización de calcio, la producción de ROS y la formación de poros en neutrófilos.

2.1.5.1.2. MOVILIZACIÓN DE CALCIO

En primer lugar, se analizaron los efectos de ABC sobre la movilización de Ca^{2+} en neutrófilos y se observó que el fármaco era capaz de inducir la movilización de Ca^{2+} de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ABC 5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figura 68A**). Posteriormente, se evaluó la implicación del receptor P2X_7 en la movilización de Ca^{2+} inducida por ABC, y se demostró que cuando se empleó el antagonista del receptor P2X_7 (A804598), hay una tendencia a la reducción del efecto de ABC, aunque esta no fue significativa (**Figura 68B**).

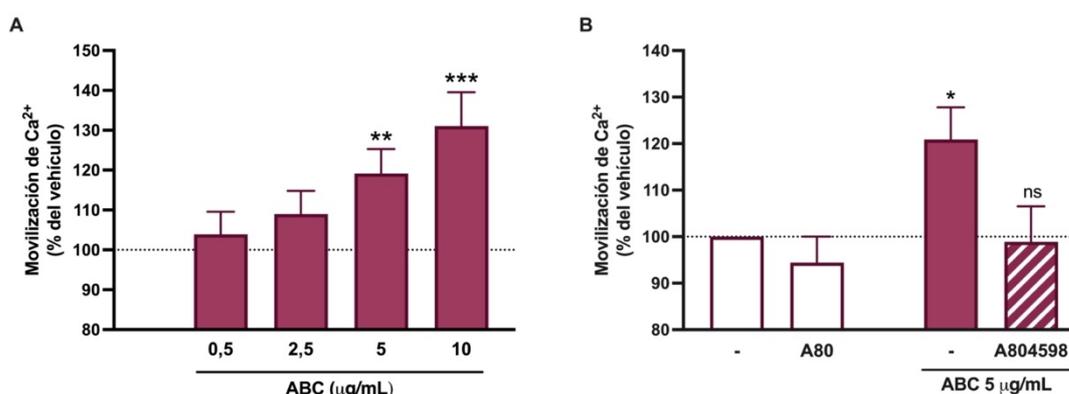


Figura 68. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X_7 sobre la movilización de Ca^{2+} en neutrófilos. **A.** Leucocitos polimorfonucleares (PMN), aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 0,5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o salino durante 1h. **B.** Los PMN se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X_7 (A804598, 1 μM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. A continuación, las muestras se incuban con FLUO-4-AM para cuantificar el Ca^{2+} . Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de FLUO-4-AM normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=4-7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ o *** $p < 0,001$ con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5.1.3. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Posteriormente, se determinaron los efectos de ABC sobre la producción de ROS en neutrófilos. Los resultados mostraron que el fármaco indujo la producción de ROS de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ABC 5 - 10 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 69A**). Al analizar la implicación del receptor P2X₇ en la producción de ROS inducida por ABC se observó que al tratar con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598), ABC no indujo estos efectos (**Figura 69B**). Por tanto, la producción de ROS inducida por ABC se da a través del receptor P2X₇.

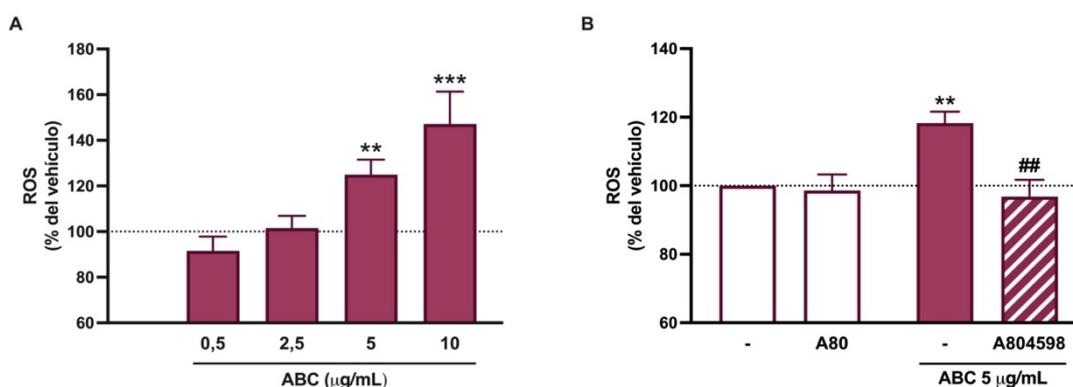


Figura 69. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X₇ sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos. A. Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con abacavir (ABC 0,5-10 $\mu\text{g/mL}$) o salino durante 1h. B. La sangre entera se trató con ABC 5 $\mu\text{g/mL}$ y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. A continuación, las muestras se incuban con 1,2,3-Dihidrorodamina para cuantificar la producción de ROS. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de 1,2,3-Dihidrorodamina normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=4-7. **p<0,01 o ***p<0,001 con respecto al control, ##p<0,01 con respecto al ABC 5 $\mu\text{g/mL}$ (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5.1.4. FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA CELULAR

Seguidamente, se evaluaron los efectos de ABC sobre la apertura de poros en neutrófilos, mediante el análisis de la internalización de la molécula de alto peso molecular YO-PRO-1. Los resultados mostraron que ABC indujo un aumento en la internalización de YO-PRO-1, de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ABC 5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figura 70A**). Ulteriormente, se determinó la implicación del receptor P2X₇ en la apertura del poro inducida por ABC, y se observó que cuando se empleó el antagonista del receptor P2X₇ (A804598), no se produjo el aumento en la internalización de YO-PRO-1 causada por ABC (**Figura 70B**). Por lo tanto, la apertura de poros inducida por ABC se da a través del receptor P2X₇.

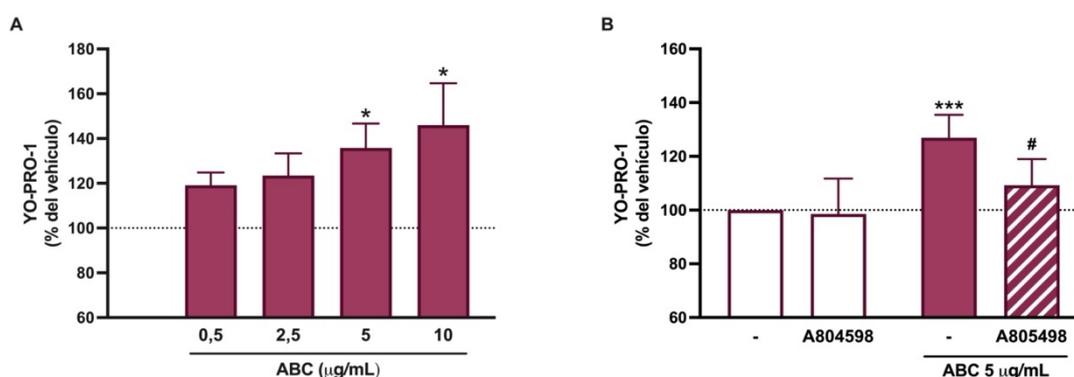


Figura 70. Efecto de abacavir (ABC) e implicación del receptor P2X₇ sobre la formación de poros en neutrófilos. **A.** Leucocitos polimorfonucleares (PMN), aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 0,5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o salino durante 1h. **B.** Los PMN se trataron con ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. Durante el tratamiento con ABC, las muestras se incuban con YO-PRO-1, para cuantificar su internalización en las células y con ello la formación de poros. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de YO-PRO-1 normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=5-9. * $p < 0,05$ o *** $p < 0,001$ con respecto al control, # $p < 0,05$ con respecto al ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5.1.5. LIBERACIÓN DE INTERLEUCINA-1 β

El último paso en el estudio de la activación del receptor P2X₇ fue analizar la liberación de IL-1 β , que constituye el paso final en el mecanismo de activación de este receptor (99).

Puesto que, tras la activación del receptor P2X₇ para que se llegue a producir la liberación de la IL-1 β se requiere de la translocación del NF- κ B al núcleo, la activación de la transcripción, la traducción del ARN mensajero producido y el procesamiento de la pro-IL-1 β por el inflamasoma NLRP3, en este caso el tratamiento con ABC fue de 4h para permitir que se dé el tiempo suficiente para que se produzca todo el proceso y se pueda observar la liberación de IL-1 β . Los resultados mostraron que ABC indujo la liberación de IL-1 β , de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ABC 2,5 - 10 μ g/mL) (**Figura 71**).

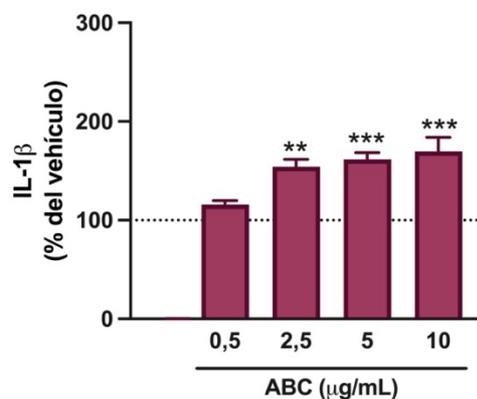


Figura 71. Efecto de abacavir (ABC) sobre la liberación de interleucina (IL)-1 β . Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 0,5 - 10 μ g/mL) o salino, durante 4h. Tras el tratamiento con ABC se recogió el sobrenadante y se analizaron los niveles de interleucina 1 β (IL-1 β) mediante un ensayo de ELISA. Los datos se presentan como el porcentaje de los niveles de IL-1 β normalizados respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=6-7. **p<0,01 o ***p<0,001 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.1.5.2. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X₇

Dada la implicación del receptor P2X₇ en los efectos observados del secretoma liberado por los neutrófilos se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de evaluar la implicación de este receptor a nivel fisiológico.

Los resultados obtenidos se recogen en la revisión titulada "*Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X₇ Receptor*" (99). Estos resultados pueden verse resumidos y representados en las **Figura 72** y **Figura 73**.

Estos resultados muestran que dependiendo de las concentraciones de ATP que se alcancen en el medio extracelular se pueden activar unas señales a nivel fisiológico como pueden ser la liberación de mediadores o la inducción de interacciones celulares, o por otro lado la activación de procesos como la apoptosis o la necrosis. Las altas concentraciones de ATP que se requieren para la activación del receptor P2X₇ implican importantes consecuencias a nivel fisiológico, ya que a partir de concentraciones de 1 mM el ATP puede inducir diferentes tipos de muerte celular, dependiendo de la duración de la exposición al ATP. Sin embargo, concentraciones más bajas de ATP pueden tener efectos opuestos, promoviendo la proliferación y aumento de la supervivencia de las células. En este contexto, la modulación alostérica positiva del receptor P2X₇ que aumenta la sensibilidad del receptor a concentraciones extracelulares bajas de ATP demuestra la relevancia de este receptor en el tejido no dañado.

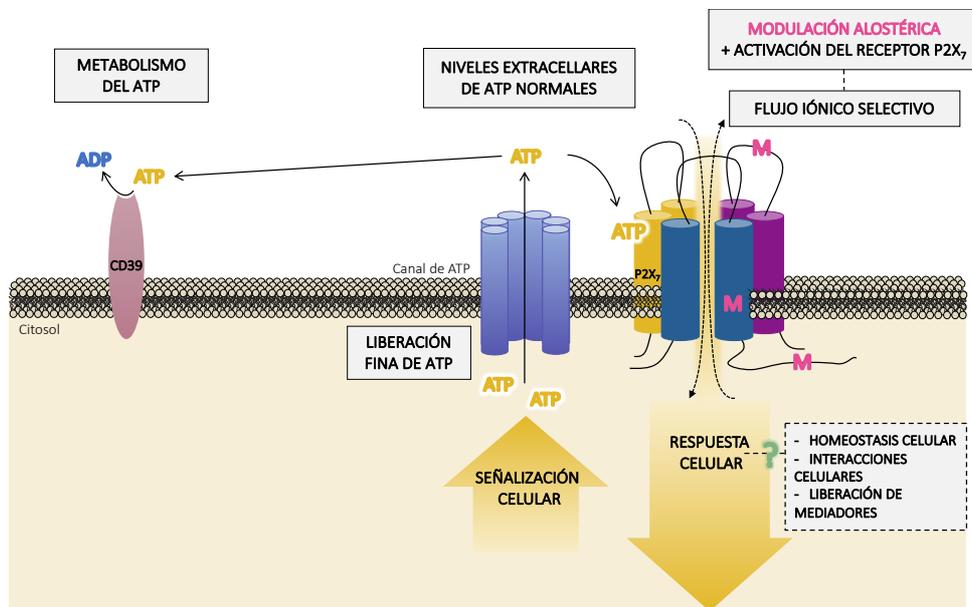


Figura 72. Papel del receptor P2X₇ en la homeostasis celular. En situaciones fisiológicas, la localización específica del receptor P2X₇ en la membrana, cerca de canales de adenosina trifosfato (ATP) y distantes de las enzimas de degradación del ATP, podría proporcionar la concentración extracelular de ATP suficiente para la activación del receptor. Además, esta activación puede tener lugar en presencia de un modulador alostérico positivo que puede unirse a diferentes dominios del receptor. Esto facilitará el flujo selectivo de iones a través del canal del receptor, induciendo así una vía de transducción que podría conducir a una respuesta de homeostasis celular sin inducir necesariamente daño celular (Adaptado de Martínez-Cuesta MA, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 (99)).

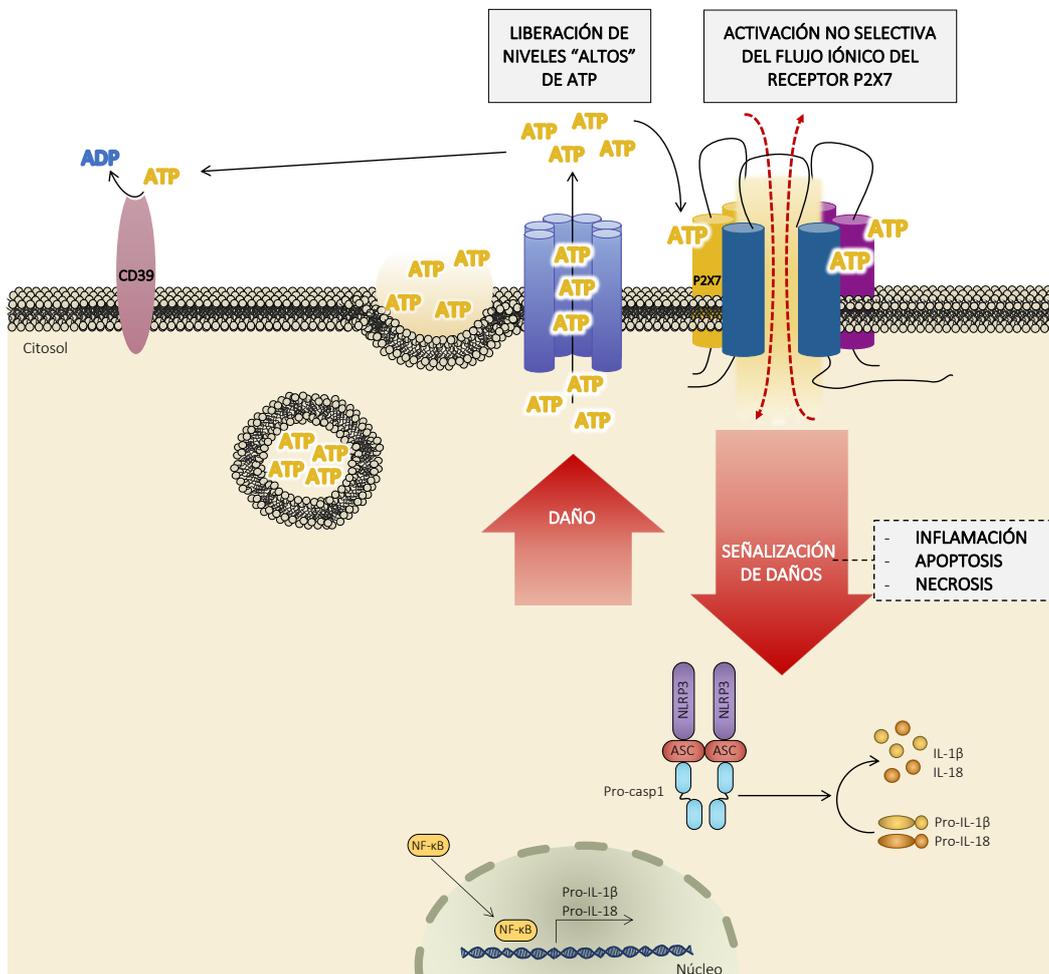


Figura 73. Papel del receptor P2X₇ en la señalización de daño celular. En respuesta a un daño severo, la célula libera una gran cantidad de adenosina trifosfato (ATP) por diferentes mecanismos (a partir de gránulos densos de ATP, canales de ATP, etc) y la concentración extracelular de ATP alcanzada podría ser suficiente para activar el receptor P2X₇, facilitando un flujo de iones grandes y la activación del inflamasoma. El complejo del receptor P2X₇/inflamasoma induce la síntesis de la interleucina (IL)-1β e IL-18, también regulada por NF-κB. Esta hipótesis concuerda con el papel del receptor P2X₇ en procesos como la inflamación, la apoptosis y la necrosis (Adaptado de Martínez-Cuesta, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 (99)).

2.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PROINFLAMATORIOS Y PROTROMBÓTICOS DE ATP

Dado los efectos observados con ABC, y que estos se debían a la actuación del fármaco a través del receptor P2X₇, se quiso comprobar si los mecanismos activados por ABC también se podían producir a nivel fisiológico o fisiopatológico analizando los efectos del agonista endógeno de este receptor, ATP.

2.2.1. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP

En primer lugar, se determinaron los efectos del secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}) sobre la interacción plaqueta-neutrófilo. Para ello, los neutrófilos fueron tratados durante 1h con ATP (0,5 - 10 μM), a continuación, se recogió el SN_{ATP} y se puso en contacto con plaquetas y neutrófilos sin tratar. En este caso como controles se emplearon plaquetas y neutrófilos tratados con las concentraciones finales de ATP que resultarían tras poner en contacto el SN_{ATP} con las células, realizando la dilución 1:2. Con estos controles, se pudo comprobar si los efectos que se observaron con el SN_{ATP}, se debían al secretoma liberado por los neutrófilos o a la presencia del ATP, que podría ser capaz de inducir estas interacciones por sí mismo.

Con esto, se observó que el SN_{ATP} (ATP 5 - 10 μM) indujo un aumento de las interacciones plaqueta-neutrófilo, mientras que sus respectivos controles no indujeron cambios en estas interacciones (**Figura 74**). Por tanto, estos resultados permiten afirmar que ATP induce la liberación de un secretoma por parte de los neutrófilos que es capaz de inducir las interacciones plaqueta-neutrófilo.

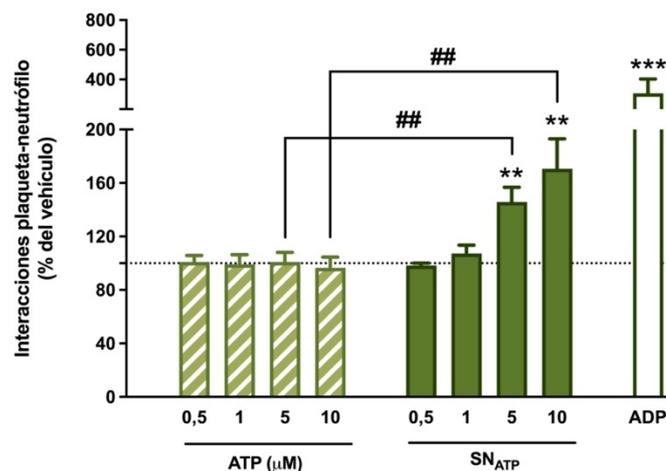


Figura 74. Efecto del secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo.

Leucocitos polimorfonucleares (PMN), aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μ M), ADP (10 μ M) o salino durante 1h. Tras el tratamiento el secretoma de los neutrófilos (SN_{ATP}) se recoge y se pone en contacto (15 min) con plaquetas y neutrófilos sin tratar o con sus respectivos controles de ATP. A continuación, las muestras se incuban con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=6-8. **p<0,01 o ***p<0,001 con respecto al control, ##p<0,01 con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (Test Kruskal-Wallis).

2.2.2. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LOS EFECTOS DE ATP

El ATP, es el agonista endógeno de los receptores purinérgicos P2X, por lo que el siguiente paso fue evaluar los receptores P2X implicados en la liberación del secretoma de los neutrófilos inducido por ATP. Para llevar a cabo este objetivo, se emplearon los antagonistas de los receptores P2X₁ (NF449), P2X_{2/3} (A317491), P2X₄ (5-BDBD) y P2X₇ (A804598), previo al tratamiento con ATP. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se puso en contacto el SN_{ATP} con plaquetas y neutrófilos sin tratar, para determinar el efecto del secretoma sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Con esto, se observó que los antagonistas NF449, 5-BDBD y A804598 revirtieron en cierta medida los efectos del SN_{ATP}, aunque ninguno de ellos lo hizo completamente (**Figura 75**). Así, se puede confirmar que los receptores P2X₁, P2X₄ y P2X₇, están implicados en la liberación del secretoma inducido por ATP.

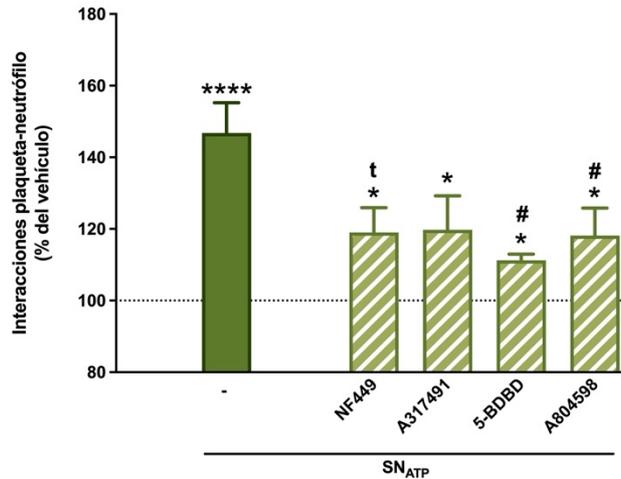


Figura 75. Implicación de los receptores purinérgicos en los efectos inducidos por el secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}) sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP 5 μ M o salino durante 1 h, y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₁ (NF449, 100 μ M), P2X_{2/3} (A317491, 25 nM), P2X₄ (5-BDBD, 1,5 μ M), o P2X₇ (A804598, 1 μ M), durante 30 min, previo al tratamiento con ATP. Tras el tratamiento el secretoma de los leucocitos se recoge y se pone en contacto (15 min) con plaquetas y neutrófilos sin tratar. Después, las muestras se incuban con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=6-8. *p<0,05 o ****p<0,0001 con respecto al control, #p<0,05 con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (Test Kruskal-Wallis); †p<0,05 con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (t test con la corrección de Welch).

2.2.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL SECRETOMA LIBERADO POR NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP

Con la finalidad de analizar las proteínas liberadas en el secretoma que induce las interacciones plaqueta-neutrófilo, se realizó un estudio proteómico de los secretomas liberados por neutrófilos tratados con ATP. Puesto que, en este caso no se observó un efecto claro de ninguno de los receptores purinérgicos, se analizó el secretoma liberado por neutrófilos tratados con ATP o con el vehículo.

2.2.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El análisis de la agrupación de las muestras se realizó en primer lugar mediante el análisis de componentes principales, que clasifica las muestras sin conocer previamente a que grupo pertenecen. Con este análisis se observó que las muestras

no se agrupaban según los tratamientos experimentales (**Figura 76A**). Por tanto, posteriormente se realizó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales, y en este caso, sí que se diferenciaron los dos grupos experimentales (**Figura 76B**).

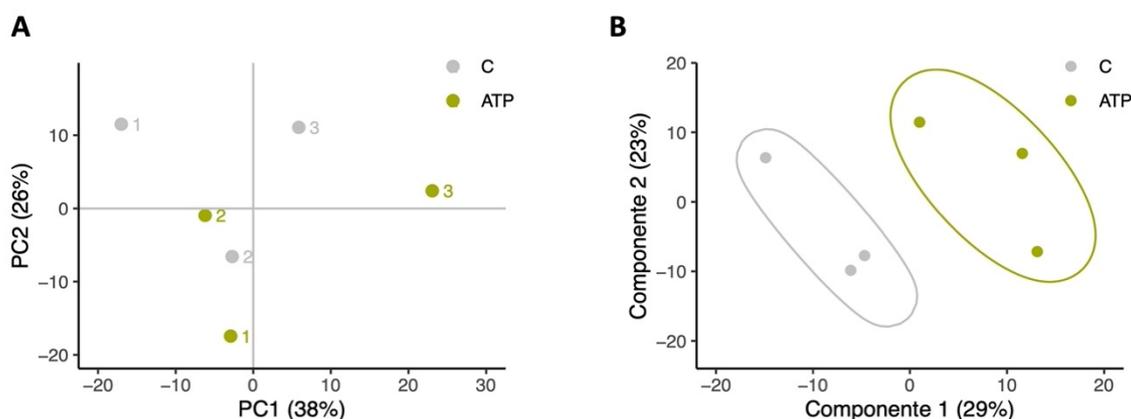


Figura 76. Clasificación de los secretomas analizados en el estudio de ATP por proteómica. A. Análisis de componentes principales para la agrupación de las muestras. La componente principal 1 (PC1) explica el 38% de la variabilidad entre las muestras y la PC2 el 26%. Las muestras de los diferentes donantes están marcadas numéricamente y las condiciones experimentales con los diferentes colores. **B.** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). La componente 1 explica el 29% de la variabilidad entre muestras, y la componente 2 el 23%.

2.2.3.2. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN LAS QUE ATP INDUCE CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN

En el análisis diferencial de las proteínas detectadas en los secretomas entre los diferentes grupos experimentales, se observó que ATP, del mismo modo que ABC, inducía cambios significativos en los niveles del receptor LOX-1 y en otras 10 de las proteínas detectadas. Estas proteínas son la haptoglobina, trombospondina-1, complemento C4B y C3, la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1, clusterina, twinfilina-2, proteína S100 A7, α -2-macroglobulina, fosfoproteína 1 inducida por estrés, y LOX-1 (**Figura 77**).

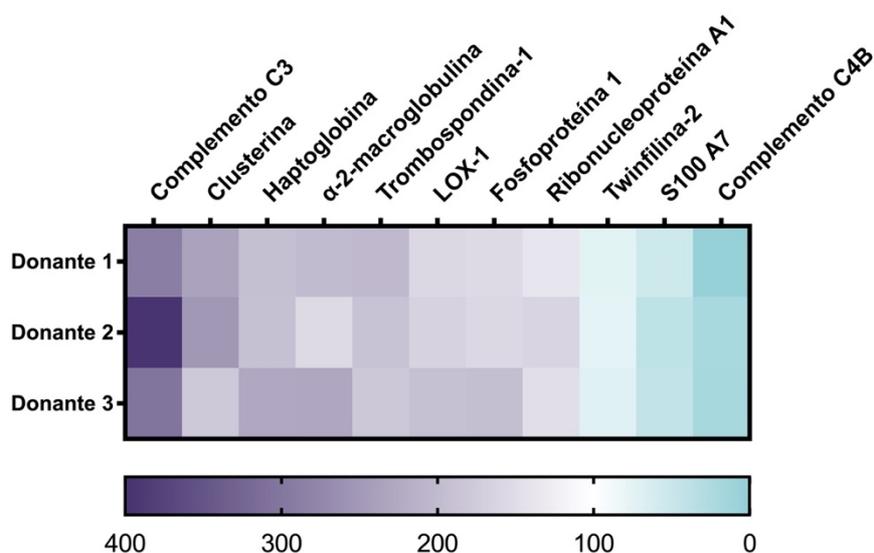


Figura 77. Proteínas en las que ATP induce cambios significativos en el secretoma liberado por los neutrófilos. Se representan las proteínas en las que ATP induce cambios significativos en sus niveles en el secretoma. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP 5 μ M o salino durante 1h. Tras el tratamiento el secretoma liberado fue procesado y analizado mediante un espectrómetro de masas (LC-MS/MS). Las proteínas fueron identificadas mediante *ProteinPilot* y las áreas con *MarkerView*. Las columnas corresponden a las diferentes proteínas analizadas y las filas al valor de cada uno de los donantes para esa proteína. Los resultados se presentan como el porcentaje de los niveles de las proteínas normalizados respecto al vehículo (100%). n=3. (t test con la corrección de Welch).

2.2.3.2.1. EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEINAS EN LAS QUE ATP INDUCE CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN

Las proteínas en las que ATP indujo cambios en sus niveles en el secretoma liberado por los neutrófilos, se analizaron en la base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID), con la finalidad de evaluar sus funciones biológicas y moleculares, y los componentes celulares a los que pertenecen.

En este sentido, los términos GO referentes a los componentes celulares que se detectaron fueron micropartículas sanguíneas, exosoma y espacio extracelular, lumen de los gránulos azurófilos y de los gránulos α plaquetarios, superficie celular y complejos macromoleculares (**Tabla 13**). En cuanto a los términos GO referentes a los procesos biológicos se observó que las proteínas sobre las que actuaba ATP

estaban relacionadas con la respuesta inflamatoria y la inmunidad innata, la activación del complemento, la desgranulación de neutrófilos y plaquetas, la respuesta celular a factores de crecimiento, la regulación positiva de la eliminación de células apoptóticas, la regulación positiva de la endocitosis mediada por receptores, y la regulación negativa de la actividad endopeptidasa (**Tabla 14**).

Tabla 13. Términos GO relacionados con los componentes celulares asociados con las proteínas en las que ATP induce cambios en sus niveles en el secretoma liberado por los neutrófilos.

Código GO	Término	p-valor	Fold Enrichment	Proteínas
GO:0072562	Micropartículas sanguíneas	5,07E-07	64	Complemento C3 y C4B, Haptoglobina, Clusterina α -2-macroglobina
GO:0070062	Exosoma extracelular	1,71E-05	7	Complemento C3 y C4B, Haptoglobina, Twinfilin-2, Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1, Trombospondina-1, α -2-macroglobina, Clusterina
GO:0005615	Espacio extracelular	1,08E-04	7	Complemento C4B, Haptoglobina, Proteína S100 A7, Trombospondina-1, Complemento C3, α -2-macroglobina, Clusterina
GO:0035578	Lumen gránulos azurófilos	4,42E-02	40	Proteína S100 A7, Complemento C3
GO:0031093	Lumen de gránulos α plaquetarios	4,81E-04	82	Trombospondina-1, Clusterina α -2-macroglobina
GO:0009986	Superficie celular	3,60E-02	9	Trombospondina-1, Clusterina, Complemento C3
GO:0032991	Complejos macromoleculares	4,41E-02	8	Fosfoproteína 1 inducida por estrés, Complemento C3, Clusterina

Tabla 14. Términos GO relacionados con los procesos biológicos asociados con las proteínas en las que ATP induce cambios en sus niveles en el secretoma liberado por los neutrófilos.

Código GO	Término	p-valor	Fold	
			Enrichment	Proteínas
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	9,65E-04	17	Trombospondina-1, LOX-1, Complemento C3 y C4B
GO:0045087	Respuesta inmune innata	3,71E-02	9	Complemento C4B, Clusterina, Proteína S100 A7
GO:0006956	Activación del complemento	1,05E-03	56	Complemento C3 y C4B, Clusterina
GO:0043312	Desgranulación de neutrófilos	1,62E-03	15	Haptoglobina, Proteína S100 A7, LOX-1, Complemento C3
GO:0002576	Desgranulación de plaquetas	1,80E-03	42	Trombospondina-1, Clusterina, α -2-macroglobulina
GO:0071363	Respuesta celular a factores de crecimiento	2,96E-02	61	Twinfilina-2, Trombospondina-1
GO:2000427	Regulación positiva de la eliminación de células apoptóticas	3,10E-03	586	Complemento C3 y C4B
GO:0048260	Regulación positiva de la endocitosis mediada por receptores	1,18E-02	153	Complemento C3, Clusterina
GO:0010951	Regulación negativa de la actividad endopeptidasa	2,61E-03	35	Complemento C3 y C4B, α -2-macroglobulina

2.2.4. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON ATP

Entre las proteínas en las que ATP indujo cambios en sus niveles en el secretoma, se encontraba la proteína LOX-1, al igual que ocurrió en el secretoma inducido por ABC. Por lo que a pesar de que ATP indujo cambios en más proteínas decidimos centrarnos en LOX-1, ya que con ABC ya se demostró que esta proteína era capaz de inducir las interacciones plaqueta-neutrófilo. Por tanto, se analizó la expresión de este receptor en los neutrófilos y las plaquetas. El tratamiento con ATP (5 -10 μ M) causó un incremento en la expresión de LOX-1 en neutrófilos (**Figura 78A**). Sin embargo, ATP no indujo cambios en la expresión de LOX-1 en plaquetas (**Figura 78B**). Al analizar la implicación funcional de este receptor en los efectos inducidos por el SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo los resultados mostraron que el anticuerpo bloqueante frente a LOX-1, pero no el isotipo control, revertía los efectos del SN_{ATP} en la inducción de las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 78C**), confirmando así la implicación de LOX-1 en dichas interacciones inducidas por SN_{ATP}.

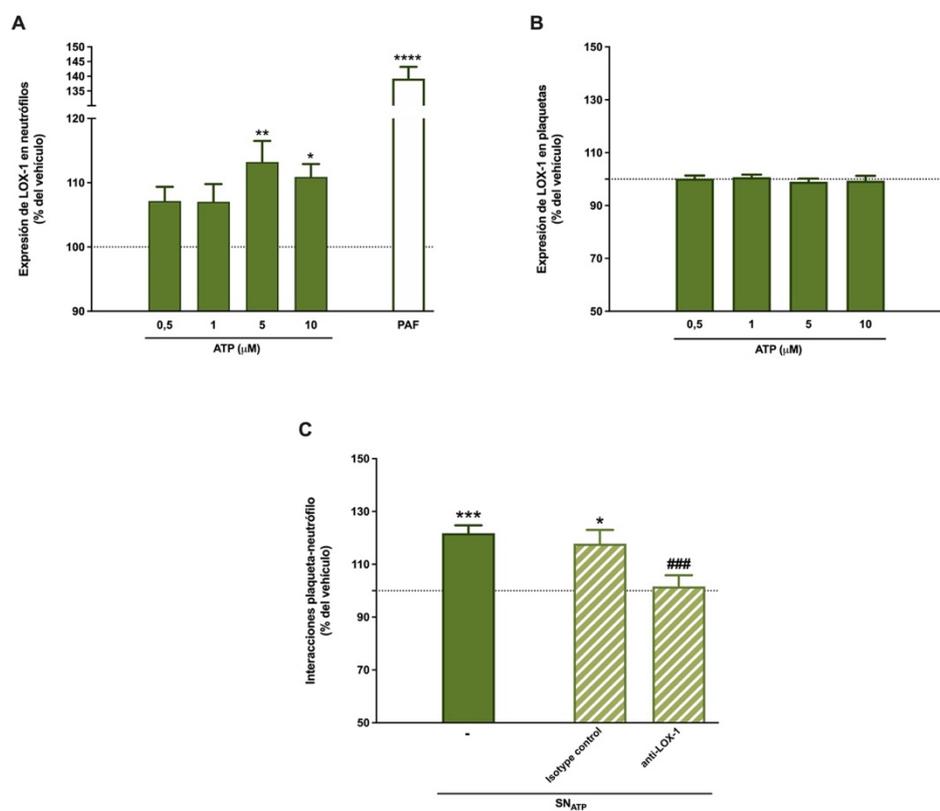


Figura 78. Efecto de ATP en la expresión de LOX-1 en neutrófilos y plaquetas, y su implicación en los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. **A.** Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μM), PAF (1 μM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo del receptor LOX-1-FITC, y se evaluó su expresión en neutrófilos, identificados en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **B.** Plaquetas aisladas de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo del receptor LOX-1-FITC, y se evaluó su expresión en plaquetas, identificadas en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **C.** Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP 5 μM o salino durante 1h. En algunos casos el secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}) fue tratado con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con su isotipo control, durante 30 min. Tras el tratamiento el SN_{ATP} se puso en contacto (15 min) con plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. $n=4-8$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ o **** $p<0,0001$ con respecto al control, ### $p<0,001$ con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (Test Kruskal-Wallis).

Posteriormente, se evaluaron las proteínas responsables de la escisión del receptor LOX-1 en la producción de su forma soluble (sLOX-1), ADAM10 y ADAM17. En primer lugar, se analizaron los efectos de ATP sobre la expresión de ambas proteínas, y se observó que ATP indujo un aumento en la expresión de ADAM10 (**Figura 79A**) y ADAM17 (**Figura 79B**) en neutrófilos de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ATP 5 -10 μ M). En ambos casos se empleó el control positivo PAF, con el que también se observó un incremento en la expresión de ambas proteínas, aunque mayor que el que indujo ATP (**Figura 79A y B**). En segundo lugar, se determinó la implicación de ambas proteínas en los efectos observados del SN_{ATP} , empleando GI254023X, inhibidor de ADAM10, y TAPI-1, inhibidor de ADAM17. El tratamiento con estos dos inhibidores por separado disminuyó el efecto del SN_{ATP} , pero no lo revirtió de forma significativa, no obstante, el tratamiento combinado con ambos inhibidores sí consiguió revertir por completo los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Estos resultados indican que la escisión producida por ADAM10 y ADAM17 del receptor LOX-1 es esencial para promover las interacciones plaqueta-neutrófilo inducidas por SN_{ATP} .

Por último, en el estudio del mecanismo del SN_{ATP} responsable de las interacciones plaqueta-neutrófilo, se analizó la ruta de señalización implicada en las plaquetas, tal y como se había realizado en el caso de ABC. Por lo tanto, se evaluó la implicación de HSP70, la liberación de gránulos plaquetarios, y los receptores purinérgicos de las plaquetas ($P2X_1$, $P2Y_1$, $P2Y_{12}$). Para abordar este objetivo, se emplearon los inhibidores de HSP70 (VER-155008), de la liberación de gránulos (glioxilato), y los antagonistas de los receptores purinérgicos plaquetarios $P2X_1$ (NF449), $P2Y_1$ (MRS2500) y $P2Y_{12}$ (AR-C 66096). Los resultados mostraron que el uso de estos inhibidores revirtió los efectos observados del SN_{ATP} en las interacciones plaqueta-neutrófilo (**Figura 80**). Por lo tanto, HSP70, la liberación de los gránulos plaquetarios, y los receptores purinérgicos de las plaquetas $P2X_1$, $P2Y_1$ y $P2Y_{12}$ están implicados en las interacciones plaqueta-neutrófilo inducidas por SN_{ATP} .

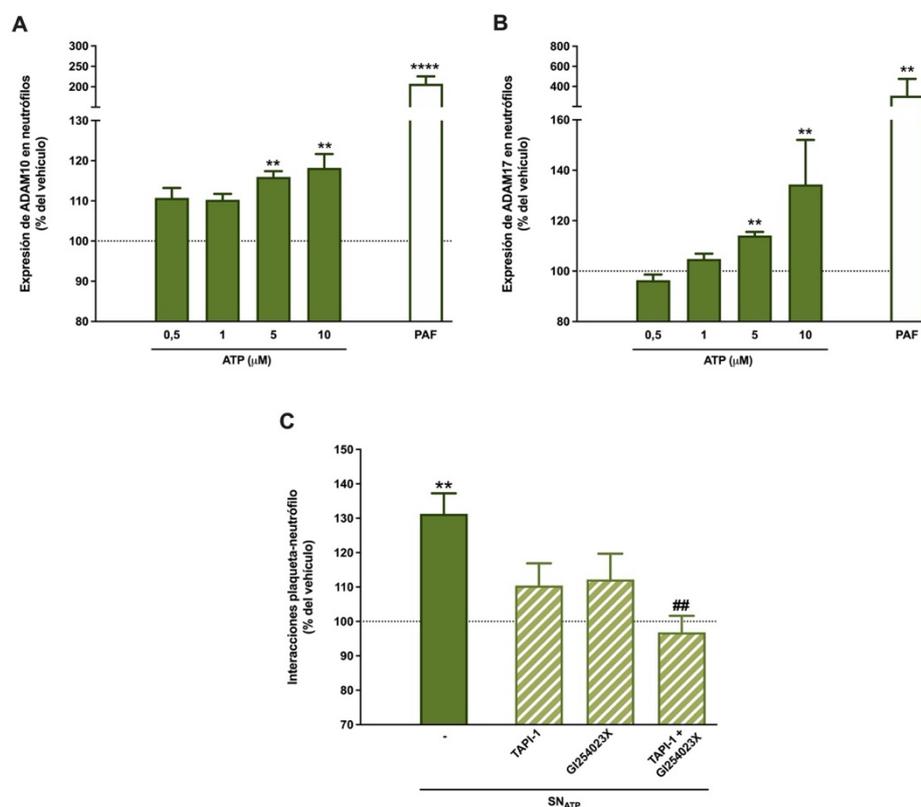


Figura 79. Efecto de ATP en la expresión de ADAM10 y ADAM17 en neutrófilos y su implicación en los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. A. y B. Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μM), PAF (1 μM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo de **A.** ADAM10-PE o **B.** ADAM17-PE, para evaluar su expresión en neutrófilos identificados en el citómetro de flujo por sus características de tamaño y granulosidad. **C.** Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP 5 μM o salino durante 1h, y en algunos casos se trataron con los inhibidores de ADAM10 (GI254023X, 10 μM) y/o de ADAM17 (TAPI-1, 2 μM), durante 30 min previo al tratamiento con ATP. Tras el tratamiento, el secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}) se puso en contacto (15 min) con plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=5. **p<0,01 o ****p<0,0001 con respecto al control, ##p<0,01 con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (Test Kruskal-Wallis).

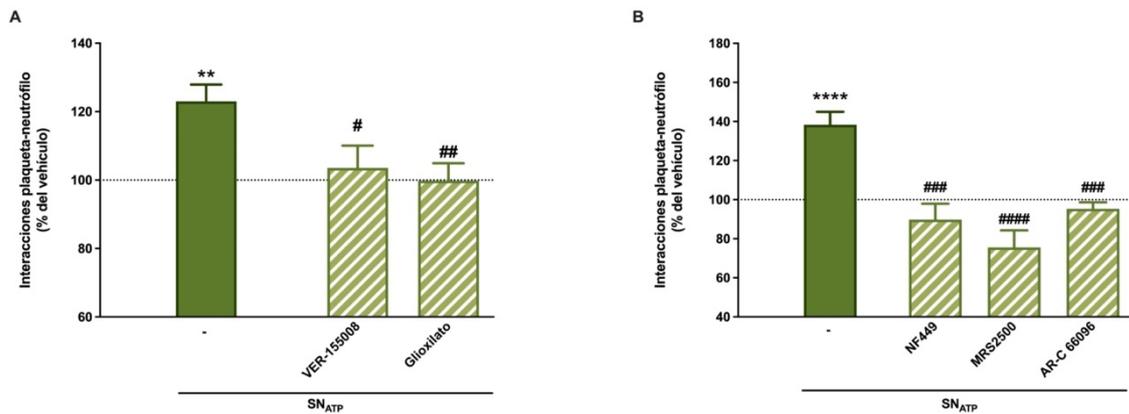


Figura 80. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos plaquetarios y los receptores purinérgicos plaquetarios P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ en los efectos del SN_{ATP} sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP 5 μ M o salino durante 1h. **A.** En algunos casos las plaquetas se trataron con los inhibidores de HSP70 (VER-155005, 20 μ M) o de la liberación de gránulos (glioxilato, 100 μ M), durante 15 min previo al tratamiento con el secretoma de neutrófilos tratados con ATP (SN_{ATP}). **B.** En algunos casos las plaquetas se trataron con los antagonistas del receptor P2X₁ (NF449, 100 μ M), P2Y₁ (MRS2500, 100 μ M) o P2Y₁₂ (AR-C 66096, 10 μ M) durante 15 min previo al tratamiento con el SN_{ATP}. Tras el tratamiento, el SN_{ATP} se puso en contacto (15 min) con las plaquetas y neutrófilos sin tratar, y después, las muestras se incubaron (10 min) con el anticuerpo específico de plaquetas CD41-PE, para cuantificar la presencia de plaquetas en la población de neutrófilos, identificada mediante el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=4-5. **p<0,01 o ****p<0,0001 con respecto al control, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 o ####p<0,0001 con respecto al grupo tratado con SN_{ATP} (Test Kruskal-Wallis).

2.2.5. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DE NEUTRÓFILOS EN LOS EFECTOS DE ATP

2.2.5.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR P2X₇

Dada la importancia del receptor P2X₇ en los efectos de ABC, decidimos estudiar este receptor en profundidad también en los efectos inducidos por ATP. En primer lugar, evaluamos los efectos de ATP sobre la expresión de este receptor. Los resultados mostraron que el tratamiento con ATP durante 1h de los neutrófilos no inducía cambios en la expresión del receptor (**Figura 81A**). Sin embargo, el tratamiento durante 4h sí que indujo un incremento concentración dependiente en la expresión del receptor P2X₇ en neutrófilos, siendo ATP 1 μ M la concentración mínima del fármaco capaz de inducir este efecto (**Figura 81B**).

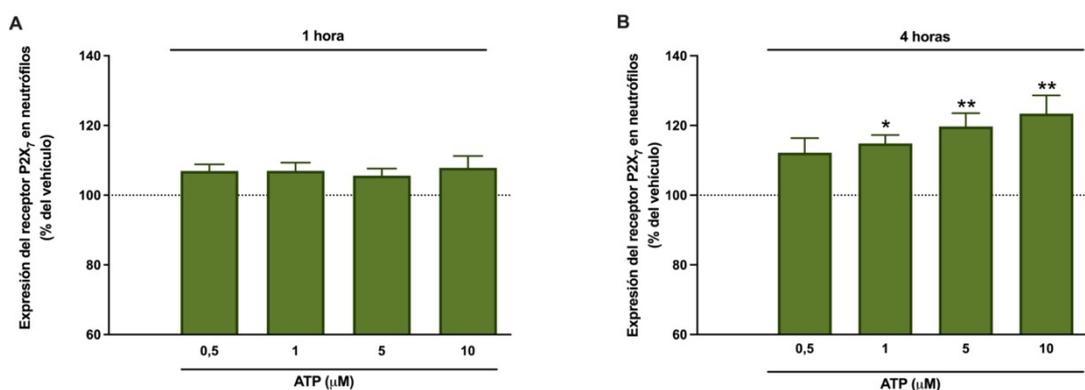


Figura 81. Efecto de ATP sobre la expresión del receptor P2X₇. Sangre entera procedente de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μM) o salino durante: **A.** 1h o **B.** 4h. Tras el tratamiento, las muestras se incuban con el anticuerpo frente al receptor P2X₇-FITC, para cuantificar su expresión en la población de neutrófilos identificada por sus características de tamaño y granulosidad por el citómetro de flujo. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de P2X₇-FITC normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=4-6. *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.2.5.2. SEÑALIZACIÓN POST-ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS

Como se ha mencionado en la introducción, la activación de los receptores purinérgicos conlleva la movilización de Ca²⁺, la producción de ROS y en el caso del receptor P2X₇, si la activación del receptor se da por un tiempo largo se produce la formación y apertura de poros en la membrana celular que permiten el paso de moléculas de alto peso molecular.

Por ello, los siguientes pasos fueron analizar los efectos de ATP sobre la movilización de calcio, la producción de ROS y la formación de poros en neutrófilos.

2.2.5.2.1. MOVILIZACIÓN DE CALCIO

En primer lugar, se analizaron los efectos de ATP sobre la movilización de Ca²⁺ en neutrófilos y se observó que este era capaz de inducir la movilización de Ca²⁺ de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ATP 1 - 10 μM) (**Figura 82**).

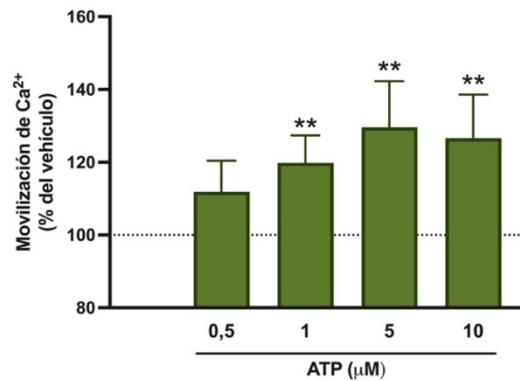


Figura 82. Efecto de ATP sobre la movilización de Ca²⁺ en neutrófilos. Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP (0,5 - 10 µM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incuban con FLUO-4-AM para cuantificar la movilización de Ca²⁺. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de FLUO-4-AM normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=7. **p<0,01 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.2.5.2.2. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Posteriormente, se determinaron los efectos de ATP sobre la producción de ROS en neutrófilos. Los resultados mostraron que el fármaco indujo la producción de ROS de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ATP 1 - 10 µM) (**Figura 83**).

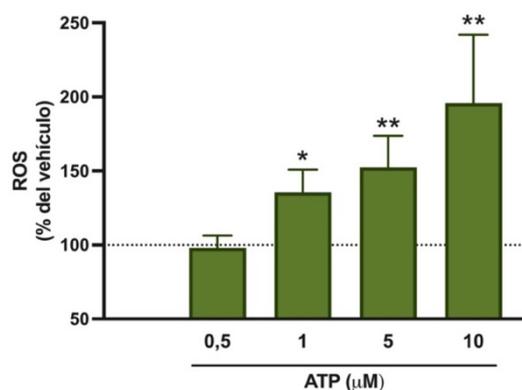


Figura 83. Efecto de ATP sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos. Sangre entera de donantes sin infección por VIH, se trató *in vitro* con ATP (0,5 - 10 µM) o salino durante 1h. A continuación, las muestras se incuban con 1,2,3-Dihidrorodamina para cuantificar la producción de ROS. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de 1,2,3-Dihidrorodamina normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media ± EEM. n=7. *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

2.2.5.2.3. FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA CELULAR

Seguidamente, se evaluaron los efectos de ATP sobre la apertura de poros en neutrófilos, mediante el análisis de la internalización de la molécula de alto peso molecular YO-PRO-1. Los resultados mostraron que ATP indujo un aumento en la internalización de YO-PRO-1, indicando la formación de poros, de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ATP 1 - 10 μM) (**Figura 84A**). Ulteriormente, se determinó la implicación del receptor P2X₇ en la apertura del poro inducida por ATP, y se observó que cuando se empleó el antagonista del receptor P2X₇ (A804598), no se produjo el aumento en la internalización de YO-PRO-1 causada por ATP (**Figura 84B**). Por lo tanto, la apertura de poros inducida por ATP se da a través del receptor P2X₇.

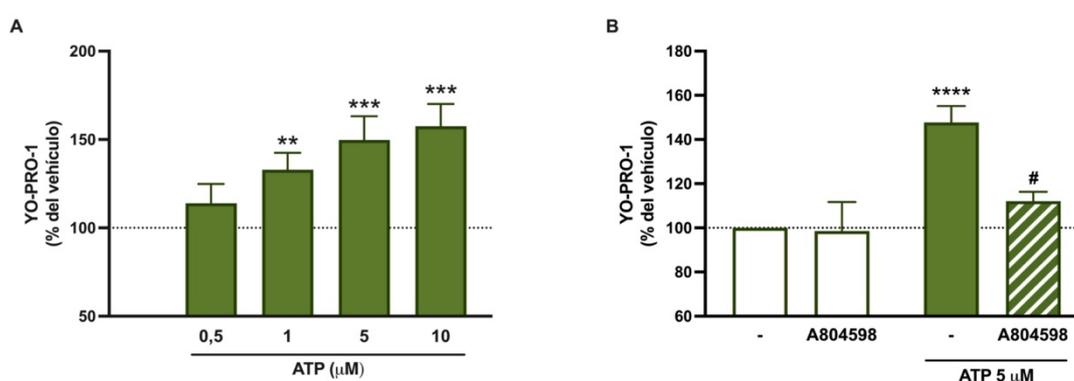


Figura 84. Efecto de ATP y la implicación del receptor P2X₇ sobre la formación de poros en neutrófilos. **A.** Leucocitos polimorfonucleares (PMN), aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP (0,5 - 10 μM) o salino durante 1h. **B.** Los PMN se trataron con ATP 5 μM y en algunos casos con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μM) durante 30 min, previo al tratamiento con ABC. Durante el tratamiento con ABC, las muestras se incuban con YO-PRO-1, para cuantificar su internalización en las células y con ello la formación de poros. Los datos se presentan como el porcentaje de la mediana de la intensidad de fluorescencia de YO-PRO-1 normalizada respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=7-10. **p<0,01, ***p<0,001 o ****p<0,0001 con respecto al control, #p<0,05 con respecto al ABC 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Test Kruskal-Wallis).

2.2.5.2.4. LIBERACIÓN DE INTERLEUCINA-1 β

El último paso en el estudio de la activación de los receptores purinérgicos fue analizar la liberación de IL-1 β , que constituye el paso final en el mecanismo de activación del receptor P2X₇ y otros receptores purinérgicos.

Puesto que, tras la activación de los receptores purinérgicos para que se llegue a producir la liberación de la IL-1 β se requiere de la translocación del NF- κ B al núcleo, la activación de la transcripción, la traducción del ARN mensajero producido y el procesamiento de la pro-IL-1 β por el inflamasoma NLRP3, en este caso el tratamiento con ATP fue de 4h para permitir que se dé el tiempo suficiente para que se produzca todo el proceso y se pueda observar la liberación de IL-1 β . Los resultados mostraron que ATP indujo la liberación de IL-1 β , de forma concentración dependiente (siendo efectivas las concentraciones de ATP 1 - 10 μ M) (**Figura 85**).

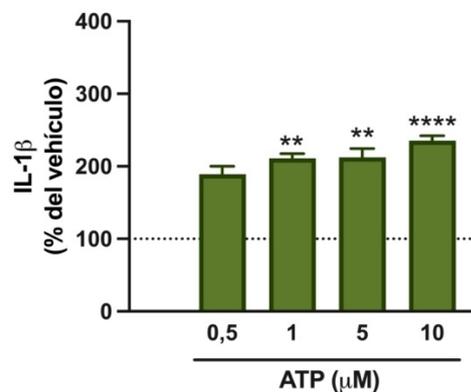


Figura 85. Efecto de ATP sobre la liberación de IL-1 β . Leucocitos polimorfonucleares, aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con ATP (0,5-10 μ M) o salino, durante 4h. Tras el tratamiento con ATP se recogió el sobrenadante y se analizaron los niveles de interleucina 1 β (IL-1 β) mediante un ensayo de ELISA. Los datos se presentan como el porcentaje de los niveles de IL-1 β normalizados respecto al control (100% línea de puntos). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. n=5-6. **p<0,01 o ****p<0,0001 con respecto al control (Test Kruskal-Wallis).

3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS TROMBÓTICOS EN UN MODELO ANIMAL *IN VIVO*

3.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS POR LOS QUE ABACAVIR INDUCE LA FORMACIÓN DE TROMBOS EN UN MODELO *IN VIVO* INDUCIDO POR FeCl₃

3.1.1. MODELO AGUDO

Previamente se había demostrado que ABC, al igual que el estímulo positivo rofecoxib, era capaz de inducir la formación de trombos en el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃ (225), produciendo un descenso en el tiempo de oclusión y que este efecto se producía mediante el receptor P2X₇ (225). En este estudio reproducimos el efecto de ABC y se analizaron los mecanismos responsables.

En primer lugar, evaluamos la implicación del receptor LOX-1 en la formación de trombos inducida por ABC, empleando un anticuerpo bloqueante de este receptor. Se observó que el tratamiento de los ratones con el anticuerpo bloqueante de LOX-1, pero no con el isotipo control, revertía los efectos observados de ABC sobre el tiempo de oclusión, no llegando a inducir la formación de trombos (**Figura 86**). Por otro lado, el anticuerpo bloqueante de LOX-1 y el control del isotipo, no alteraron los efectos inducidos por rofecoxib, empleado como control positivo de la formación de trombos, demostrando que en el caso del rofecoxib la formación de trombos es independiente del receptor LOX-1 (**Figura 86**).

A continuación, analizamos la importancia de diferentes proteínas y receptores de las plaquetas, cuya implicación se había evaluado previamente en los ensayos *in vitro*. Para ello se empleó el inhibidor de la proteína HSP70 (VER-155008), un inhibidor de la desgranulación (clodronato), y los antagonistas de los receptores P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂ (NF449, MRS2500 y clopidogrel, respectivamente). El tratamiento de los ratones con estos inhibidores revirtió la formación de trombos inducida por ABC. Por tanto, la proteína HSP70, la liberación de gránulos y los receptores P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂ están involucrados en el mecanismo por el que ABC induce la formación de trombos (**Figura 87**).

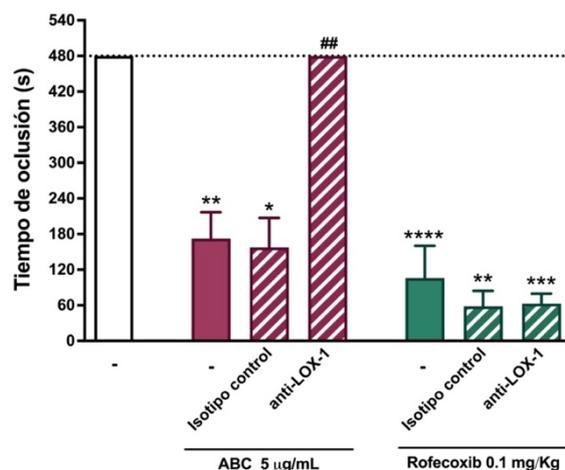


Figura 86. Implicación del receptor LOX-1 en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC).

Los ratones fueron tratados vía intraescrotal con 100 µL de ABC (5 µg/mL) o salino (vehículo) durante 4h, o por vía intraperitoneal con el control positivo rofecoxib (0,1 mg/kg) durante 2h. En algunos casos los ratones fueron pre-tratados, vía intraperitoneal, con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (100 µg/mL) o con su control del isotipo, 30 min previo al tratamiento con ABC o rofecoxib. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 4. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 o ****p<0,0001 con respecto al vehículo, ##p<0,01 con respecto al ABC 5 µg/mL (test de Kruskal-Wallis).

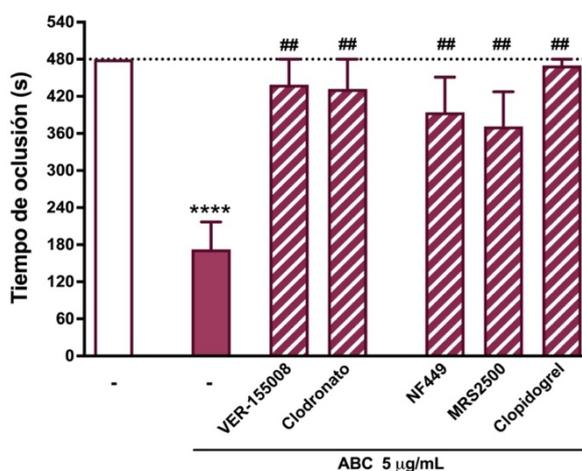


Figura 87. Implicación de HSP70, la liberación de gránulos, los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂, y la ciclooxygenasa en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC).

Los ratones fueron tratados vía intraescrotal con 100 µL de ABC (5 µg/mL) o salino (vehículo) durante 4h. En algunos casos los ratones fueron pre-tratados, vía intraperitoneal, con un inhibidor de HSP70 (VER-155008, 50 mg/kg), con un inhibidor de la liberación de gránulos (clodronato, 10 mg/kg), o con los antagonistas de los receptores P2X₁ (NF449, 10 mg/kg), P2Y₁ (MRS2500, 2 mg/kg), o P2Y₁₂ (clopidogrel, 8,5 mg/kg), 30 min previo al tratamiento con ABC. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min. Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 4. ****p<0,0001 con respecto al vehículo, ##p<0,01 con respecto al ABC 5 µg/mL (test de Kruskal-Wallis).

3.1.2. MODELO CRÓNICO

Para acercarnos al modelo murino a la práctica clínica, en la que los pacientes toman los fármacos diariamente, tratamos los ratones con ABC diariamente durante un mes, y tras finalizar este tratamiento se realizó el modelo de trombosis inducida por FeCl_3 .

En primer lugar, se observó que el tratamiento durante un mes con ABC también inducía una disminución del tiempo de oclusión, y por lo tanto la formación de trombos. Además, analizamos la implicación de los receptores P2X_7 y LOX-1 en el efecto pro-trombótico del tratamiento crónico con ABC. Para ello, se empleó el antagonista del receptor P2X_7 (A804598) y el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 . Los resultados mostraron que ambos inhibidores eran capaces de revertir los efectos de ABC. Por tanto, la formación de trombos inducida por el tratamiento crónico con ABC es dependiente de los receptores P2X_7 y LOX-1 (**Figura 88**).

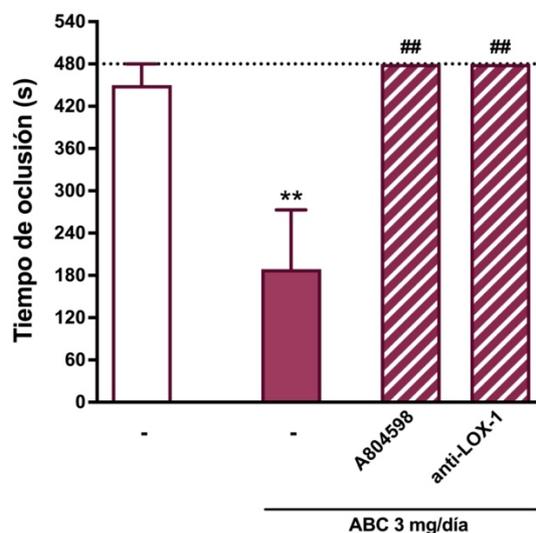


Figura 88. Efecto del tratamiento crónico con abacavir (ABC) y la implicación de los receptores P2X_7 y LOX-1 en la formación del trombo inducida por ABC. Los ratones fueron tratados vía oral con ABC (3 mg/día) o agua (vehículo) diariamente durante 1 mes. En algunos casos los ratones también se trataron, vía intraperitoneal, con un antagonista del receptor P2X_7 (A804598, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o con el anticuerpo bloqueante frente a LOX-1 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras un mes de tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μL de FeCl_3 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl_3 hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media \pm EEM, $n \geq 4$. ** $p < 0,01$ con respecto al vehículo, ## $p < 0,01$ con respecto al ABC 3 mg/día (test de Kruskal-Wallis)

3.2. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE ATP Y SUS MECANISMOS EN UN MODELO *IN VIVO* DE TROMBOSIS INDUCIDO POR FeCl₃

3.2.1. MODELO AGUDO

En el caso del ATP, en primer lugar, se evaluó su capacidad de inducir la formación de trombos. Para ello, tratamos los ratones con diferentes concentraciones de ATP, y posteriormente llevamos a cabo el modelo de trombosis inducida por FeCl₃. Los resultados mostraron que ATP es capaz de inducir la formación de trombos de forma dosis-dependiente, empezando a inducir la trombosis a la concentración de ATP 0,5 μM (**Figura 89**).

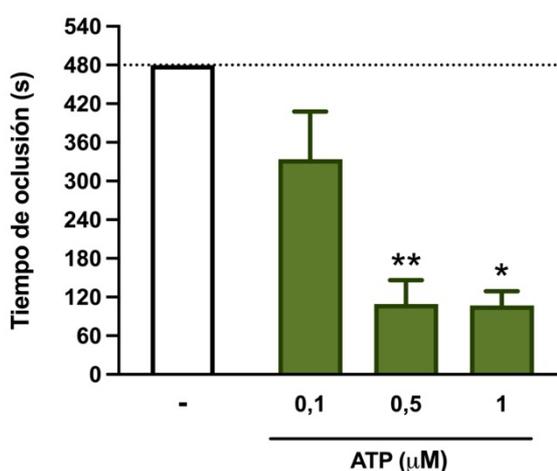


Figura 89. Efecto de ATP sobre la formación de trombos en el modelo de trombosis inducida por FeCl₃. Los ratones fueron tratados vía intraperitoneal con ATP (0,1 - 1 μM) o salino (vehículo) durante 1h. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 7. *p<0,05 o **p<0,01 con respecto al vehículo (test de Kruskal-Wallis).

A continuación, se quiso determinar cuáles eran los receptores purinérgicos implicados en la formación de trombos inducida por ATP. Para ello, se seleccionó la concentración de ATP 0,5 μM, y empleamos diferentes antagonistas de estos receptores: P2X₇ (A804598), P2X₂₋₃ (A317491), P2X₄ (5-BDBD), P2X₁ (NF449), P2Y₁ (MRS2500), y P2Y₁₂ (clopidogrel). El tratamiento con el antagonista del receptor P2X₇ revertió el efecto inducido por ATP, aunque esta reversión no fue completa y todavía fue capaz de inducir la formación de trombos, no obstante, el tiempo necesario para

la oclusión de los vasos fue mayor. El resto de los antagonistas empleados consiguieron revertir los efectos del ATP (**Figura 90**), ya que como se menciona en la introducción el ATP puede actuar como agonista de todos ellos. Por lo tanto, ATP induce la formación de trombos a través de los receptores P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2Y₁, P2Y₁₂, y en menor medida del receptor P2X₇ (receptor que más concentración de ATP requiere para su activación).

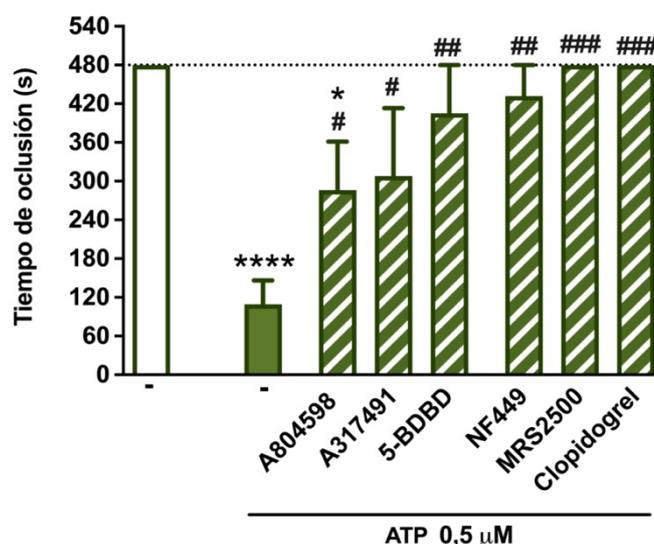


Figura 90. Receptores purinérgicos implicados en la formación del trombo inducida por ATP. Los ratones fueron tratados vía intraperitoneal con ATP (0,5 µM) o salino (vehículo) durante 1h. En algunos casos los ratones fueron pre-tratados, vía intraperitoneal, con antagonistas de los receptores P2X₇ (A804598, 1 µg/kg), P2X_{2/3} (A317491, 0,1 µg/kg), P2X₄ (5-BDBD, 1 mg/kg), P2X₁ (NF449, 10 mg/kg), P2Y₁ (MRS2500, 2 mg/kg) o P2Y₁₂ (clopidogrel, 8,5 mg/kg), 30 min previo al tratamiento con ATP. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 4. *p<0,05 o ****p<0,0001 con respecto al vehículo, #p<0,05, ##p<0,01 o ###p<0,001 con respecto al ATP 0,5 µM (test de Kruskal-Wallis).

Más adelante, se estudió *in vivo* la ruta que se había demostrado previamente *in vitro*, estudiando la importancia del receptor LOX-1, la proteína HSP70, y la liberación de gránulos. Para ello se empleó el anticuerpo bloqueante de LOX-1, el inhibidor de la proteína HSP70 (VER-155008), y un inhibidor de la desgranulación (clodronato). El tratamiento de los ratones con estos inhibidores revirtió la formación de trombos inducida por ATP, y no fue así cuando se trataron los ratones con el control del isotipo.

Por tanto, el receptor LOX-1, la proteína HSP70 y la liberación de gránulos están involucrados en los mecanismos por los que ATP induce la formación de trombos (Figura 91).

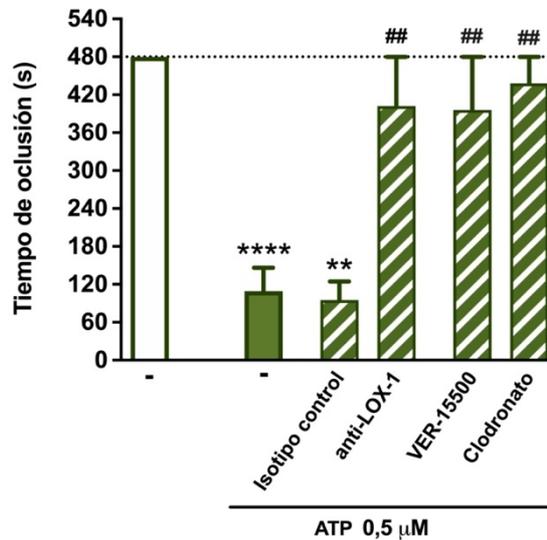


Figura 91. Implicación del receptor LOX-1, la proteína HSP70 y la liberación de gránulos en la formación del trombo inducida por ATP. Los ratones fueron tratados vía intraperitoneal con ATP (0,5 μ M) o salino (vehículo) durante 1h. En algunos casos los ratones fueron pre-tratados, vía intraperitoneal, con el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1 (100 μ g/mL) o con su control del isotipo, con un inhibidor de HSP70 (VER-155008, 50 mg/kg), o con un inhibidor de la liberación de gránulos (clodronato, 10 mg/kg), 30 min previo al tratamiento con ATP. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μ L de FeCl_3 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como la media \pm EEM, $n \geq 4$. ** $p < 0,01$ o **** $p < 0,0001$ con respecto al vehículo, ## $p < 0,01$ con respecto al ATP 0,5 μ M (test de Kruskal-Wallis).

3.2.2. MODELO CRÓNICO

Para acercarse al modelo murino con ATP a la práctica clínica, en la que los pacientes pueden sufrir inflamación crónica, los ratones se trataron con ATP diariamente durante un mes, y tras finalizar este tratamiento se realizó el modelo de trombosis inducida por FeCl_3 .

En primer lugar, se observó que el tratamiento durante un mes con ATP también inducía una disminución del tiempo de oclusión de los vasos, y por lo tanto la

formación de trombos. Además, se analizó la implicación de los receptores P2X₇ y LOX-1 en el efecto pro-trombótico del tratamiento crónico con ATP. Para ello, se empleó el antagonista del receptor P2X₇ (A804598) y el anticuerpo bloqueante del receptor LOX-1. Los resultados mostraron que ambos inhibidores eran capaces de revertir los efectos del ATP crónico. Por lo que, la formación de trombos inducida por el tratamiento crónico con ATP es dependiente de los receptores P2X₇ y LOX-1 (**Figura 92**).

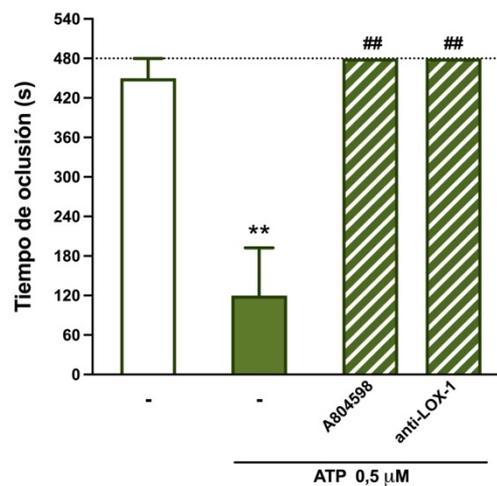


Figura 92. Efecto del tratamiento crónico de ATP e implicación de los receptores P2X₇ y LOX-1 en la formación del trombo inducida por ATP. Los ratones fueron tratados vía intraperitoneal con ATP (0,5 μM) o salino (vehículo) diariamente durante 1 mes. En algunos casos los ratones también se trataron, vía intraperitoneal, con un antagonista del receptor P2X₇ (A804598, 1 μg/kg) o el anticuerpo bloqueante frente a LOX-1 (100 μg/mL). Tras un mes de tratamiento, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 μL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 4. **p<0,01 con respecto al vehículo, ##p<0,01 con respecto al ATP 0,5 μM (test de Kruskal-Wallis).

4. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE NETs EN LOS EFECTOS PROTROMBÓTICOS DE ABACAVIR Y DE ATP

4.1. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE NETs

Otro de los mecanismos por los que los neutrófilos pueden interferir en la función plaquetaria y en la trombosis, es la formación de NETs (47). Por ello, también se analizaron los efectos de ABC y del ligando endógeno del receptor P2X₇ sobre la inducción de la liberación de NETs, mediante el doble marcaje con DAPI para marcar el ADN y con un anticuerpo frente a la MPO, ambos presentes en las estructuras de las NETs. En este caso, por un lado, se determinó la capacidad de ABC y ATP para inducir la formación de NETs tras 1h de tratamiento (para simular los experimentos anteriores en los que se analizaban los efectos del SN_{ABC} y del SN_{ATP} sobre la activación plaquetaria y sobre las interacciones plaqueta-neutrófilo). Sin embargo, con estas condiciones ni ABC (5 - 10 µg/mL) ni ATP (5 - 10 µM) fueron capaces de inducir la liberación de NETs (**Figura 93A**). No obstante, esto no es sorprendente ya que el estímulo positivo empleado de la NETosis, PMA, tampoco fue capaz de inducir la liberación de NETs tras 1h de tratamiento, ya que para que se produzca la formación de NETs se requiere más tiempo (47,241). Por lo tanto, en segundo lugar, se evaluó la formación de NETs tras 4h horas de tratamiento, dando tiempo suficiente para la formación de estas, ABC y ATP eran capaces de inducir su liberación. Como se puede observar en las imágenes, aunque concentraciones de ABC 5 µg/mL y de ATP 5 µM no causaron la formación de NETs, concentraciones más altas de ABC 10 µg/mL y de ATP 10 µM sí que indujeron una liberación de NETs, similar a la de los estímulos positivos PMA e ionomicina (**Figura 93B**).

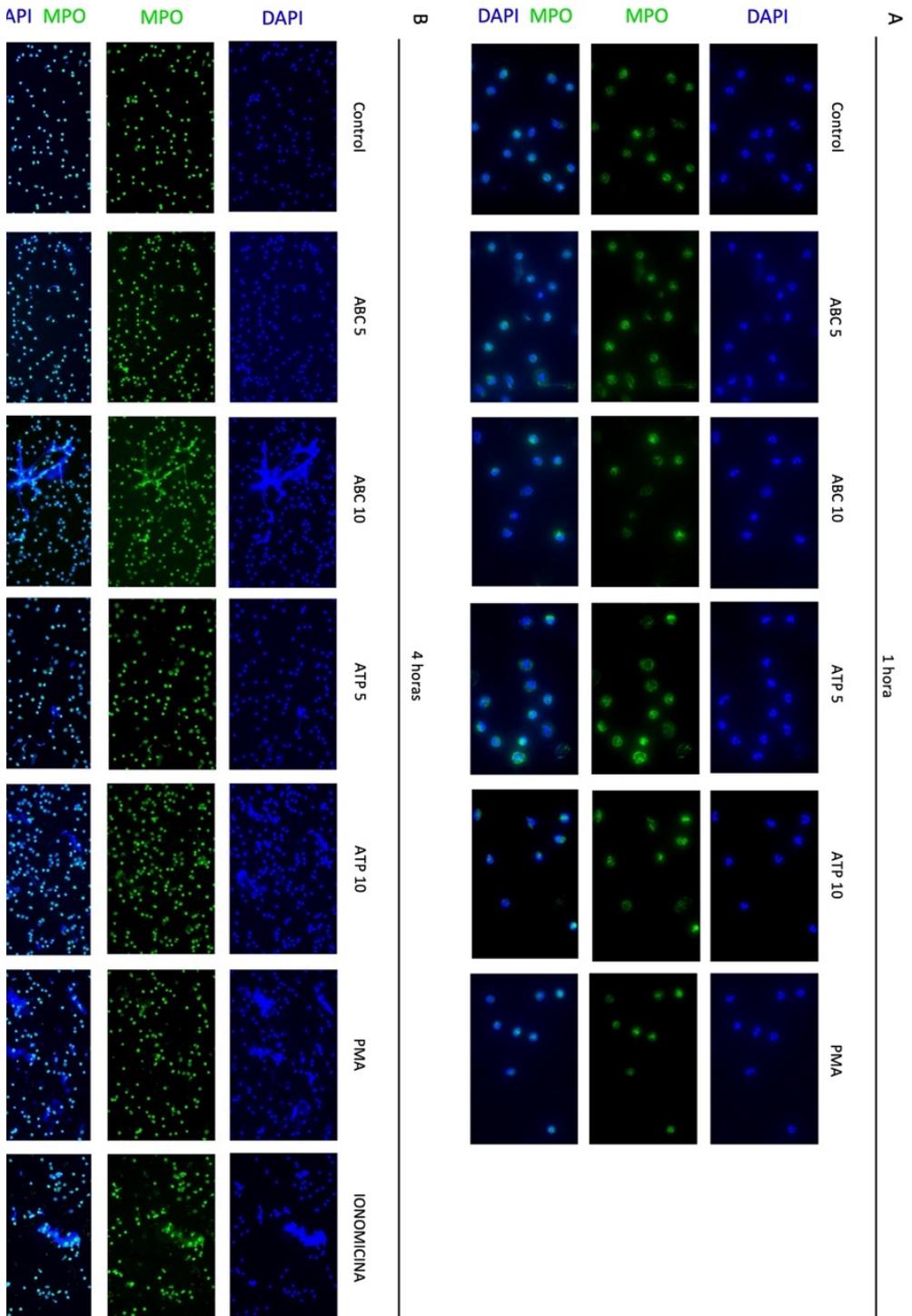


Figura 93. Efecto de abacavir (ABC) y ATP sobre la liberación de NETs. Leucocitos polimorfonucleares (PMN), aislados de sangre de donantes sin infección por VIH, se trataron *in vitro* con abacavir (ABC 5-10 µg/mL), (ATP 5-10 µM), PMA (100 nM), ionomicina (1 µM) o salino durante **A.** 1h o **B.** 4h. Tras el tratamiento, los PMN se incubaron con el anticuerpo frente a la mieloperoxidasa-FITC, y a continuación se realizó el marcaje del ADN con DAPI. Las muestras se visualizaron en el

4.2. IMPLICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NETs EN EL MODELO IN VIVO DE TROMBOSIS

Por último, también se evaluó la implicación de las NETs en la formación de trombos inducida por ABC o ATP. Para ello, se empleó DNasa I, que es capaz de degradar las estructuras de las NETs previamente formadas. Se observó que el pre-tratamiento con DNasa I revertía el efecto de ABC y el de ATP, por lo que las NETs también estarían implicadas en la formación de trombos inducida tanto por ABC como por ATP (**Figura 94**).

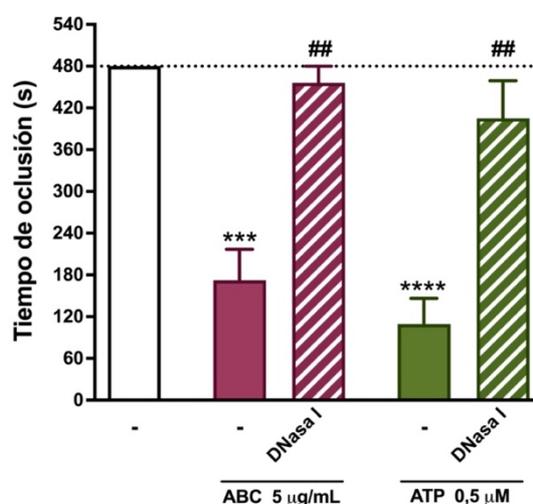


Figura 94. Implicación de las NETs en la formación del trombo inducida por abacavir (ABC) y por ATP. Los ratones fueron tratados vía intraescrotal con 100 µL de ABC (5 µg/mL) durante 4h, o vía intraperitoneal con ATP (0,5 µM) durante 1h o salino (vehículo). En algunos casos los ratones fueron pre-tratados, vía intraperitoneal, con DNasa I (1000 U/mL), que inhibe la estructura de las NETs formadas previamente, 30 min previo al tratamiento con ABC o con ATP. Posteriormente, el cremáster fue exteriorizado y superfundido con 80 µL de FeCl₃ 25 mM. Las arteriolas fueron visualizadas hasta que se detuviera el flujo o hasta un máximo de 8 min (línea de puntos). Los datos se presentan como el tiempo transcurrido desde que se perfunde el FeCl₃ hasta que se produce la oclusión del vaso. Los resultados están expresados como la media ± EEM, n ≥ 4. ***p<0,001 o ****p<0,0001 con respecto al vehículo, ##p<0,01 con respecto al ABC 5 µg/mL o al ATP 0,5 µM en los casos correspondientes (test de Kruskal-Wallis).

4.3. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA LIBERACIÓN DE NETs

4.3.1. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA IMPLICACIÓN DEL SECRETOMA DE NEUTRÓFILOS EN LA TRANSICIÓN DE LA INFLAMACIÓN A LA TROMBOSIS

Dada la importancia del secretoma liberado por los neutrófilos sobre la inducción de las interacciones de las plaquetas con los neutrófilos (paso importante en el desarrollo de la trombosis); y también, los efectos de ABC y ATP sobre la liberación de NETs, se

realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de dilucidar el papel de los neutrófilos y concretamente el de su secretoma en la transición desde procesos inflamatorios hacia el desarrollo de la trombosis.

Los resultados obtenidos se recogen en la revisión titulada "*The neutrophil secretome as a crucial link between inflammation and thrombosis*" (47). Estos resultados pueden verse resumidos y representados en la **Tabla 15**, donde se relaciona cada uno de los componentes presentes en la liberación de las NETs con su papel en el desarrollo de la trombosis. Y en la **Tabla 16**, donde se muestran los componentes de las NETs y la relación que tienen con diferentes patologías relacionadas con la trombosis.

Tabla 15. Relación de los componentes de las NETs con la trombosis (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. Int. J. Mol. Sci. 2021 (47)).

Componente	Relación con la trombosis	Referencias
ADN	Activación de la cascada de coagulación Movilización de los cuerpos endoteliales Weibel-Palade Inhibición de la resolución de coágulos	(257-259)
Histonas (H3 H4)	Expresión del factor tisular Reclutamiento de plaquetas y eritrocitos Producción de trombina Agregación y activación plaquetaria	(67,260-266)
MPO	Disfunción endotelial	(267)
NE	Degradación de TFPI Reclutamiento de plaquetas Producción de TSP-1	(85,268)
Catepsina G	Degradación de TFPI Activación plaquetaria Producción de TSP-1	(85,268,269)
PAD4	Inactivación de ADAMTS13	(270,271)
HMGB1	Adhesión plaqueta-leucocito Liberación de NETs	(272-276)

MPO: Mieloperoxidasa; NE: Elastasa de neutrófilos; TFPI: inhibidores de la vía del factor tisular; TSP-1: Trombospondina-1; PAD4: peptidil arginina deaminasa 4; ADAMTS13: desintegrina y metaloproteinasa con el dominio 13 para la trombospondina-1; HMGB1: caja 1 del grupo de alta movilidad.

Tabla 16. Componentes de las NETs detectados en pacientes con diferentes patologías relacionadas con la trombosis (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. Int. J. Mol. Sci. 2021 (47)).

Biomarcador	Patología	Correlación	Referencias
DNA	Trombosis arterial	Tamaño del infarto	(277-289)
		Grado de estenosis	
		Puntuación de accidentes cerebrovasculares	
	Tromboembolismo venoso	Marcadores de hipercoagulación	(290,291)
		Niveles altos de glucosa	
		Extensión del tromboembolismo	
Hipertensión	Proteína C-reactiva	(292)	
Otras enfermedades	Homocisteinemia	(293)	
	ITP: CD62 plaquetaria*†	(294)	
	Enfermedad de Behçet: Compromiso vascular	(295)	
	Enfermedad de Cushing: ratio ETP	(295)	
Nucleosomas	Trombosis arterial	Tamaño del infarto	(278,286,289)
		Grado de estenosis	
		Puntuación de accidentes cerebrovasculares	
	Tromboembolismo venoso	Niveles altos de glucosa	(290)
Otras enfermedades	Extensión del tromboembolismo	(295)	
citH3/4	Trombosis arterial	Tamaño del infarto	(280,285,288,289)
		Grado de estenosis	
		Puntuación de accidentes cerebrovasculares†	
	Tromboembolismo venoso	Niveles altos de glucosa†	(296)
		Estabilización, crecimiento y edad del trombo	
Otras enfermedades	Niveles de lactato	(293)	
MPO	Trombosis arterial	ITP: CD62 plaquetaria*†	(286)
	Tromboembolismo venoso	Grado de estenosis‡	(296)
	Hipertensión	Proteína C-reactiva	(292)
	Otras enfermedades	Dimero-D	(294)
		Homocisteinemia ‡	
		Enfermedad de Behçet: Compromiso vascular‡	(296)
	Enfermedad de Cushing: ratio ETP	(296)	
NE	Trombosis arterial	Estabilización y crecimiento del trombo	(285)

citH3/H4: Histona H3/H4 citrulinada. MPO: Mieloperoxidasa; NE: elastasa de neutrófilos. ITP: Trombocitopenia inmune primaria; ETP: Potencial de trombina endógena. *Correlación negativa; †Complejos DNA-citH3; ‡Complejos DNA-MPO.

4.3.2. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS NETs EN OTRAS PATOLOGÍAS

En los últimos años está cobrando especialmente importancia el estudio de las NETs sobre el desarrollo de diferentes patologías. De hecho, un estudio de transcriptómica demostró por medio del análisis por términos GO, que la activación (GO0002283) y desgranulación (GO0043312) de neutrófilos eran los procesos más activados en la infección por SARS (297). En este sentido, se realizó un estudio bibliográfico sobre la implicación de los neutrófilos, y en especial de las NETs, en la patología del COVID-19.

Los resultados obtenidos se recogen en la revisión titulada *“Role of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 Progression: An Insight for Effective Treatment”* (298). Estos resultados pueden verse resumidos y representados en la **Tabla 17**, donde se relaciona cada uno de los componentes presentes en la liberación de las NETs con los diferentes signos clínicos de la patología. Además, también se presentó el conjunto de ensayos clínicos, que estaban en curso en ese momento, que se estaban realizando sobre la patología del COVID-19 y que analizaban la efectividad de diferentes medicamentos que actuaban sobre diferentes fases del proceso de la liberación de las NETs.

Tabla 17. Relación de los diferentes signos clínicos asociados con la patología del COVID-19 con los niveles de los diferentes componentes de las NETs (Adaptado de Blanch-Ruiz MA, et al. *Biomedicines* 2022 (298)).

Signo clínico	Componente NETs	Referencias
Mortalidad a corto plazo	cfADN, citH3, NE y complejos ADN-MPO	(299,300)
Ventilación mecánica	cfADN, citH3, NE y complejos ADN-MPO	(299-302)
Admisión en cuidados intensivos	NE, complejos ADN-MPO y complejos ADN-Histona	(302,303)
Puntuación del Índice de Fallo Orgánico Secuencial	Complejos ADN-MPO	(302)
Daño pulmonar Marcadores cardiovasculares Insuficiencia renal Temperatura corporal	NE y complejos ADN-Histona	(303)
PaO₂/fracción de oxígeno inspirado	(-) complejos MPO-ADN	(299)
Días con hipoxemia severa	(-) MPO	(304)

cfADN: ADN libre. citH3: Histona H3 citrulinada. NE: Elastasa de neutrófilos. MPO: Mieloperoxidasa. PaO₂: Presión parcial de oxígeno alveolar. (-) Correlación inversa.

V. DISCUSIÓN

Actualmente, la terapia antirretroviral frente a la infección por VIH consiste en el uso de diferentes fármacos en combinación que actúen sobre diferentes dianas del ciclo biológico del virus, dando lugar a lo que se conoce como terapia antirretroviral combinada. Con esta terapia se consiguió reducir notablemente la mortalidad en estos pacientes, no obstante, esta terapia se ha asociado a lo largo de los años con diferentes efectos adversos. En este sentido, en los últimos años, el fármaco antirretroviral ABC se ha asociado con un aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes que lo incluyen en su tratamiento frente al VIH (177,209). De hecho, este fármaco ha formado parte de las pautas preferentes para el tratamiento de la infección por VIH desde 1998, y actualmente forma parte de una de las cuatro pautas preferentes, por lo que su uso ha estado ampliamente extendido en estos pacientes (184). Durante un tiempo existió cierta controversia con respecto a la cardiotoxicidad de este fármaco, puesto que la primera alerta que surgió en este sentido, desencadenó la publicación tanto de estudios que corroboraban esta asociación (177,178,185,186,188,305-311) como de otros que no observaron un aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes con este tratamiento (179-182,312). Sin embargo, con el paso de los años y con nuevas evidencias clínicas se demostró que ABC inducía un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, concretamente el infarto de miocardio, y que este aumento estaba asociado a la presencia de comorbilidades u otros factores de riesgo adicionales (188). Esto hizo que se produjera un cambio en las guías clínicas y así, se recomendó no usar este fármaco en los pacientes con riesgo cardiovascular.

El infarto de miocardio es una afección cardiovascular que se debe a la oclusión de una arteria coronaria epicárdica (27). En este sentido, estudios previos *in vitro* en muestras de donantes sin infección por VIH han demostrado que ABC produce inflamación vascular, analizada como el aumento de las interacciones leucocito-endotelio y que es capaz de desencadenar procesos que conducen a la formación de trombos, evaluado *in vitro* como el aumento de la adhesión de las plaquetas sobre las células endoteliales y sobre los neutrófilos, y también de inducir la oclusión de los

vasos en un modelo murino de trombosis (215,218,219,224,225,313). Por ello, uno de los principales objetivos de la presente Tesis Doctoral fue evaluar en la realidad clínica, con muestras de pacientes en los que está presente el VIH los efectos del tratamiento con ABC sobre los procesos inflamatorios y trombogénicos, comparando el estado de estos pacientes con otros que incluyen en su lugar TFV - que forma parte del resto de pautas preferentes en el tratamiento frente al VIH (184) - en su terapia antirretroviral. En cuanto a los parámetros bioquímicos analizados en los dos grupos de pacientes, entre los que se incluyeron los niveles de colesterol y el tiempo y la actividad de la protrombina, no se observaron diferencias, por lo que los efectos de ABC podrían pasar desapercibidos en una analítica básica. No obstante, los resultados de esta cohorte demostraron que los pacientes en tratamiento con ABC presentaban un aumento de los procesos inflamatorios y trombóticos. Por un lado, los procesos inflamatorios se analizaron como las interacciones leucocito-endotelio y la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos. Los pacientes de la cohorte en tratamiento con ABC presentaron niveles mayores de las interacciones de los leucocitos (tanto de PMN como PBMC) con el endotelio en comparación con los pacientes en tratamiento con TFV y con los donantes sin infección por VIH. Además, en los pacientes en tratamiento con ABC también se observó una mayor expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1, lo que junto con las evidencias previas - en estudios previos *in vitro* con muestras de donantes sin infección por VIH (218) - puede sugerir que estas mencionadas interacciones estén causadas por la interacción de Mac-1 en leucocitos con ICAM-1 en el endotelio (**Figura 95A**). Es interesante resaltar que, Mac-1 se ha propuesto como un vínculo entre la adhesión celular y la trombosis (314,315). Esta molécula de adhesión se expresa en leucocitos, e interacciona con ICAM-1 expresada constitutivamente en el endotelio, permitiendo que los leucocitos se adhieran a las células endoteliales (3,5,6). Además, también interacciona con sus ligandos plaquetarios promoviendo la formación de agregados plaqueta-leucocito, que es un paso fundamental en el inicio del proceso trombótico (315). Por otro lado, los procesos trombóticos se analizaron mediante las interacciones de las plaquetas con el endotelio y con los leucocitos, la agregación plaquetaria y también la activación de las plaquetas. En este sentido, los resultados

también mostraron que los pacientes en tratamiento con ABC presentaban una mayor activación de los procesos previos a la formación de trombos. Así, se observó que las interacciones de las plaquetas tanto con las células endoteliales como con los leucocitos estaban aumentadas en los pacientes en tratamiento con ABC en comparación con los pacientes en tratamiento con TFV y con los donantes sin infección por VIH (**Figura 95B-C**). Una de las moléculas de adhesión implicadas en estas interacciones, GPIIb/IIIa (29,43,44,46), vio aumentada su expresión en los pacientes en tratamiento con ABC con respecto a los pacientes en tratamiento con TFV y con los donantes sin infección por VIH. De hecho, estudios previos demostraron que las interacciones plaqueta-endotelio inducidas por ABC *in vitro* estaban mediadas por GPIIb/IIIa en plaquetas e ICAM-1 en las células endoteliales, entre otras moléculas de adhesión (**Figura 95B**) (215). Además, el aumento de la expresión de GPIIb/IIIa en plaquetas junto con el aumento de Mac-1 en leucocitos podría confirmar que esta son las moléculas de adhesión responsables del aumento de las interacciones de las plaquetas con los leucocitos que se observaron en los pacientes en tratamiento con ABC (**Figura 95C**). Sin embargo, en cuanto a la expresión del marcador de activación plaquetaria, P-selectina, se observó que los pacientes con infección por VIH, ya sea en tratamiento con ABC o con TFV, presentaban una mayor expresión y por tanto una mayor activación plaquetaria que los donantes sin infección por VIH. En este sentido, estos resultados están en línea con diferentes estudios que confirman que los pacientes con infección por VIH, independientemente de su régimen antirretroviral, presentan un cierto estado de inflamación y de activación plaquetaria (164,166), lo que además podría explicar el hecho de que los pacientes con infección por VIH también presentaron un mayor número de plaquetas adheridas al endotelio y de leucocitos en rodamiento que los donantes sin infección por VIH. Estas evidencias remarcan la importancia de tener en cuenta la presencia de la infección a la hora de estudiar los efectos cardiotoxicos de ABC.

En cuanto a los efectos de ABC sobre la agregación plaquetaria, se observó tanto una mayor expresión de la molécula de adhesión responsable de la agregación plaquetaria, GPIIb/IIIa, como una mayor agregación plaquetaria tras la estimulación de

las plaquetas con ADP, colágeno y ácido araquidónico comparado con los pacientes en tratamiento con TFV (**Figura 95D**), pero no fue así en comparación con los donantes sin infección por VIH. Estos resultados están en concordancia con otros tres estudios realizados en pacientes con infección por VIH, en los que se observó que los pacientes en tratamiento con ABC en comparación con aquellos en tratamiento con TDF tenían una mayor agregación plaquetaria en respuesta a ADP, colágeno, epinefrina, U46619 y TRAP (193,211). Sin embargo, esta es la primera vez que se demuestra que, en respuesta al agonista plaquetario ácido araquidónico, los pacientes en tratamiento con ABC también presentan una mayor agregación que los que están en tratamiento con TFV. Adicionalmente, se observó un efecto potencialmente protector de TFV, ya que estos pacientes presentaron una menor agregación plaquetaria que los donantes sin infección por VIH tras la estimulación de las plaquetas con ácido araquidónico. Estas evidencias estarían en línea con otros estudios en los que se postula que TFV podría tener efecto cardioprotector, demostrando que: pacientes en tratamiento con TDF presentaban una menor disfunción endotelial, puesto que había una disminución de la molécula de adhesión endotelial VCAM-1 (195); TDF y TAF *in vitro* inducían un aumento en la expresión de enzimas ectonucleotidasas (CD39 y CD73) que promueven la hidrólisis de ATP y ADP a adenosina, y una disminución de la expresión de ICAM-1 y del factor tisular en el endotelio que promueven la activación plaquetaria y la coagulación (316); y, otro estudio *in vitro*, esta vez en monocitos, que demostró que TDF disminuye la liberación de IL-8 y de la proteína inflamatoria de macrófagos 1α , inducidas por la estimulación con LPS y TNF- α (317).

Por tanto, con la cohorte de pacientes con infección por VIH en tratamiento con ABC o TFV, y los donantes sin infección por VIH se pudo demostrar que la presencia de ABC en estos pacientes inducía un estado de mayor activación de los procesos inflamatorios - interacciones leucocito-endotelio y un aumento de la expresión de Mac-1 - y de los procesos trombóticos - interacciones plaqueta-endotelio y -leucocito, y un aumento de la expresión de GPIIb/IIIa -.

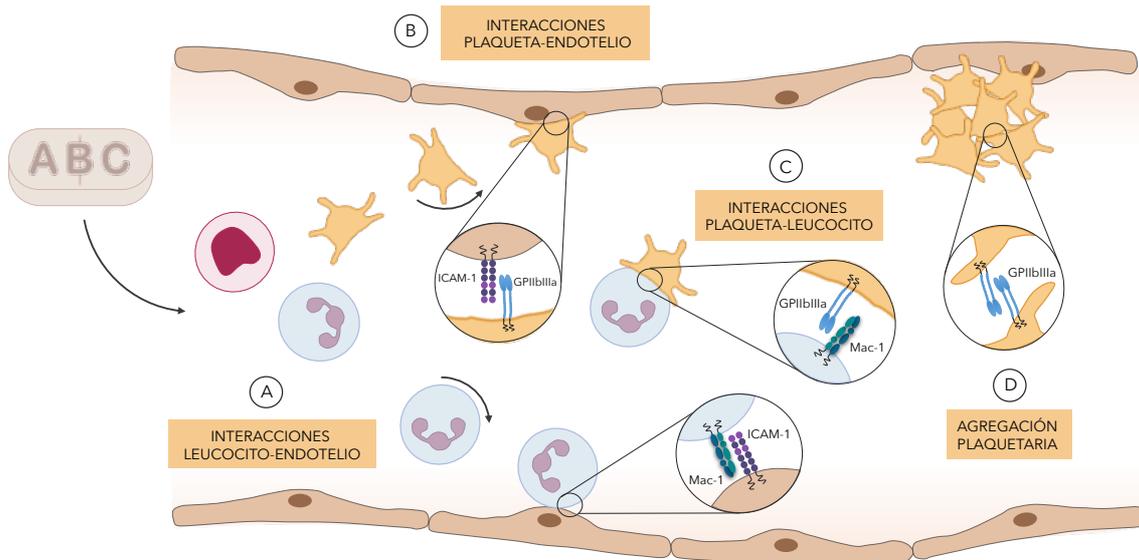


Figura 95. Efectos de abacavir (ABC) en pacientes con infección por VIH en tratamiento con este fármaco. Los pacientes en tratamiento con ABC presentan: A. Un incremento de las interacciones leucocito-endotelio (tanto de leucocitos polimorfonucleares como mononucleares), y estas interacciones pueden deberse a la unión de Mac-1 en leucocitos, puesto que estos pacientes presentan una mayor expresión de esta molécula de adhesión, con la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células endoteliales; B. Un aumento de las interacciones plaqueta-endotelio que pueden estar mediadas por GPIIb/IIIa en plaquetas e ICAM-1 en el endotelio; C. Mayor adhesión de las plaquetas con los leucocitos (concretamente con neutrófilos), interacciones que pueden deberse a la unión de las moléculas de adhesión GPIIb/IIIa y Mac-1 en plaquetas y leucocitos, respectivamente; D. Un incremento de la agregación plaquetaria, que puede deberse al aumento de la expresión de GPIIb/IIIa en plaquetas que también se observó en estos pacientes.

No obstante, el hecho de que la terapia antirretroviral actualmente consista en la combinación de diferentes fármacos para ser efectiva hace que con este estudio no se puedan asociar los efectos observados directamente con ABC, ya que estos pacientes también incluían en su tratamiento otros fármacos como 3TC, DTG, RAL y ATZ. Por esto, el siguiente paso del estudio fue evaluar los efectos de ABC tratando *in vitro* las muestras de pacientes con infección por VIH, para poder conservar la variable de la infección - que como se ha comentado anteriormente es importante - y tener así una aproximación que además permitiera evaluar el efecto directo del fármaco.

Para llevar a cabo esta parte del estudio se empleó una cohorte de pacientes con infección por VIH que estuvieran recibiendo tratamiento antirretroviral que no incluyera ABC, a los que se trató *in vitro* con concentraciones de ABC 5 µg/mL, que

es una concentración que simula los niveles plasmáticos presentes en los pacientes en tratamiento con este fármaco (tal y como se expone en el apartado 1.2.5.4 *Abacavir*) (158). En este caso, se observó que ABC indujo un incremento de las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales, tanto de PMN como PBMC. Estas interacciones se podrían estar produciendo gracias al aumento en la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1 y gp150,95 que induce ABC, en neutrófilos y monocitos, ya que pueden interactuar con ICAM-1 en la superficie de las células endoteliales. En este sentido, un estudio previo demostró que ABC *in vitro*, pero en este caso en muestras de donantes sin infección por VIH, inducía un aumento de la expresión de Mac-1 y que funcionalmente esta molécula de adhesión estaba implicada en las interacciones de los leucocitos con el endotelio inducidas por ABC, al interactuar con ICAM-1 en células endoteliales (218) (**Figura 96**).

Cuando se analizaron los efectos pro-trombóticos de ABC *in vitro* en esta cohorte, ABC indujo un aumento de la formación de agregados plaqueta-leucocito, concretamente con neutrófilos (**Figura 96**). Por otro lado, al analizar las interacciones plaqueta-endotelio no se observaron cambios con respecto al vehículo control. Este dato podría ser contradictorio con los resultados obtenidos en la cohorte anterior, sin embargo, no es sorprendente puesto que estudios anteriores demostraron que ABC no actúa directamente sobre las plaquetas, sino que actúa activando otras células vasculares, como las células endoteliales o los leucocitos, y la activación de estas conduciría eventualmente a la activación de las plaquetas (215,224). Para corroborar estas evidencias, y disponer de un modelo experimental más próximo al *in vivo* en el que el endotelio también está en contacto con el fármaco, las células endoteliales procedentes de donantes sin infección por VIH y/o las plaquetas procedentes de pacientes con infección por VIH se trataron con ABC *in vitro*, y se observó que únicamente cuando las células endoteliales estaban tratadas con ABC se produce el aumento de estas interacciones, independientemente del tratamiento de las plaquetas. Esto demuestra de nuevo que, ABC no tiene un efecto directo sobre las plaquetas (**Figura 96**). En esta línea, tampoco se observó que ABC *in vitro* en plaquetas aisladas indujera un aumento en la expresión de P-selectina y GPIIb/IIIa ni

en donantes sin infección por VIH (215), ni en pacientes con infección por VIH. Del mismo modo, ABC *in vitro* no indujo un aumento de la agregación plaquetaria estimulada por ADP, colágeno o ácido araquidónico. Este hecho pone de manifiesto que para que se dé la activación y la agregación plaquetaria es necesario que ABC acceda a todo el sistema cardiovascular, no exclusivamente a las plaquetas, y solo aquellos estudios en los que se analizó la agregación en pacientes con este tratamiento pudieron observar un aumento (193,211,215-217), demostrando la importancia del tratamiento *in vivo* para poder observar los efectos globales de ABC sobre los eventos inflamatorios y trombóticos.

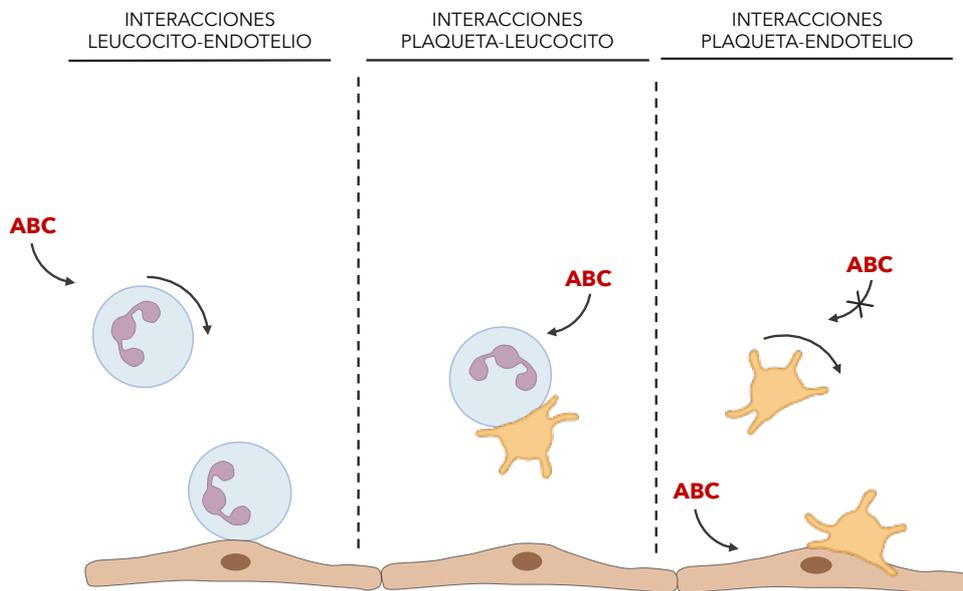


Figura 96. Efectos de abacavir (ABC) *in vitro* sobre muestras de pacientes con infección por VIH.

ABC induce: A. Un incremento de las interacciones leucocito-endotelio (tanto de leucocitos polimorfonucleares como mononucleares); B. Un aumento de la adhesión de las plaquetas sobre los leucocitos (concretamente en neutrófilos); C. Un incremento de las interacciones plaqueta-endotelio, por su acción sobre las células endoteliales y no por un efecto directo sobre las plaquetas.

A modo de conclusión, con estas dos cohortes se ha demostrado que ABC promueve un aumento de las señales inflamatorias induciendo las interacciones leucocito-endotelio, que además representan las primeras fases del proceso inflamatorio. También se ha demostrado que ABC aumenta diferentes fases de la formación del trombo, como las interacciones de las plaquetas con otras células vasculares - células endoteliales y leucocitos -. Continuando con estas evidencias, en una publicación anterior se demostró que ABC es capaz de inducir la formación de trombos en un

modelo murino de trombosis, a través del receptor P2X₇ (225). Sin embargo, todavía queda por dilucidar los mecanismos por los que ABC es capaz de inducir las interacciones plaqueta-leucocito que eventualmente pueden conducir a la formación de estos trombos. Esto se comenzó a abordar en un estudio anterior en el que se demostró que ABC *in vitro*, con muestras de donantes sin infección por VIH, inducía la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos, actuando sobre los neutrófilos y no directamente sobre las plaquetas, tal y como se observó en las interacciones plaqueta-endotelio (215,224). Además, esta interacción se daba a través del receptor P2X₇ y gracias a las moléculas de adhesión PSGL-1 en leucocitos y P-selectina en plaquetas (224). Cabe destacar que PSGL-1 se expresa de forma constitutiva en los neutrófilos, mientras que P-selectina es inducible en la superficie de las plaquetas, sin embargo, el tratamiento *in vitro* con ABC de plaquetas aisladas no induce la expresión de esta molécula de adhesión (215,224). Todo esto hace evidente la importancia de la acción de los neutrófilos para inducir el aumento de la expresión de P-selectina en plaquetas y por tanto la activación de estas, que conduciría a su adhesión sobre los neutrófilos. Además, en los últimos años la investigación sobre los procesos trombóticos se está centrando en el estudio del papel de los neutrófilos en estos procesos, debido entre otras cosas a su capacidad de secretar una gran variedad de mediadores y así influir en las comunicaciones intercelulares. El hecho de que para que se dé la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos requiera de la activación previa de las plaquetas, que por sí mismo no es capaz de inducir ABC, y que PSGL-1 se expresa de forma constitutiva en neutrófilos, pone de manifiesto la importancia del secretoma liberado por los neutrófilos tras su tratamiento con ABC. Por ello, la siguiente parte de este estudio consistió en explorar la capacidad del secretoma liberado por los neutrófilos tratados con ABC sobre la inducción de las interacciones plaqueta-neutrófilo y sobre la activación plaquetaria. Este estudio muestra que la inducción de la formación de los agregados plaqueta-neutrófilo se debía fundamentalmente a la presencia de un secretoma liberado por neutrófilos tratados con ABC, ya que cuando neutrófilos y/o plaquetas eran tratados con el fármaco, pero se empleaba un secretoma que provenía de neutrófilos control no se observó la formación de estos agregados, que únicamente se daban con la presencia de SN_{ABC},

independientemente del tratamiento de las plaquetas y los neutrófilos. Además, se demostró que la liberación del SN_{ABC} que induce la activación plaquetaria y la formación de estos agregados estaba mediada por el receptor $P2X_7$ de los neutrófilos. La activación de este receptor mediada por ABC se analizó en profundidad en un estudio previo en el que se demostró que ABC actúa como modulador alostérico de este receptor, uniéndose a un sitio activo diferente a su agonista natural, ATP (221). Cuando ABC se une al receptor $P2X_7$ en este sitio activo produciría un cambio conformacional que hace a este receptor más sensible a concentraciones bajas de ATP.

A continuación, se analizó la composición proteica de los secretomas liberados por los neutrófilos mediante un estudio de proteómica. Este análisis mostró que ABC inducía un aumento de los niveles en el secretoma de LOX-1, VATE1, Rab-11A, EDF1, y una disminución de los niveles de actina β_2 , queratina del citoesqueleto de tipo II y PSMD9. Sin embargo, la única proteína, responsable de los efectos del secretoma sobre la formación de agregados plaqueta-neutrófilo y sobre la activación plaquetaria que estuviera mediada por el receptor $P2X_7$, fue LOX-1. En este sentido, también se observó que ABC inducía la expresión del receptor LOX-1 en la superficie de los neutrófilos y que además esta expresión estaba mediada por el receptor $P2X_7$ en neutrófilos. De hecho, se demostró que la activación del receptor $P2X_7$ inducida por ABC, desencadenaba la movilización de calcio en neutrófilos, la producción de ROS y la apertura del canal iónico del receptor, además de la liberación de IL-1 β , lo que implicaría la activación del factor de transcripción NF- κ B (99). La activación de NF- κ B y su migración al núcleo se han descrito como inductores de la transcripción del gen de LOX-1, promoviendo por tanto un aumento de la expresión de LOX-1 (318). Este receptor puede ser escindido, liberando así su forma soluble en el secretoma, por ADAM10 y ADAM17 (118), cuya expresión en la superficie de los neutrófilos también es inducida por ABC, de hecho, el aumento de la expresión de estas metaloproteasas puede deberse a la formación de ROS (319), derivados de la activación del receptor $P2X_7$. Por otro lado, a nivel funcional se demostró que tanto la acción de las ADAM10 y ADAM17, que producen la liberación de la forma soluble de LOX-1, y el propio LOX-

1 liberado en el secretoma eran responsables de los efectos del SN_{ABC} sobre la inducción de la activación plaquetaria y la consecuente formación de agregados plaqueta-neutrófilo.

En cuanto al mecanismo por el que sLOX-1 actúa sobre la señalización plaquetaria, induciendo su activación y su subsiguiente adhesión sobre los neutrófilos, además de la formación de trombos en el modelo murino de trombosis, los presentes hallazgos demuestran que la proteína HSP70, la desgranulación plaquetaria y los receptores purinérgicos plaquetarios P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ están implicados en dicho mecanismo. De acuerdo con lo expuesto en la bibliografía, LOX-1 se une principalmente a oxLDL, pero también puede unirse a otros ligandos como diferentes lipoproteínas y fosfolípidos, CRP, HSP60, HSP70, o incluso a células como plaquetas activadas, leucocitos o células apoptóticas (115,320). En línea con estas observaciones, la actividad de la familia HSP se ha asociado con la secreción de gránulos, la activación de moléculas de adhesión, la expresión y la función del receptor P2X₁, y con la agregación plaquetaria (233,321). Aunque la implicación del receptor P2X₁ puede ser controvertida, ya que su mecanismo de acción sobre la función plaquetaria no se conoce por completo, existen evidencias que sugieren que la activación del receptor P2X₁ por ATP sensibiliza los receptores plaquetarios P2Y₁ y P2Y₁₂ al ADP, amplificando así sus respuestas (322). Esto podría explicar porque estos tres receptores están implicados en la activación de las plaquetas, los agregados plaqueta-neutrófilo inducidos por SN_{ABC}, y la formación de trombos inducida por ABC en el modelo murino de trombosis.

En conclusión, todas estas evidencias sugieren que los neutrófilos son la célula diana en los efectos de ABC sobre la trombosis. ABC actúa sobre el receptor P2X₇ en neutrófilos y no sobre las plaquetas - lo que podría justificarse por la baja expresión basal del receptor P2X₇ en plaquetas comparado con los neutrófilos, tal y como se ha demostrado -, aumentando así la expresión de LOX-1 en la superficie de los neutrófilos. A través de la escisión de este receptor por ADAM10 y ADAM17, se libera sLOX-1 en el secretoma. Posteriormente, sLOX-1 se uniría a HSP70 en las plaquetas,

formando un complejo que produce la desgranulación de las plaquetas con la posterior liberación de nucleótidos (ADP y ATP). En este escenario, los nucleótidos interactuarían con los receptores purinérgicos plaquetarios P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂, induciendo la expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas. Finalmente, P-selectina en las plaquetas interacciona con PSGL-1, que se expresa constitutivamente en los neutrófilos, mediando así los conjugados plaquetas-neutrófilos (**Figura 97**). Estos resultados se corroboraron con el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃, mediante el que se demostró que la formación de trombos inducida por ABC, además de estar mediado por el receptor P2X₇, tal y como se había demostrado previamente (225), también estaban involucrados LOX-1, HSP70, la desgranulación, y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂. Además, se realizó un modelo de tratamiento crónico con ABC, con la finalidad de aproximar en mayor medida este modelo *in vivo* a la práctica clínica, en la que los pacientes toman de forma continuada el fármaco. Con este modelo se demostró que ABC de forma crónica también inducía la formación de trombos mediada por el receptor P2X₇ y LOX-1.

Con todo esto se puede concluir que, el efecto de sLOX-1 liberado por los neutrófilos puede ser el causante del efecto cardiotoxico de ABC que puede desencadenar la formación de trombos. No obstante, los resultados muestran un efecto modesto tanto de ABC como del SN_{ABC} sobre los parámetros analizados, aun así, este efecto no debe subestimarse como un factor de riesgo adicional que pueda contribuir a eventos cardiovasculares. La formación de agregados plaqueta-neutrófilo es una de las primeras fases de la formación de trombos, sin embargo, las alteraciones en este parámetro pueden ser revertidas, o, por el contrario, amplificadas por estímulos adicionales, conduciendo en este último caso a la etapa irreversible de agregación plaquetaria (34). Por lo tanto, esta adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos podría no ser suficiente por sí sola para provocar la formación de trombos severos o agudos, sino promover eventos trombóticos en presencia de estímulos adicionales o factores de riesgo, lo que además es consistente con la cardiotoxicidad de ABC observada en diferentes ensayos clínicos, ya que dicha toxicidad se relaciona con la

existencia de factores de riesgo adicionales o comorbilidades en pacientes tratados con ABC (188); y con los datos obtenidos con el modelo murino de trombosis empleado en este estudio que muestran que ABC puede inducir la formación de trombos en presencia de otro estímulo cardiotoxico, siendo en este caso el FeCl_3 , y no por sí mismo.

Por otro lado, el mecanismo por el que actúa ABC para inducir todos estos procesos es bastante novedoso, en este sentido un mecanismo similar ha sido descrito en macrófagos, por el que la activación del receptor P2X_7 desencadena la liberación de micropartículas tromboinflamatorias con el factor tisular sobreexpresado en su superficie (323). En este contexto, ATP es el ligando endógeno del receptor P2X_7 (99), por lo que es plausible extrapolar esta vía a este agonista y/o a condiciones patológicas que puedan estimular este receptor.

Así, el siguiente y último paso del presente estudio fue evaluar si ATP disponía de un mecanismo similar a ABC por el que pueda desencadenar la formación de agregados plaqueta-neutrófilo y conducir a la formación de trombos. En primer lugar, los resultados mostraron que el SN_{ATP} es capaz de inducir la formación de agregados plaqueta-neutrófilo que no han recibido tratamiento. Evaluando la implicación del receptor P2X_7 en dicho efecto se observó que este receptor no era el único implicado, ya que otros receptores purinérgicos también influyeron en el efecto del SN_{ATP} , como el P2X_1 y el P2X_4 . Dado que ATP es el agonista endógeno de la familia de receptores purinérgicos P2X , estos resultados no son sorprendentes, ya que además el receptor P2X_7 es el receptor P2X que más concentración de ATP requiere para su activación, puesto que, es de esperar que si ATP activa al P2X_7 también podría estar activando otros receptores de la familia (324). La activación de estos receptores por parte de ATP conlleva la movilización de calcio, la formación de ROS, la apertura del poro del canal iónico del receptor P2X_7 , y la activación de la ruta del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que desencadena en la liberación de $\text{IL-1}\beta$. Como se ha mencionado previamente, la activación de esta ruta promueve la transcripción de LOX-1 , induciendo un aumento de la expresión de este receptor en la superficie de los neutrófilos. Por otro lado, la producción de ROS

está asociada con la activación de las metaloproteasas encargadas de la escisión de LOX-1, ADAM10 y ADAM17 (319). En esta línea, los resultados demostraron que ATP induce el aumento de la expresión de LOX-1, ADAM10 y ADAM17 en la superficie de los neutrófilos, además de los niveles de la forma soluble de LOX-1 en el secretoma. Posteriormente, se analizó la implicación funcional de estas proteínas en los efectos del SN_{ATP} sobre la formación de agregados plaqueta-neutrófilo, y se demostró que la escisión de LOX-1, por parte de ADAM10 y ADAM17, y el propio sLOX-1 estaban involucrados funcionalmente en dicho efecto. Finalmente, se evaluó la ruta de señalización plaquetaria involucrada en los efectos de SN_{ATP} , demostrando que, de nuevo, HSP70, la desgranulación y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ plaquetarios participan en este mecanismo (**Figura 97**). Estos resultados se corroboraron con el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃, mediante el que se demostró que ATP era capaz de inducir la formación de trombos, proceso en el que participan los receptores purinérgicos P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2X₇, P2Y₁ y P2Y₁₂, LOX-1, HSP70 y la desgranulación. Además, se realizó un modelo de tratamiento crónico con ATP, con la finalidad de aproximar en mayor medida este modelo *in vivo* a la práctica clínica, simulando las concentraciones altas y prolongadas de ATP en el organismo que se pueden dar debido a condiciones patológicas de inflamación crónica. Con este modelo se observó que el tratamiento crónico con ATP inducía la formación de trombos y el receptor P2X₇ y LOX-1 estaban implicados en el mecanismo que desembocaba dicho efecto. Con todo lo expuesto anteriormente, y debido a que ATP es un mediador endógeno clave en la señalización de muchos procesos fisiológicos y/o patológicos, que ha reproducido, al igual que ABC, un mecanismo de acción dirigido a la sensibilización plaquetaria, se abre una nueva ventana de conocimiento objeto de futuros estudios.

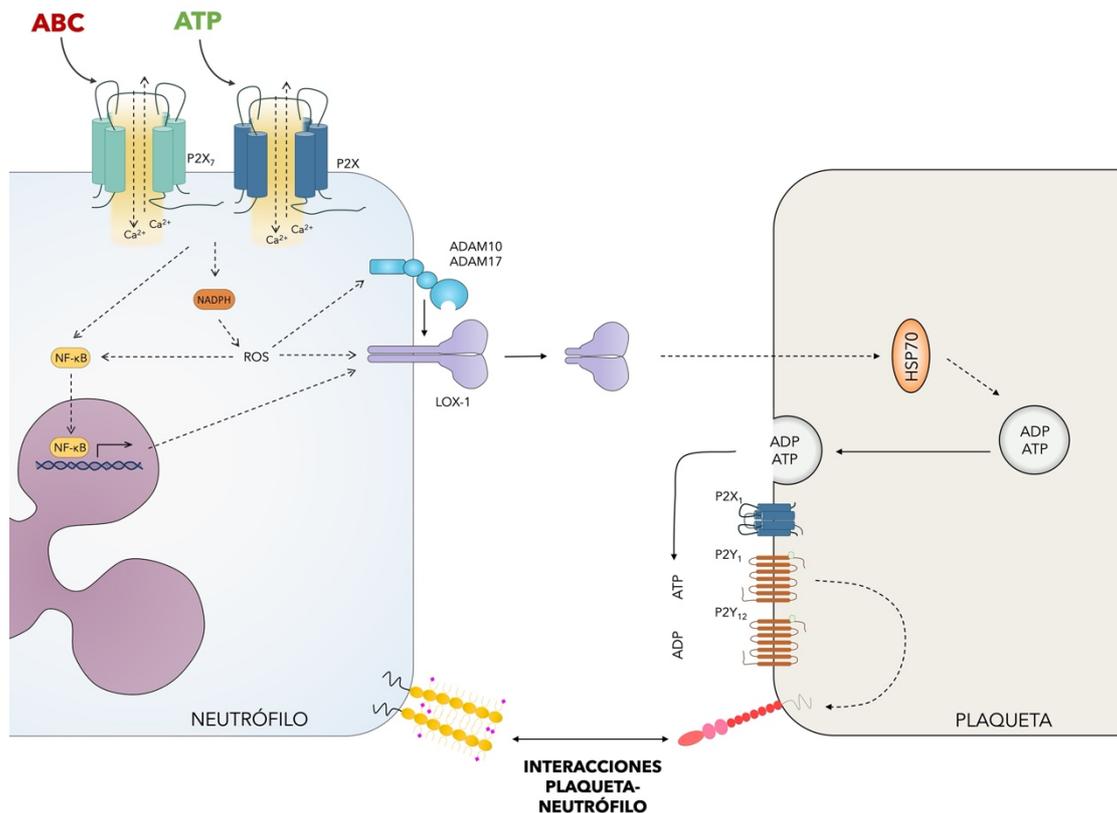


Figura 97. Mecanismo por el cual abacabir (ABC) y adenosina trifosfato (ATP) inducen la formación de agregados plaqueta-neutrófilo. ABC, actúa a través del receptor P2X₇ en neutrófilos, y ATP sobre diferentes receptores purinérgicos P2X en neutrófilos, induciendo su activación y, por tanto, la movilización de Ca²⁺, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la ruta del factor de transcripción NF-κB. Estos a su vez pueden inducir la expresión de LOX-1 en neutrófilos y la activación de ADAM10 y ADAM17, que escinden el receptor LOX-1 liberando su forma soluble en el secretoma. sLOX-1 en plaquetas actúa a través de la proteína HSP70 produciendo la desgranulación plaquetaria, y liberando así nucleótidos, como adenosina difosfato (ADP) y ATP, contenidos en los gránulos, que eventualmente pueden activar a los receptores purinérgicos de las plaquetas P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂, cuyas cascadas de señalización pueden conducir a la expresión y activación de diferentes moléculas de adhesión en las plaquetas que finalmente interaccionaran con otras moléculas de adhesión presentes en los neutrófilos y de esta forma se producirán los agregados plaqueta-neutrófilo. En el caso de ABC, se induce un aumento en la expresión de P-selectina en plaquetas, que finalmente, interacciona con el ligando 1 de P-selectina (PSGL-1) en neutrófilos, dando lugar a la formación de los agregados.

Por último, se realizó un último abordaje con la finalidad de evaluar la capacidad de ABC y ATP de inducir la formación de NETs, y la implicación de estas en la formación de trombos inducida por los mismos. Los resultados mostraron que tanto las concentraciones de ABC y ATP empleadas en los otros estudios *in vitro* en los que se analizó la formación de agregados plaqueta-neutrófilo, no fueron capaces de inducir la liberación de NETs *in vitro*; y que únicamente concentraciones altas de ambos inducían la liberación de las NETs, siendo en el caso de ABC concentraciones superiores a las clínicas. Posteriormente, se evaluó la implicación funcional de las

NETs en la formación de trombos analizada en el modelo murino de trombosis, observándose que estas estructuras estaban involucradas tanto en los trombos inducidos por ABC como por ATP. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de las NETs en las condiciones patológicas de trombosis. Sin embargo, los mecanismos involucrados en estos efectos no se conocen por completo, por lo que habría que continuar abordando este aspecto, que podría conducir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas más efectivas en este tipo de patologías. Además, sería interesante analizar el papel de sLOX-1, del receptor P2X₇ y las NETs en la inducción de agregados plaquetarios y eventos trombóticos en muestras de pacientes infectados por VIH que reciban ABC en su tratamiento, y en pacientes con inflamación crónica para extrapolar estos resultados a un contexto clínico.

VI. CONCLUSIONES

- 1.** Los pacientes con infección por VIH en tratamiento con ABC presentan un estado inflamatorio y trombogénico superior al de los pacientes en tratamiento con TFV o al de los donantes sin infección por VIH. En particular los pacientes en tratamiento con ABC presentan un incremento tanto de las interacciones leucocito-endotelio, plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito, como de la expresión de la molécula de adhesión Mac-1 en leucocitos y GPIIb/IIIa en plaquetas. Además, presentan un aumento de la agregación plaquetaria con respecto al grupo con TFV.
- 2.** ABC adicionado *in vitro* en sangre de pacientes con infección por VIH induce la activación de respuestas inflamatorias y trombogénicas mediadas específicamente por los leucocitos o el endotelio, pero no por las plaquetas. ABC produce un aumento de las interacciones leucocito-endotelio, plaqueta-leucocito y plaqueta-endotelio, además de un incremento en la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1 y gp150,95 en leucocitos. Sin embargo, el tratamiento selectivo de las plaquetas con ABC no afectó a la agregación plaquetaria ni modificó la expresión de las moléculas de adhesión implicadas en la activación y agregación plaquetaria (P-Selectina y GPIIb/IIIa, respectivamente).
- 3.** El mecanismo por el que ABC induce efectos protrombóticos implica la liberación de un secretoma activo (SN_{ABC}) por parte de los neutrófilos que es capaz de producir activación plaquetaria e incrementar la adhesión de las plaquetas a los neutrófilos.
- 4.** La liberación del SN_{ABC} esta mediada por el receptor purinérgico P2X₇ de los neutrófilos, cuya activación implica la movilización de calcio intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno y la formación de poros en la membrana de los neutrófilos.

-
5. El tratamiento de los neutrófilos con ABC produce modificaciones en la composición proteica del secretoma liberado por los mismos. Así, induce un aumento en los niveles de las proteínas EDF1, RAB-11A, VATE-1 y LOX-1, y un descenso en los niveles de actina β 2, queratina tipo II y PSMD9. De todas ellas, únicamente el incremento en la proteína LOX-1 fue dependiente de la activación del receptor P2X₇.
 6. La liberación de LOX-1 en el secretoma por la acción de ADAM10 y ADAM17, es responsable de los efectos del SN_{ABC} sobre las plaquetas. Además, ABC induce un aumento en la expresión de estos receptores (LOX-1, ADAM10 y ADAM17) en la superficie de los neutrófilos.
 7. La proteína HSP70, la liberación de gránulos y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ en plaquetas están implicados en la activación plaquetaria y en la adhesión de las plaquetas sobre los neutrófilos inducidas por el SN_{ABC}.
 8. LOX-1, HSP70, y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂, además del previamente demostrado P2X₇, están implicados en la formación de trombos inducida por ABC en el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃.
 9. ATP, el agonista endógeno de los receptores purinérgicos implicados en los efectos observados de ABC, reprodujo los efectos inducidos por el SN_{ABC}, así como su mecanismo de acción. De forma que, SN_{ATP} induce las interacciones plaqueta-neutrófilo, a través de la liberación de LOX-1 de la superficie de los neutrófilos al secretoma, por la acción de ADAM10 y ADAM17; y de la proteína HSP70, la liberación de gránulos y los receptores purinérgicos P2X₁, P2Y₁ y P2Y₁₂ en plaquetas.

- 10.** ATP induce, en el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃, la formación de trombos a través de los receptores P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₄, P2X₇, P2Y₁ y P2Y₁₂, LOX-1, HSP70 y la liberación de gránulos.

- 11.** Concentraciones elevadas de ABC y ATP inducen la liberación de NETs, y además estas NETs están implicadas en la formación de trombos inducidos por ABC o ATP en el modelo murino de trombosis inducido por FeCl₃.

VII. REFERENCIAS

1. Medzhitov, R. **Origin and Physiological Roles of Inflammation.** *Nature* **2008**, *454*, 428-435.
2. Colling, M.E.; Tourdot, B.E.; Kanthi, Y. **Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism.** *Circ Res* **2021**, *128*, 2017-2036.
3. Langer, H.F.; Chavakis, T. **Leukocyte-Endothelial Interactions in Inflammation.** *J Cell Mol Med* **2009**, *13*, 1211-1220.
4. Zindel, J.; Kubes, P. **DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation.** *Annu Rev Pathol* **2020**, *15*, 493-518.
5. Nourshargh, S.; Alon, R. **Leukocyte Migration into Inflamed Tissues.** *Immunity* **2014**, *41*, 694-707.
6. Muller, W.A. **Leukocyte-Endothelial-Cell Interactions in Leukocyte Transmigration and the Inflammatory Response.** *Trends Immunol* **2003**, *24*, 327-334.
7. Pober, J.S.; Sessa, W.C. **Evolving Functions of Endothelial Cells in Inflammation.** *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 803-815.
8. Busse, R.; Fleming, I. **Vascular Endothelium and Blood Flow.** *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 43-78.
9. Moncada, S.; Higgs, E.A. **Nitric Oxide and the Vascular Endothelium.** *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 213-254.
10. Sessa, W.C. **eNOS at a Glance.** *J Cell Sci* **2004**, *117*, 2427-2429.
11. Minshall, R.D.; Malik, A.B. **Transport Across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability.** *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 107-144.
12. Bazzoni, G.; Dejana, E. **Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis.** *Physiol Rev* **2004**, *84*, 869-901.
13. Ley, K.; Reutershan, J. **Leucocyte-Endothelial Interactions in Health and Disease.** *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 97-133.
14. De Caterina, R.; Libby, P.; Peng, H.B.; Thannickal, V.J.; Rajavashisth, T.B.; Gimbrone, M.A.; Shin, W.S.; Liao, J.K. **Nitric Oxide Decreases Cytokine-Induced Endothelial Activation. Nitric Oxide Selectively Reduces Endothelial Expression of Adhesion Molecules and Proinflammatory Cytokines.** *J Clin Invest* **1995**, *96*, 60-68.

-
15. Matsushita, K.; Morrell, C.N.; Cambien, B.; Yang, S.X.; Yamakuchi, M.; Bao, C.; Hara, M.R.; Quick, R.A.; Cao, W.; O'Rourke, B. *et al.* **Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor.** *Cell* **2003**, *115*, 139-150.
 16. Pober, J.S.; Cotran, R.S. **The Role of Endothelial Cells in Inflammation.** *Transplantation* **1990**, *50*, 537-544.
 17. Birch, K.A.; Ewenstein, B.M.; Golan, D.E.; Pober, J.S. **Prolonged Peak Elevations in Cytoplasmic Free Calcium Ions, Derived from Intracellular Stores, Correlate with the Extent of Thrombin-Stimulated Exocytosis in Single Human Umbilical Vein Endothelial Cells.** *J Cell Physiol* **1994**, *160*, 545-554.
 18. Birch, K.A.; Pober, J.S.; Zavoico, G.B.; Means, A.R.; Ewenstein, B.M. **Calcium/Calmodulin Transduces Thrombin-Stimulated Secretion: Studies in Intact and Minimally Permeabilized Human Umbilical Vein Endothelial Cells.** *J Cell Biol* **1992**, *118*, 1501-1510.
 19. Karmann, K.; Min, W.; Fanslow, W.C.; Pober, J.S. **Activation and Homologous Desensitization of Human Endothelial Cells by CD40 Ligand, Tumor Necrosis Factor, and Interleukin 1.** *J Exp Med* **1996**, *184*, 173-182.
 20. Munro, J.M.; Pober, J.S.; Cotran, R.S. **Tumor Necrosis Factor and Interferon-Gamma Induce Distinct Patterns of Endothelial Activation and Associated Leukocyte Accumulation in Skin of Papio Anubis.** *Am J Pathol* **1989**, *135*, 121-133.
 21. Filippi, M. **Neutrophil Transendothelial Migration: Updates and New Perspectives.** *Blood* **2019**, *133*, 2149-2158.
 22. Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. **Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated.** *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 678-689.
 23. Abdulkhaleq, L.A.; Assi, M.A.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y.H.; Hezmee, M.N.M. **The Crucial Roles of Inflammatory Mediators in Inflammation: A Review.** *Vet World* **2018**, *11*, 627-635.
 24. Takada, Y.; Ye, X.; Simon, S. **The Integrins.** *Genome Biol* **2007**, *8*, 215.
 25. Engelmann, B.; Massberg, S. **Thrombosis as an Intravascular Effector of Innate Immunity.** *Nat Rev Immunol* **2013**, *13*, 34-45.
 26. Furie, B.; Furie, B.C. **Mechanisms of Thrombus Formation.** *N Engl J Med* **2008**, *359*, 938-949.
 27. Gawaz, M. **Role of Platelets in Coronary Thrombosis and Reperfusion of Ischemic Myocardium.** *Cardiovasc Res* **2004**, *61*, 498-511.

28. Neubauer, K.; Zieger, B. **Endothelial Cells and Coagulation.** *Cell Tissue Res* **2022**, *387*, 391-398.
29. Gawaz, M.; Langer, H.; May, A.E. **Platelets in Inflammation and Atherogenesis.** *J Clin Invest* **2005**, *115*, 3378-3384.
30. Sang, Y.; Roest, M.; de Laat, B.; de Groot, P.G.; Huskens, D. **Interplay between Platelets and Coagulation.** *Blood Rev* **2021**, *46*, 100733.
31. Broos, K.; Feys, H.B.; De Meyer, S.F.; Vanhoorelbeke, K.; Deckmyn, H. **Platelets at Work in Primary Hemostasis.** *Blood Rev* **2011**, *25*, 155-167.
32. Koupenova, M.; Kehrel, B.E.; Corkrey, H.A.; Freedman, J.E. **Thrombosis and Platelets: An Update.** *Eur Heart J* **2017**, *38*, 785-791.
33. van der Poll, T.; Parker, R.I. **Platelet Activation and Endothelial Cell Dysfunction.** *Crit Care Clin* **2020**, *36*, 233-253.
34. Thomas, M.R.; Storey, R.F. **The Role of Platelets in Inflammation.** *Thromb Haemost* **2015**, *114*, 449-458.
35. Rendu, F.; Brohard-Bohn, B. **The Platelet Release Reaction: Granules' Constituents, Secretion and Functions.** *Platelets* **2001**, *12*, 261-273.
36. Ruggeri, Z.M. **Platelets in Atherothrombosis.** *Nat Med* **2002**, *8*, 1227-1234.
37. Palta, S.; Saroa, R.; Palta, A. **Overview of the Coagulation System.** *Indian J Anaesth* **2014**, *58*, 515-523.
38. Grover, S.P.; Mackman, N. **Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2018**, *38*, 709-725.
39. Kahner, B.N.; Shankar, H.; Murugappan, S.; Prasad, G.L.; Kunapuli, S.P. **Nucleotide Receptor Signaling in Platelets.** *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 2317-2326.
40. Hu, H.; Hoylaerts, M.F. **The P2X1 Ion Channel in Platelet Function.** *Platelets* **2010**, *21*, 153-166.
41. Vial, C.; Pitt, S.J.; Roberts, J.; Rolf, M.G.; Mahaut-Smith, M.P.; Evans, R.J. **Lack of Evidence for Functional ADP-Activated Human P2X1 Receptors Supports a Role for ATP during Hemostasis and Thrombosis.** *Blood* **2003**, *102*, 3646-3651.
42. Rolf, M.G.; Brearley, C.A.; Mahaut-Smith, M.P. **Platelet Shape Change Evoked by Selective Activation of P2X1 Purinoceptors with Alpha,Beta-Methylene ATP.** *Thromb Haemost* **2001**, *85*, 303-308.

-
43. Li, Z.; Smyth, S.S. **Interactions between Platelets, Leukocytes, and the Endothelium.** Platelets (Fourth Edition) **2019**, 295-310.
 44. Rayes, J.; Bourne, J.H.; Brill, A.; Watson, S.P. **The Dual Role of Platelet-Innate Immune Cell Interactions in Thrombo-Inflammation.** Res Pract Thromb Haemost **2020**, 4, 23-35.
 45. Noubouossie, D.F.; Reeves, B.N.; Strahl, B.D.; Key, N.S. **Neutrophils: Back in the Thrombosis Spotlight.** Blood **2019**, 133, 2186-2197.
 46. Li, J.; Kim, K.; Barazia, A.; Tseng, A.; Cho, J. **Platelet-Neutrophil Interactions Under Thromboinflammatory Conditions.** Cell Mol Life Sci **2015**, 72, 2627-2643.
 47. Blanch-Ruiz, M.A.; Ortega-Luna, R.; Martínez-Cuesta, M.Á; Álvarez, Á. **The Neutrophil Secretome as a Crucial Link between Inflammation and Thrombosis.** Int J Mol Sci **2021**, 22, 4170.
 48. Mayadas, T.N.; Cullere, X.; Lowell, C.A. **The Multifaceted Functions of Neutrophils.** Annu Rev Pathol **2014**, 9, 181-218.
 49. von Brühl, M.; Stark, K.; Steinhart, A.; Chandraratne, S.; Konrad, I.; Lorenz, M.; Khandoga, A.; Tirniceriu, A.; Coletti, R.; Köllnberger, M. *et al.* **Monocytes, Neutrophils, and Platelets Cooperate to Initiate and Propagate Venous Thrombosis in Mice *in Vivo*.** J Exp Med **2012**, 209, 819-835.
 50. McGuinness, C.L.; Humphries, J.; Waltham, M.; Burnand, K.G.; Collins, M.; Smith, A. **Recruitment of Labelled Monocytes by Experimental Venous Thrombi.** Thromb Haemost **2001**, 85, 1018-1024.
 51. Wakefield, T.W.; Strieter, R.M.; Wilke, C.A.; Kadell, A.M.; Wroblewski, S.K.; Burdick, M.D.; Schmidt, R.; Kunkel, S.L.; Greenfield, L.J. **Venous Thrombosis-Associated Inflammation and Attenuation with Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules.** Arterioscler Thromb Vasc Biol **1995**, 15, 258-268.
 52. Faurischou, M.; Borregaard, N. **Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation.** Microbes Infect **2003**, 5, 1317-1327.
 53. Cowland, J.B.; Borregaard, N. **Granulopoiesis and Granules of Human Neutrophils.** Immunol Rev **2016**, 273, 11-28.
 54. Borregaard, N.; Lollike, K.; Kjeldsen, L.; Sengeløv, H.; Bastholm, L.; Nielsen, M.H.; Bainton, D.F. **Human Neutrophil Granules and Secretory Vesicles.** European journal of haematology **1993**, 51, 187-198.
 55. Borregaard, N.; Sørensen, O.E.; Theilgaard-Mönch, K. **Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins.** Trends Immunol **2007**, 28, 340-345.

56. Rørvig, S.; Østergaard, O.; Heegaard, N.H.H.; Borregaard, N. **Proteome Profiling of Human Neutrophil Granule Subsets, Secretory Vesicles, and Cell Membrane: Correlation with Transcriptome Profiling of Neutrophil Precursors.** *J Leukoc Biol* **2013**, *94*, 711-721.
57. Lominadze, G.; Powell, D.W.; Luerman, G.C.; Link, A.J.; Ward, R.A.; McLeish, K.R. **Proteomic Analysis of Human Neutrophil Granules.** *Mol Cell Proteomics* **2005**, *4*, 1503-1521.
58. Yin, C.; Heit, B. **Armed for Destruction: Formation, Function and Trafficking of Neutrophil Granules.** *Cell Tissue Res* **2018**, *371*, 455-471.
59. Loyer, X.; Vion, A.; Tedgui, A.; Boulanger, C.M. **Microvesicles as Cell-Cell Messengers in Cardiovascular Diseases.** *Circ Res* **2014**, *114*, 345-353.
60. Boulanger, C.M.; Loyer, X.; Rautou, P.; Amabile, N. **Extracellular Vesicles in Coronary Artery Disease.** *Nat Rev Cardiol* **2017**, *14*, 259.
61. Zarà, M.; Guidetti, G.F.; Camera, M.; Canobbio, I.; Amadio, P.; Torti, M.; Tremoli, E.; Barbieri, S.S. **Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis.** *IJMS* **2019**, *20*.
62. Tripisciano, C.; Weiss, R.; Eichhorn, T.; Spittler, A.; Heuser, T.; Fischer, M.B.; Weber, V. **Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin.** *Sci Rep* **2017**, *7*, 6522.
63. Chou, J.; Mackman, N.; Merrill-Skoloff, G.; Pedersen, B.; Furie, B.C.; Furie, B. **Hematopoietic Cell-Derived Microparticle Tissue Factor Contributes to Fibrin Formation during Thrombus Propagation.** *Blood* **2004**, *104*, 3190-3197.
64. Morrissey, J.H.; Choi, S.H.; Smith, S.A. **Polyphosphate: An Ancient Molecule that Links Platelets, Coagulation, and Inflammation.** *Blood* **2012**, *119*, 5972-5979.
65. Almeida, V.H.; Rondon, A.M.R.; Gomes, T.; Monteiro, R.Q. **Novel Aspects of Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer-Associated Thrombosis.** *Cells (Basel, Switzerland)* **2019**, *8*, 716.
66. Swystun, L.L.; Liaw, P.C. **The Role of Leukocytes in Thrombosis.** *Blood* **2016**, *128*, 753-762.
67. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D.D.; Wroblewski, S.K.; Wakefield, T.W.; Hartwig, J.H.; Wagner, D.D. **Extracellular DNA Traps Promote Thrombosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **2010**, *107*, 15880-15885.

-
68. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. **Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.** *Science* **2004**, *303*, 1532-1535.
69. Yousefi, S.; Mihalache, C.; Kozlowski, E.; Schmid, I.; Simon, H.U. **Viable Neutrophils Release Mitochondrial DNA to Form Neutrophil Extracellular Traps.** *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 1438-1444.
70. Urban, C.F.; Ermert, D.; Schmid, M.; Abu-Abed, U.; Goosmann, C.; Nacker, W.; Brinkmann, V.; Jungblut, P.R.; Zychlinsky, A. **Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense Against *Candida Albicans*.** *PLoS Pathog* **2009**, *5*, e1000639.
71. Fuchs, T.A.; Abed, U.; Goosmann, C.; Hurwitz, R.; Schulze, I.; Wahn, V.; Weinrauch, Y.; Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. **Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps.** *J Cell Biol* **2007**, *176*, 231-241.
72. Yipp, B.G.; Petri, B.; Salina, D.; Jenne, C.N.; Scott, B.N.V.; Zbytniuk, L.D.; Pittman, K.; Asaduzzaman, M.; Wu, K.; Meijndert, H.C. *et al.* **Infection-Induced NETosis is a Dynamic Process Involving Neutrophil Multitasking *in Vivo*.** *Nat Med* **2012**, *18*, 1386-1393.
73. Yipp, B.G.; Kubes, P. **NETosis: How Vital is it?** *Blood* **2013**, *122*, 2784-2794.
74. Lood, C.; Blanco, L.P.; Purmalek, M.M.; Carmona-Rivera, C.; De Ravin, S.S.; Smith, C.K.; Malech, H.L.; Ledbetter, J.A.; Elkon, K.B.; Kaplan, M.J. **Neutrophil Extracellular Traps Enriched in Oxidized Mitochondrial DNA are Interferogenic and Contribute to Lupus-Like Disease.** *Nat Med* **2016**, *22*, 146-153.
75. Doua, D.N.; Khan, M.A.; Grasemann, H.; Palaniyar, N. **SK3 Channel and Mitochondrial ROS Mediate NADPH Oxidase-Independent NETosis Induced by Calcium Influx.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 2817-2822.
76. Papayannopoulos, V.; Metzler, K.D.; Hakkim, A.; Zychlinsky, A. **Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps.** *J Cell Biol* **2010**, *191*, 677-691.
77. Neeli, I.; Dwivedi, N.; Khan, S.; Radic, M. **Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils.** *J Innate Immun* **2009**, *1*, 194-201.
78. Kimberly Martinod; Melanie Demers; Tobias A. Fuchs; Siu Ling Wong; Alexander Brill; Maureen Gallant; Jing Hu; Yanming Wang; Denisa D. Wagner. **Neutrophil Histone Modification by Peptidylarginine Deiminase 4 is Critical for Deep Vein Thrombosis in Mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **2013**, *110*, 8674-8679.

79. Sollberger, G.; Choidas, A.; Burn, G.L.; Habenberger, P.; Di Lucrezia, R.; Kordes, S.; Menninger, S.; Eickhoff, J.; Nussbaumer, P.; Klebl, B. *et al.* **Gasdermin D Plays a Vital Role in the Generation of Neutrophil Extracellular Traps.** *Sci Immunol* **2018**, *3*.
80. Chen, K.W.; Monteleone, M.; Boucher, D.; Sollberger, G.; Ramnath, D.; Condon, N.D.; von Pein, J.B.; Broz, P.; Sweet, M.J.; Schroder, K. **Noncanonical Inflammasome Signaling Elicits Gasdermin D-Dependent Neutrophil Extracellular Traps.** *Sci Immunol* **2018**, *3*.
81. Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M.A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S.P.; Lohmeyer, J.; Preissner, K.T. **Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones.** *PLoS One* **2012**, *7*, e32366.
82. Gupta, A.K.; Joshi, M.B.; Philippova, M.; Erne, P.; Hasler, P.; Hahn, S.; Resink, T.J. **Activated Endothelial Cells Induce Neutrophil Extracellular Traps and are Susceptible to NETosis-Mediated Cell Death.** *FEBS Lett* **2010**, *584*, 3193-3197.
83. Stakos, D.A.; Kambas, K.; Konstantinidis, T.; Mitroulis, I.; Apostolidou, E.; Arelaki, S.; Tsironidou, V.; Giatromanolaki, A.; Skendros, P.; Konstantinides, S. *et al.* **Expression of Functional Tissue Factor by Neutrophil Extracellular Traps in Culprit Artery of Acute Myocardial Infarction.** *Eur Heart J* **2015**, *36*, 1405-1414.
84. Wang, Y.; Luo, L.; Braun, O.Ö.; Westman, J.; Madhi, R.; Herwald, H.; Mörgelin, M.; Thorlacius, H. **Neutrophil Extracellular Trap-Microparticle Complexes Enhance Thrombin Generation Via the Intrinsic Pathway of Coagulation in Mice.** *Sci Rep* **2018**, *8*, 4020.
85. Reges, K.; Engelmann, B.; Bidzhekov, K.; Goosmann, C.; Lorenz, M.; Pfeiler, S.; Konrad, I.; Grahl, L.; Massberg, S.; von Bruehl, M. *et al.* **Reciprocal Coupling of Coagulation and Innate Immunity Via Neutrophil Serine Proteases.** *Nature medicine* **2010**, *16*, 887-896.
86. Clark, S.R.; Ma, A.C.; Tavener, S.A.; McDonald, B.; Goodarzi, Z.; Kelly, M.M.; Patel, K.D.; Chakrabarti, S.; McAvoy, E.; Sinclair, G.D. *et al.* **Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood.** *Nat Med* **2007**, *13*, 463-469.
87. Lotze, M.T.; Zeh, H.J.; Rubartelli, A.; Sparvero, L.J.; Amoscato, A.A.; Washburn, N.R.; Devera, M.E.; Liang, X.; Tör, M.; Billiar, T. **The Grateful Dead: Damage-Associated Molecular Pattern Molecules and Reduction/Oxidation Regulate Immunity.** *Immunol Rev* **2007**, *220*, 60-81.

-
88. Di Virgilio, F.; Chiozzi, P.; Ferrari, D.; Falzoni, S.; Sanz, J.M.; Morelli, A.; Torboli, M.; Bolognesi, G.; Baricordi, O.R. **Nucleotide Receptors: An Emerging Family of Regulatory Molecules in Blood Cells.** *Blood* **2001**, *97*, 587-600.
 89. Burnstock, G. **Purine and Pyrimidine Receptors.** *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64*, 1471-1483.
 90. Eltzschig, H.K.; Sitkovsky, M.V.; Robson, S.C. **Purinergic Signaling during Inflammation.** *N Engl J Med* **2012**, *367*, 2322-2333.
 91. Pellegatti, P.; Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Piccardi, F.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. **Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: *In Vivo* Imaging with Plasma Membrane Luciferase.** *PLoS One* **2008**, *3*, e2599.
 92. Burnstock, G. **Purinergic Signaling in the Cardiovascular System.** *Circ Res* **2017**, *120*, 207-228.
 93. Kennedy, C. **The P2Y/P2X Divide: How it Began.** *Biochem Pharmacol* **2021**, *187*, 114408.
 94. Rumney, R.M.H.; Górecki, D.C. **Knockout and Knock-in Mouse Models to Study Purinergic Signaling.** *Methods Mol Biol* **2020**, *2041*, 17-43.
 95. North, R.A. **Molecular Physiology of P2X Receptors.** *Physiol Rev* **2002**, *82*, 1013-1067.
 96. Junger, W.G. **Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling.** *Nat Rev Immunol* **2011**, *11*, 201-212.
 97. Wilhelm, K.; Ganesan, J.; Müller, T.; Dürr, C.; Grimm, M.; Beilhack, A.; Krempl, C.D.; Sorichter, S.; Gerlach, U.V.; Jüttner, E. *et al.* **Graft-Versus-Host Disease is Enhanced by Extracellular ATP Activating P2X7R.** *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1434-1438.
 98. Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R.A.; Buell, G. **The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X7).** *Science* **1996**, *272*, 735-738.
 99. Martínez-Cuesta, M.Á.; Blanch-Ruiz, M.A.; Ortega-Luna, R.; Sánchez-López, A.; Álvarez, Á. **Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor.** *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
 100. Ugur, M.; Ugur, Ö. **A Mechanism-Based Approach to P2X7 Receptor Action.** *Mol. Pharmacol.* **2019**, *95*, 442-450.
 101. Kopp, R.; Krautloher, A.; Ramírez-Fernández, A.; Nicke, A. **P2X7 Interactions and Signaling - Making Head Or Tail of It.** *Front Mol Neurosci* **2019**, *12*, 183.

102. Gusic, M.; Benndorf, K.; Sattler, C. **Dissecting Activation Steps in P2X7 Receptors.** *Biochem Biophys Res Commun* **2021**, *569*, 112-117.
103. Pelegrin, P. **P2X7 Receptor and the NLRP3 Inflammasome: Partners in Crime.** *Biochem Pharmacol* **2021**, *187*, 114385.
104. Savio, L.E.B.; Leite-Aguiar, R.; Alves, V.S.; Coutinho-Silva, R.; Wyse, A.T.S. **Purinergic Signaling in the Modulation of Redox Biology.** *Redox Biol* **2021**, *47*, 102137.
105. Adinolfi, E.; Giuliani, A.L.; De Marchi, E.; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. **The P2X7 Receptor: A Main Player in Inflammation.** *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *151*, 234-244.
106. Burnstock, G.; Knight, G.E. **Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems.** *Int Rev Cytol* **2004**, *240*, 31-304.
107. Cuthbert, G.A.; Shaik, F.; Harrison, M.A.; Ponnambalam, S.; Homer-Vanniasinkam, S. **Scavenger Receptors as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease.** *Cells* **2020**, *9*, 2453.
108. Fan, J.; Watanabe, T. **Atherosclerosis: Known and Unknown.** *Pathol Int* **2022**, *72*, 151-160.
109. Jebari-Benslaiman, S.; Galicia-García, U.; Larrea-Sebal, A.; Olaetxea, J.R.; Alloza, I.; Vandenbroeck, K.; Benito-Vicente, A.; Martín, C. **Pathophysiology of Atherosclerosis.** *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 3346.
110. Pirillo, A.; Norata, G.D.; Catapano, A.L. **LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis.** *Mediators Inflamm* **2013**, *2013*, 152786.
111. Gisterå, A.; Hansson, G.K. **The Immunology of Atherosclerosis.** *Nat Rev Nephrol* **2017**, *13*, 368-380.
112. Sawamura, T.; Kume, N.; Aoyama, T.; Moriwaki, H.; Hoshikawa, H.; Aiba, Y.; Tanaka, T.; Miwa, S.; Katsura, Y.; Kita, T. *et al.* **An Endothelial Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein.** *Nature* **1997**, *386*, 73-77.
113. Herre, J.; Willment, J.A.; Gordon, S.; Brown, G.D. **The Role of Dectin-1 in Antifungal Immunity.** *Crit Rev Immunol* **2004**, *24*, 193-203.
114. Kattoor, A.J.; Goel, A.; Mehta, J.L. **LOX-1: Regulation, Signaling and its Role in Atherosclerosis.** *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*, 218.
115. Yoshimoto, R.; Fujita, Y.; Kakino, A.; Iwamoto, S.; Takaya, T.; Sawamura, T. **The Discovery of LOX-1, its Ligands and Clinical Significance.** *Cardiovasc Drugs Ther* **2011**, *25*, 379-391.

-
- 116.** Xu, S.; Ogura, S.; Chen, J.; Little, P.J.; Moss, J.; Liu, P. **LOX-1 in Atherosclerosis: Biological Functions and Pharmacological Modifiers.** *Cell Mol Life Sci* **2013**, *70*, 2859-2872.
- 117.** Marwali, M.R.; Hu, C.; Mohandas, B.; Dandapat, A.; Deonikar, P.; Chen, J.; Cawich, I.; Sawamura, T.; Kavdia, M.; Mehta, J.L. **Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1, Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling.** *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *322*, 1324-1332.
- 118.** Pirillo, A.; Catapano, A.L. **Soluble Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 as a Biochemical Marker for Atherosclerosis-Related Diseases.** *Dis Markers* **2013**, *35*, 413-418.
- 119.** Saftig, P.; Reiss, K. **The "A Disintegrin and Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: Novel Drug Targets with Therapeutic Potential?** *Eur J Cell Biol* **2011**, *90*, 527-535.
- 120.** Fauci, A.S. **HIV and AIDS: 20 Years of Science.** *Nat Med* **2003**, *9*, 839-843.
- 121.** Centers for Disease Control. **Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia among Homosexual Men--New York City and California.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **1981**, *30*, 305-308.
- 122.** Centers for Disease Control. **Pneumocystis Pneumonia--Los Angeles.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **1981**, *30*, 250-252.
- 123.** De Cock, K.M.; Jaffe, H.W.; Curran, J.W. **The Evolving Epidemiology of HIV/AIDS.** *AIDS* **2012**, *26*, 1205-1213.
- 124.** Masur, H.; Michelis, M.A.; Greene, J.B.; Onorato, I.; Stouwe, R.A.; Holzman, R.S.; Wormser, G.; Brettman, L.; Lange, M.; Murray, H.W. *et al.* **An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis Carinii Pneumonia: Initial Manifestation of Cellular Immune Dysfunction.** *N Engl J Med* **1981**, *305*, 1431-1438.
- 125.** Centers for Disease Control. **A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and Orange Counties, California.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **1982**, *31*, 305-307.
- 126.** Francis, D.P.; Curran, J.W.; Essex, M. **Epidemic Acquired Immune Deficiency Syndrome: Epidemiologic Evidence for a Transmissible Agent.** *J Natl Cancer Inst* **1983**, *71*, 1-4.
- 127.** Agarwal-Jans, S. **Timeline: HIV.** *Cell* **2020**, *183*, 550.

128. Montagnier, L. **Historical Essay. A History of HIV Discovery.** Science **2002**, 298, 1727-1728.
129. Gallo, R.C. **Historical Essay. the Early Years of HIV/AIDS.** Science **2002**, 298, 1728-1730.
130. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rouzioux, C. *et al.* **Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS).** Science **1983**, 220, 868-871.
131. Gallo, R.C.; Sarin, P.S.; Gelmann, E.P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V.S.; Mann, D.; Sidhu, G.D.; Stahl, R.E.; Zolla-Pazner, S. *et al.* **Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS).** Science **1983**, 220, 865-867.
132. Yusim, K.; Peeters, M.; Pybus, O.G.; Bhattacharya, T.; Delaporte, E.; Mulanga, C.; Muldoon, M.; Theiler, J.; Korber, B. **Using Human Immunodeficiency Virus Type 1 Sequences to Infer Historical Features of the Acquired Immune Deficiency Syndrome Epidemic and Human Immunodeficiency Virus Evolution.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **2001**, 356, 855-866.
133. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. **Human Immunodeficiency Virus (HIV).** Transfus Med Hemother **2016**, 43, 203-222.
134. Turner, B.G.; Summers, M.F. **Structural Biology of HIV.** J Mol Biol **1999**, 285, 1-32.
135. Fanales-Belasio, E.; Raimondo, M.; Suligoj, B.; Buttò, S. **HIV Virology and Pathogenetic Mechanisms of Infection: A Brief Overview.** Ann Ist Super Sanita **2010**, 46, 5-14.
136. Herbein, G.; Van Lint, C.; Lovett, J.L.; Verdin, E. **Distinct Mechanisms Trigger Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected and in Uninfected Bystander T Lymphocytes.** J Virol **1998**, 72, 660-670.
137. Lindbäck, S.; Thorstensson, R.; Karlsson, A.C.; von Sydow, M.; Flamholz, L.; Blaxhult, A.; Sönnernborg, A.; Biberfeld, G.; Gaines, H. **Diagnosis of Primary HIV-1 Infection and Duration of Follow-Up After HIV Exposure.** Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. AIDS **2000**, 14, 2333-2339.
138. Burin des Roziers, N.; Sotto, A.; Arnaud, A.; Saissi, G.; Nasar, O.; Jourdan, J. **Kinetics of Detection of Antibodies to HIV-1 and Plasma p24 Antigens during a Severe Primary HIV-1 Infection.** AIDS **1995**, 9, 528-529.
139. **Global HIV & AIDS Statistics – Fact Sheet.** 2023.

-
- 140. IN DANGER: UNAIDS Global AIDS Update 2022.** Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; **2022.**
- 141.** Menéndez-Arias, L.; Delgado, R. **Update and Latest Advances in Antiretroviral Therapy.** Trends Pharmacol Sci **2022**, *43*, 16-29.
- 142.** Pomerantz, R.J.; Horn, D.L. **Twenty Years of Therapy for HIV-1 Infection.** Nat Med **2003**, *9*, 867-873.
- 143.** Atta, M.G.; De Seigneux, S.; Lucas, G.M. **Clinical Pharmacology in HIV Therapy.** Clin J Am Soc Nephrol **2019**, *14*, 435-444.
- 144.** GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. **Global Burden of 369 Diseases and Injuries in 204 Countries and Territories, 1990-2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019.** Lancet **2020**, *396*, 1204-1222.
- 145.** Hütter, G.; Nowak, D.; Mossner, M.; Ganepola, S.; Müssig, A.; Allers, K.; Schneider, T.; Hofmann, J.; Kücherer, C.; Blau, O. *et al.* **Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation.** N Engl J Med **2009**, *360*, 692-698.
- 146.** Gupta, R.K.; Peppas, D.; Hill, A.L.; Gálvez, C.; Salgado, M.; Pace, M.; McCoy, L.E.; Griffith, S.A.; Thornhill, J.; Alrubayyi, A. *et al.* **Evidence for HIV-1 Cure After CCR5Δ32/Δ32 Allogeneic Haemopoietic Stem-Cell Transplantation 30 Months Post Analytical Treatment Interruption: A Case Report.** Lancet HIV **2020**, *7*, e340-e347.
- 147.** Bailon, L.; Mothe, B.; Berman, L.; Brander, C. **Novel Approaches Towards a Functional Cure of HIV/AIDS.** Drugs **2020**, *80*, 859-868.
- 148.** Ribera, E.; Tuset, M.; Martín, M.; del Cacho, E. **Characteristics of Antiretroviral Drugs.** Enferm Infecc Microbiol Clin **2011**, *29*, 362-391.
- 149.** Saag, M.S.; Gandhi, R.T.; Hoy, J.F.; Landovitz, R.J.; Thompson, M.A.; Sax, P.E.; Smith, D.M.; Benson, C.A.; Buchbinder, S.P.; Del Rio, C. *et al.* **Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel.** JAMA **2020**, *324*, 1651-1669.
- 150.** Panel de expertos de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y de la División de control de VIH, ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis (DCVIHT). **Documento De Consenso Sobre Tratamiento Antirretroviral En Niños Y Adolescentes Con Infección Por El VIH. 2022.**

151. Gandhi, R.T.; Bedimo, R.; Hoy, J.F.; Landovitz, R.J.; Smith, D.M.; Eaton, E.F.; Lehmann, C.; Springer, S.A.; Sax, P.E.; Thompson, M.A. *et al.* **Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2022 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel.** *JAMA* **2023**, *329*, 63-84.
152. Wassner, C.; Bradley, N.; Lee, Y. **A Review and Clinical Understanding of Tenofovir: Tenofovir Disoproxil Fumarate Versus Tenofovir Alafenamide.** *J Int Assoc Provid AIDS Care* **2020**, *19*, 2325958220919231.
153. Di Perri, G. **Tenofovir Alafenamide (TAF) Clinical Pharmacology.** *Infez Med* **2021**, *29*, 526-529.
154. Foster, R.H.; Faulds, D. **Abacavir.** *Drugs* **1998**, *55*, 729-738.
155. Yuen, G.J.; Weller, S.; Pakes, G.E. **A Review of the Pharmacokinetics of Abacavir.** *Clin Pharmacokinet* **2008**, *47*, 351-371.
156. Barbarino, J.M.; Kroetz, D.L.; Altman, R.B.; Klein, T.E. **PharmGKB Summary: Abacavir Pathway.** *Pharmacogenet Genomics* **2014**, *24*, 276-282.
157. Hughes, W.; McDowell, J.A.; Shenep, J.; Flynn, P.; Kline, M.W.; Yogev, R.; Symonds, W.; Lou, Y.; Hetherington, S. **Safety and Single-Dose Pharmacokinetics of Abacavir (1592U89) in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Children.** *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, 609-615.
158. Wang, L.H.; Chittick, G.E.; McDowell, J.A. **Single-Dose Pharmacokinetics and Safety of Abacavir (1592U89), Zidovudine, and Lamivudine Administered Alone and in Combination in Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection.** *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, 1708-1715.
159. Carr, A.; Cooper, D.A. **Adverse Effects of Antiretroviral Therapy.** *Lancet* **2000**, *356*, 1423-1430.
160. Keiser, O.; Fellay, J.; Opravil, M.; Hirsch, H.H.; Hirschel, B.; Bernasconi, E.; Vernazza, P.L.; Rickenbach, M.; Telenti, A.; Furrer, H. **Adverse Events to Antiretrovirals in the Swiss HIV Cohort Study: Effect on Mortality and Treatment Modification.** *Antivir Ther* **2007**, *12*, 1157-1164.
161. Fernandez-Montero, J.V.; Eugenia, E.; Barreiro, P.; Labarga, P.; Soriano, V. **Antiretroviral Drug-Related Toxicities - Clinical Spectrum, Prevention, and Management.** *Expert Opin Drug Saf* **2013**, *12*, 697-707.
162. Reust, C.E. **Common Adverse Effects of Antiretroviral Therapy for HIV Disease.** *Am Fam Physician* **2011**, *83*, 1443-1451.
163. Calmy, A.; Hirschel, B.; Cooper, D.A.; Carr, A. **Clinical Update: Adverse Effects of Antiretroviral Therapy.** *Lancet* **2007**, *370*, 12-14.

-
- 164.** Vos, A.G.; Venter, W.D.F. **Cardiovascular Toxicity of Contemporary Antiretroviral Therapy.** *Curr Opin HIV AIDS* **2021**, *16*, 286-291.
- 165.** Hsue, P.Y.; Waters, D.D. **HIV Infection and Coronary Heart Disease: Mechanisms and Management.** *Nat Rev Cardiol* **2019**, *16*, 745-759.
- 166.** Madzime, M.; Rossouw, T.M.; Theron, A.J.; Anderson, R.; Steel, H.C. **Interactions of HIV and Antiretroviral Therapy with Neutrophils and Platelets.** *Front Immunol* **2021**, *12*, 634386.
- 167.** Dominick, L.; Midgley, N.; Swart, L.; Sprake, D.; Deshpande, G.; Laher, I.; Joseph, D.; Teer, E.; Essop, M.F. **HIV-Related Cardiovascular Diseases: The Search for a Unifying Hypothesis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2020**, *318*, H731-H746.
- 168.** Shah, A.S.V.; Stelzle, D.; Lee, K.K.; Beck, E.J.; Alam, S.; Clifford, S.; Longenecker, C.T.; Strachan, F.; Bagchi, S.; Whiteley, W. *et al.* **Global Burden of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in People Living with HIV: Systematic Review and Meta-Analysis.** *Circulation* **2018**, *138*, 1100-1112.
- 169.** Sokoya, T.; Steel, H.C.; Nieuwoudt, M.; Rossouw, T.M. **HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence.** *Mediators Inflamm* **2017**, *2017*, 6825493.
- 170.** Nasi, M.; De Biasi, S.; Gibellini, L.; Bianchini, E.; Pecorini, S.; Bacca, V.; Guaraldi, G.; Mussini, C.; Pinti, M.; Cossarizza, A. **Ageing and Inflammation in Patients with HIV Infection.** *Clin Exp Immunol* **2017**, *187*, 44-52.
- 171.** Zicari, S.; Sessa, L.; Cotugno, N.; Ruggiero, A.; Morrocchi, E.; Concato, C.; Rocca, S.; Zangari, P.; Manno, E.C.; Palma, P. **Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients Under Long-Term ART.** *Viruses* **2019**, *11*, 200.
- 172.** Siedner, M.J. **START Or SMART? Timing of Antiretroviral Therapy Initiation and Cardiovascular Risk for People with Human Immunodeficiency Virus Infection.** *Open Forum Infect Dis* **2016**, *3*, ofw032.
- 173.** El-Sadr, W.M.; Lundgren, J.D.; Neaton, J.D.; Gordin, F.; Abrams, D.; Arduino, R.C.; Babiker, A.; Burman, W.; Clumeck, N.; Cohen, C.J. *et al.* **CD4+ Count-Guided Interruption of Antiretroviral Treatment.** *N Engl J Med* **2006**, *355*, 2283-2296.
- 174.** So-Armah, K.; Benjamin, L.A.; Bloomfield, G.S.; Feinstein, M.J.; Hsue, P.; Njuguna, B.; Freiberg, M.S. **HIV and Cardiovascular Disease.** *Lancet HIV* **2020**, *7*, e279-e293.

175. Friis-Møller, N.; Sabin, C.A.; Weber, R.; d'Arminio Monforte, A.; El-Sadr, W.M.; Reiss, P.; Thiébaud, R.; Morfeldt, L.; De Wit, S.; Pradier, C. *et al.* **Combination Antiretroviral Therapy and the Risk of Myocardial Infarction.** *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1993-2003.
176. Sanz, E. **Abacavir-Myocardial Infarction.** *WHO Signal* **2005**.
177. Sabin, C.A.; Worm, S.W.; Weber, R.; Reiss, P.; El-Sadr, W.; Dabis, F.; De Wit, S.; Law, M.; D'Arminio Monforte, A.; Friis-Møller, N. *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*, 1417-1426.
178. Lundgren, J.; Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy/INSIGHT & DAD Study Groups. **Use of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Risk of Myocardial Infarction in HIV-Infected Patients.** *AIDS* **2008**, *22*, 17.
179. Brothers, C.H.; Hernandez, J.E.; Cutrell, A.G.; Curtis, L.; Ait-Khaled, M.; Bowlin, S.J.; Hughes, S.H.; Yeo, J.M.; Lapierre, D.H. **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*, 20-28.
180. Ribaud, H.J.; Benson, C.A.; Zheng, Y.; Koletar, S.L.; Collier, A.C.; Lok, J.J.; Smurzynski, M.; Bosch, R.J.; Bastow, B.; Schouten, J.T. **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*, 929-940.
181. Sax, P.E.; Tierney, C.; Collier, A.C.; Daar, E.S.; Mollan, K.; Budhathoki, C.; Godfrey, C.; Jahed, N.C.; Myers, L.; Katzenstein, D. *et al.* **Abacavir/Lamivudine Versus Tenofovir DF/Emtricitabine as Part of Combination Regimens for Initial Treatment of HIV: Final Results.** *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1191-1201.
182. Bedimo, R.J.; Westfall, A.O.; 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*, 84-91.
183. Panel de expertos de GeSIDA y División de control de VIH, ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis. Plan Nacional sobre el Sida. **Documento De Consenso De GeSIDA/Plan Nacional Sobre El Sida Respecto Al Tratamiento Antirretroviral En Adultos Infeccionados Por El Virus De La Inmunodeficiencia Humana (Actualización Enero 2014).** **2014.**

-
- 184.** Panel de expertos de GeSIDA y División de control de VIH, ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis. Plan Nacional sobre el Sida. **Documento De Consenso De GeSIDA/Plan Nacional Sobre El Sida Respecto Al Tratamiento Antirretroviral En Adultos Infeccionados Por El Virus De La Inmunodeficiencia Humana. 2022.**
- 185.** Worm, S.W.; Sabin, C.; Weber, R.; Reiss, P.; El-Sadr, W.; Dabis, F.; De Wit, S.; Law, M.; Monforte, A.D.; Friis-Møller, N. *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*, 318-330.
- 186.** Sabin, C.A.; Reiss, P.; Ryom, L.; Phillips, A.N.; Weber, R.; Law, M.; Fontas, E.; Mocroft, A.; de Wit, S.; Smith, C. *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*, 61.
- 187.** Kowalska, J.D.; Kirk, O.; Mocroft, A.; Høj, L.; Friis-Møller, N.; Reiss, P.; Weller, I.; Lundgren, J.D. **Implementing the Number Needed to Harm in Clinical Practice: Risk of Myocardial Infarction in HIV-1-Infected Patients Treated with Abacavir.** *HIV Med* **2010**, *11*, 200-208.
- 188.** Rotger, M.; Glass, T.R.; Junier, T.; Lundgren, J.; Neaton, J.D.; Poloni, E.S.; van 't Wout, A.B.; Lubomirov, R.; Colombo, S.; Martinez, R. *et al.* **Contribution of Genetic Background, Traditional Risk Factors, and HIV-Related Factors to Coronary Artery Disease Events in HIV-Positive Persons.** *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 112-121.
- 189.** Podzamczer, D.; Ferrer, E.; Sanchez, P.; Gatell, J.M.; Crespo, M.; Fisac, C.; Lonca, M.; Sanz, J.; Niubo, J.; Veloso, S. *et al.* **Less Lipoatrophy and Better Lipid Profile with Abacavir as Compared to Stavudine: 96-Week Results of a Randomized Study.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007**, *44*, 139-147.
- 190.** Moyle, G.J.; Sabin, C.A.; Cartledge, J.; Johnson, M.; Wilkins, E.; Churchill, D.; Hay, P.; Fakoya, A.; Murphy, M.; Scullard, G. *et al.* **A Randomized Comparative Trial of Tenofovir DF Or Abacavir as Replacement for a Thymidine Analogue in Persons with Lipoatrophy.** *AIDS* **2006**, *20*, 2043-2050.
- 191.** Jong, E.; Meijers, J.C.M.; van Gorp, E.C.M.; Spek, C.A.; Mulder, J.W. **Markers of Inflammation and Coagulation Indicate a Prothrombotic State in HIV-Infected Patients with Long-Term use of Antiretroviral Therapy with Or without Abacavir.** *AIDS Res Ther* **2010**, *7*, 9.
- 192.** Palella, F.J.; Gange, S.J.; Benning, L.; Jacobson, L.; Kaplan, R.C.; Landay, A.L.; Tracy, R.P.; Elion, R. **Inflammatory Biomarkers and Abacavir use in the Women's Interagency HIV Study and the Multicenter AIDS Cohort Study.** *AIDS* **2010**, *24*, 1657-1665.

193. Satchell, C.S.; O'Halloran, J.A.; Cotter, A.G.; Peace, A.J.; O'Connor, E.F.; Tedesco, A.F.; Feeney, E.R.; Lambert, J.S.; Sheehan, G.J.; Kenny, D. *et al.* **Increased Platelet Reactivity in HIV-1-Infected Patients Receiving Abacavir-Containing Antiretroviral Therapy.** *J Infect Dis* **2011**, *204*, 1202-1210.
194. Hammond, E.; McKinnon, E.; Mallal, S.; Nolan, D. **Longitudinal Evaluation of Cardiovascular Disease-Associated Biomarkers in Relation to Abacavir Therapy.** *AIDS* **2008**, *22*, 2540-2543.
195. Francisci, D.; Falcinelli, E.; Belfiori, B.; Petito, E.; Fierro, T.; Baldelli, F.; Gresele, P. **Impact of Tenofovir Versus Abacavir on HIV-Related Endothelial Dysfunction.** *AIDS Patient Care STDS* **2011**, *25*, 567-569.
196. Padilla, S.; Masiá, M.; García, N.; Jarrin, I.; Tormo, C.; Gutiérrez, F. **Early Changes in Inflammatory and Pro-Thrombotic Biomarkers in Patients Initiating Antiretroviral Therapy with Abacavir Or Tenofovir.** *BMC Infect Dis* **2011**, *11*, 40.
197. Patel, P.; Bush, T.; Overton, T.; Baker, J.; Hammer, J.; Kojic, E.; Conley, L.; Henry, K.; Brooks, J.T. **Effect of Abacavir on Acute Changes in Biomarkers Associated with Cardiovascular Dysfunction.** *Antivir Ther* **2012**, *17*, 755-761.
198. Wohl, D.A.; Arnoczy, G.; Fichtenbaum, C.J.; Campbell, T.; Taiwo, B.; Hicks, C.; McComsey, G.A.; Koletar, S.; Sax, P.; Tebas, P. *et al.* **Comparison of Cardiovascular Disease Risk Markers in HIV-Infected Patients Receiving Abacavir and Tenofovir: The Nucleoside Inflammation, Coagulation and Endothelial Function (NICE) Study.** *Antivir Ther* **2014**, *19*, 141-147.
199. Trevillyan, J.M.; Arthur, J.F.; Jing, J.; Andrews, R.K.; Gardiner, E.E.; Hoy, J.F. **Effects of Abacavir Administration on Structural and Functional Markers of Platelet Activation.** *AIDS* **2015**, *29*, 2309-2313.
200. Sinn, K.; Richardson, R.; Carr, A. **Lower Arterial Stiffness and Framingham Score After Switching Abacavir to Tenofovir in Men at High Cardiovascular Risk.** *AIDS* **2010**, *24*, 2403-2405.
201. McComsey, G.A.; Kitch, D.; Daar, E.S.; Tierney, C.; Jahed, N.C.; Melbourne, K.; Ha, B.; Brown, T.T.; Bloom, A.; Fedarko, N. *et al.* **Inflammation Markers After Randomization to Abacavir/Lamivudine Or Tenofovir/Emtricitabine with Efavirenz Or Atazanavir/Ritonavir.** *AIDS* **2012**, *26*, 1371-1385.
202. Papakonstantinou, V.D.; Chini, M.; Mangafas, N.; Stamatakis, G.M.; Tsogas, N.; Tsoupras, A.B.; Psarra, K.; Fragopoulou, E.; Antonopoulou, S.; Gargalianos, P. *et al.* **In Vivo Effect of Two First-Line ART Regimens on Inflammatory Mediators in Male HIV Patients.** *Lipids Health Dis* **2014**, *13*, 90.

-
- 203.** Kumar, P.; DeJesus, E.; Huhn, G.; Sloan, L.; Small, C.B.; Edelstein, H.; Felizarta, F.; Hao, R.; Ross, L.; Stancil, B. *et al.* **Evaluation of Cardiovascular Biomarkers in a Randomized Trial of Fosamprenavir/Ritonavir Vs. Efavirenz with Abacavir/Lamivudine in Underrepresented, Antiretroviral-Naïve, HIV-Infected Patients (SUPPORT): 96-Week Results.** *BMC Infect Dis* **2013**, *13*, 269.
- 204.** Virgili, N.; Fisac, C.; Martínez, E.; Ribera, E.; Gatell, J.M.; Podzamczer, D. **Proinflammatory Cytokine Changes in Clinically Stable, Virologically Suppressed, HIV-Infected Patients Switching from Protease Inhibitors to Abacavir.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2009**, *50*, 552-553.
- 205.** Rasmussen, T.A.; Tolstrup, M.; Melchjorsen, J.; Frederiksen, C.A.; Nielsen, U.S.; Langdahl, B.L.; Østergaard, L.; Laursen, A.L. **Evaluation of Cardiovascular Biomarkers in HIV-Infected Patients Switching to Abacavir Or Tenofovir Based Therapy.** *BMC Infect Dis* **2011**, *11*, 267.
- 206.** Martínez, E.; Larrousse, M.; Podzamczer, D.; Pérez, I.; Gutiérrez, F.; Loncá, M.; Barragán, P.; Deulofeu, R.; Casamitjana, R.; Mallolas, J. *et al.* **Abacavir-Based Therapy does Not Affect Biological Mechanisms Associated with Cardiovascular Dysfunction.** *AIDS* **2010**, *24*, 1.
- 207.** Martin, A.; Amin, J.; Cooper, D.A.; Carr, A.; Kelleher, A.D.; Bloch, M.; Baker, D.; Woolley, I.; Emery, S. **Abacavir does Not Affect Circulating Levels of Inflammatory Or Coagulopathic Biomarkers in Suppressed HIV: A Randomized Clinical Trial.** *AIDS* **2010**, *24*, 2657-2663.
- 208.** Campo, R.; DeJesus, E.; Bredeek, U.F.; Henry, K.; Khanlou, H.; Logue, K.; Brinson, C.; Benson, P.; Dau, L.; Wang, H. *et al.* **SWIFT: Prospective 48-Week Study to Evaluate Efficacy and Safety of Switching to Emtricitabine/Tenofovir from Lamivudine/Abacavir in Virologically Suppressed HIV-1 Infected Patients on a Boosted Protease Inhibitor Containing Antiretroviral Regimen.** *Clin Infect Dis* **2013**, *56*, 1637-1645.
- 209.** Alvarez, A.; Orden, S.; Andújar, I.; Collado-Diaz, V.; Núñez-Delgado, S.; Galindo, M.J.; Estrada, V.; Apostolova, N.; Esplugues, J.V. **Cardiovascular Toxicity of Abacavir: A Clinical Controversy in Need of a Pharmacological Explanation.** *AIDS* **2017**, *31*, 1781-1795.
- 210.** Behrens, G.M.N.; Reiss, P. **Abacavir and Cardiovascular Risk.** *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2010**, *23*, 9-14.
- 211.** Falcinelli, E.; Francisci, D.; Belfiori, B.; Petito, E.; Guglielmini, G.; Malincarne, L.; Mezzasoma, A.; Sebastiano, M.; Conti, V.; Giannini, S. *et al.* **In Vivo Platelet Activation and Platelet Hyperreactivity in Abacavir-Treated HIV-Infected Patients.** *Thromb Haemost* **2013**, *110*, 349-357.

212. Baum, P.D.; Sullam, P.M.; Stoddart, C.A.; McCune, J.M. **Abacavir Increases Platelet Reactivity Via Competitive Inhibition of Soluble Guanylyl Cyclase.** *AIDS* **2011**, *25*, 2243-2248.
213. Muñoz, R.P.; González-Correa, J.A.; Ruiz, J.; Nuño, E.; Márquez, M.; Cruz, J.P.d.l.; Santos, J. **Whole Blood Platelet Aggregometry in HIV-Infected Patients on Treatment with Abacavir.** **2012**, *2012*.
214. Gresele, P.; Falcinelli, E.; Sebastiano, M.; Baldelli, F. **Endothelial and Platelet Function Alterations in HIV-Infected Patients.** *Thromb Res* **2012**, *129*, 301-308.
215. Alvarez, A.; Rios-Navarro, C.; Blanch-Ruiz, M.A.; Collado-Diaz, V.; Andujar, I.; Martinez-Cuesta, M.A.; Orden, S.; Esplugues, J.V. **Abacavir Induces Platelet-Endothelium Interactions by Interfering with Purinergic Signalling: A Step from Inflammation to Thrombosis.** *Antiviral Res* **2017**, *141*, 179-185.
216. Diallo, Y.L.; Ollivier, V.; Joly, V.; Faille, D.; Catalano, G.; Jandrot-Perrus, M.; Rauch, A.; Yeni, P.; Ajzenberg, N. **Abacavir has no Prothrombotic Effect on Platelets *in Vitro*.** *J Antimicrob Chemother* **2016**, *71*, 3506-3509.
217. Taylor, K.A.; Smyth, E.; Rauzi, F.; Cerrone, M.; Khawaja, A.A.; Gazzard, B.; Nelson, M.; Boffito, M.; Emerson, M. **Pharmacological Impact of Antiretroviral Therapy on Platelet Function to Investigate Human Immunodeficiency Virus-Associated Cardiovascular Risk.** *Br J Pharmacol* **2019**, *176*, 879-889.
218. 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*, 1259-1266.
219. De Pablo, C.; Orden, S.; Peris, J.E.; Barrachina, M.D.; 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*, 1448-1453.
220. Esplugues, J.V.; 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**, *30*, 1341-1351.
221. Collado-Díaz, V.; Martínez-Cuesta, M.Á.; Blanch-Ruiz, M.A.; Sánchez-López, A.; García-Martínez, P.; Peris, J.E.; Usach, I.; Ivorra, M.D.; Lacetera, A.; Martín-Santamaría, S. *et al.* **Abacavir Increases Purinergic P2X7 Receptor Activation by ATP: Does a Pro-Inflammatory Synergism Underlie its Cardiovascular Toxicity?** *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 613449.

-
- 222.** Hsue, P.Y.; Hunt, P.W.; Wu, Y.; Schnell, A.; Ho, J.E.; Hatano, H.; Xie, Y.; Martin, J.N.; Ganz, P.; Deeks, S.G. **Association of Abacavir and Impaired Endothelial Function in Treated and Suppressed HIV-Infected Patients.** *AIDS* **2009**, *23*, 2021-2027.
- 223.** Wang, X.; Chai, H.; Lin, P.H.; 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*, 771-781.
- 224.** Blanch-Ruiz, M.A.; Sánchez-López, A.; Ríos-Navarro, C.; Ortega-Luna, R.; Collado-Díaz, V.; Orden, S.; Martínez-Cuesta, M.A.; Esplugues, J.V.; Álvarez, Á. **Abacavir Causes Leukocyte/Platelet Crosstalk by Activating Neutrophil P2X7 Receptors thus Releasing Soluble Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1.** *Br J Pharmacol* **2022**.
- 225.** Collado-Díaz, V.; Andujar, I.; Sanchez-Lopez, A.; Orden, S.; Blanch-Ruiz, M.A.; Martínez-Cuesta, M.A.; Blas-García, A.; Esplugues, J.V.; Álvarez, Á. **Abacavir Induces Arterial Thrombosis in a Murine Model.** *J Infect Dis* **2018**, *218*, 228-233.
- 226.** Jaffe, E.A.; Nachman, R.L.; Becker, C.G.; Minick, C.R. **Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria.** *J Clin Invest* **1973**, *52*, 2745-2756.
- 227.** Orden, S.; De Pablo, C.; Rios-Navarro, C.; Martínez-Cuesta, M.A.; Peris, J.E.; Barrachina, M.D.; Esplugues, J.V.; Alvarez, A. **Efavirenz Induces Interactions between Leucocytes and Endothelium through the Activation of Mac-1 and gp150,95.** *J Antimicrob Chemother* **2014**, *69*, 995-1004.
- 228.** Goetz, D.J.; Greif, D.M.; Shen, J.; Luscinskas, F.W. **Cell-Cell Adhesive Interactions in an *in Vitro* Flow Chamber.** *Methods Mol Biol* **1999**, *96*, 137-145.
- 229.** Cai, Y.H.; Alvarez, A.; Alcaide, P.; Duramad, P.; Lim, Y.; Jarolim, P.; Lowe, J.B.; Luscinskas, F.W.; Lichtman, A.H. **Abrogation of Functional Selectin-Ligand Expression Reduces Migration of Pathogenic CD8+ T Cells into Heart.** *J Immunol* **2006**, *176*, 6568-6575.
- 230.** Kasinrerk, W. **A Flow Cytometric Method for Enumeration of Lymphocyte Sub-Populations in Sample Containing Lysis-Resistant Red Blood Cells.** *Immunol Lett* **2003**, *86*, 259-264.
- 231.** Park, J.H.; Choi, J.; Jo, C.; Koh, Y.H. **Involvement of ADAM10 in Acrolein-Induced Astrocytic Inflammation.** *Toxicology letters* **2020**, *318*, 44-49.

- 232.** Uchibori, T.; Matsuda, K.; Shimodaira, T.; Sugano, M.; Uehara, T.; Honda, T. **IL-6 Trans-Signaling is another Pathway to Upregulate Osteopontin.** *Cytokine* **2017**, *90*, 88-95.
- 233.** Rigg, R.A.; Healy, L.D.; Nowak, M.S.; Mallet, J.; Thierheimer, M.L.D.; Pang, J.; McCarty, O.J.T.; Aslan, J.E. **Heat Shock Protein 70 Regulates Platelet Integrin Activation, Granule Secretion and Aggregation.** *Am J Physiol Cell Physiol* **2016**, *310*, C568-C575.
- 234.** Hiasa, M.; Togawa, N.; Miyaji, T.; Omote, H.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y. **Essential Role of Vesicular Nucleotide Transporter in Vesicular Storage and Release of Nucleotides in Platelets.** *Physiol Rep* **2014**, *2*.
- 235.** Orme, J.J.; Jazieh, K.A.; Xie, T.; Harrington, S.; Liu, X.; Ball, M.; Madden, B.; Charlesworth, M.C.; Azam, T.U.; Lucien, F. *et al.* **ADAM10 and ADAM17 Cleave PD-L1 to Mediate PD-(L)1 Inhibitor Resistance.** *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1744980.
- 236.** Pioch, J.; Blomgran, R. **Optimized Flow Cytometry Protocol for Dihydrorhodamine 123-Based Detection of Reactive Oxygen Species in Leukocyte Subpopulations in Whole Blood.** *J Immunol Methods* **2022**, *507*, 113308.
- 237.** Rat, P.; Olivier, E.; Tanter, C.; Wakx, A.; Dutot, M. **A Fast and Reproducible Cell- and 96-Well Plate-Based Method for the Evaluation of P2X7 Receptor Activation using YO-PRO-1 Fluorescent Dye.** *J Biol Methods* **2017**, *4*, e64.
- 238.** Sotillo, J.; Valero, L.; Sánchez Del Pino, M.M.; Fried, B.; Esteban, J.G.; Marcilla, A.; Toledo, R. **Identification of Antigenic Proteins from Echinostoma Caproni (Trematoda) Recognized by Mouse Immunoglobulins M, A and G using an Immunoproteomic Approach.** *Parasite Immunol* **2008**, *30*, 271-279.
- 239.** Sherman, B.T.; Hao, M.; Qiu, J.; Jiao, X.; Baseler, M.W.; Lane, H.C.; Imamichi, T.; Chang, W. **DAVID: A Web Server for Functional Enrichment Analysis and Functional Annotation of Gene Lists (2021 update).** *Nucleic Acids Res* **2022**, *50*, 216.
- 240.** Huang, D.W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. **Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists using DAVID Bioinformatics Resources.** *Nat Protoc* **2009**, *4*, 44-57.
- 241.** Rada, B. **Neutrophil Extracellular Traps.** *Methods Mol Biol* **2019**, *1982*, 517-528.
- 242.** Li, W.; Nieman, M.; Sen Gupta, A. **Ferric Chloride-Induced Murine Thrombosis Models.** *J Vis Exp* **2016**, 54479.

-
- 243.** Subramaniam, S.; Kanse, S.M. **Ferric Chloride-Induced Arterial Thrombosis in Mice.** *Curr Protoc Mouse Biol* **2014**, *4*, 151-164.
- 244.** Westrick, R.J.; Winn, M.E.; Eitzman, D.T. **Murine Models of Vascular Thrombosis (Eitzman Series).** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27*, 2079-2093.
- 245.** Eckly, A.; Hechler, B.; Freund, M.; Zerr, M.; Cazenave, J.-.; Lanza, F.; Mangin, P.H.; Gachet, C. **Mechanisms Underlying FeCl₃-Induced Arterial Thrombosis.** *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 779-789.
- 246.** Hechler, B.; Magnenat, S.; Zighetti, M.L.; Kassack, M.U.; Ullmann, H.; Cazenave, J.; Evans, R.; Cattaneo, M.; Gachet, C. **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*, 232-243.
- 247.** Zhang, P.; Liu, M.; Cheng, L.; Liang, M.; Ji, H.; Fu, J. **Blockade of LOX-1 Prevents Endotoxin-Induced Acute Lung Inflammation and Injury in Mice.** *J Innate Immun* **2009**, *1*, 358-365.
- 248.** Tamura, K.; Miyato, H.; Kanamaru, R.; Sadatomo, A.; Takahashi, K.; Ohzawa, H.; Koyanagi, T.; Saga, Y.; Takei, Y.; Fujiwara, H. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Reduce the Diffusion of Doxorubicin which may Attenuate its Ability to Induce Apoptosis of Ovarian Cancer Cells.** *Heliyon* **2022**, *8*, e09730.
- 249.** Nair, A.B.; Jacob, S. **A Simple Practice Guide for Dose Conversion between Animals and Human.** *J Basic Clin Pharm* **2016**, *7*, 27-31.
- 250.** Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. **Dose Translation from Animal to Human Studies Revisited.** *FASEB J* **2008**, *22*, 659-661.
- 251.** Wang, L.; Wu, D.; Robinson, C.V.; Wu, H.; Fu, T. **Structures of a Complete Human V-ATPase Reveal Mechanisms of its Assembly.** *Mol Cell* **2020**, *80*, 501-511.e3.
- 252.** Vasanthakumar, T.; Rubinstein, J.L. **Structure and Roles of V-Type ATPases.** *Trends Biochem Sci* **2020**, *45*, 295-307.
- 253.** Lock, J.G.; Stow, J.L. **Rab11 in Recycling Endosomes Regulates the Sorting and Basolateral Transport of E-Cadherin.** *Mol Biol Cell* **2005**, *16*, 1744-1755.
- 254.** Ballabio, E.; Mariotti, M.; De Benedictis, L.; Maier, J.a.M. **The Dual Role of Endothelial Differentiation-Related Factor-1 in the Cytosol and Nucleus: Modulation by Protein Kinase A.** *Cell Mol Life Sci* **2004**, *61*, 1069-1074.

255. Jacob, J.T.; Coulombe, P.A.; Kwan, R.; Omary, M.B. **Types I and II Keratin Intermediate Filaments.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2018**, *10*, a018275.
256. Kaneko, T.; Hamazaki, J.; Iemura, S.; Sasaki, K.; Furuyama, K.; Natsume, T.; Tanaka, K.; Murata, S. **Assembly Pathway of the Mammalian Proteasome Base Subcomplex is Mediated by Multiple Specific Chaperones.** *Cell* **2009**, *137*, 914-925.
257. Kannemeier, C.; Shibamiya, A.; Nakazawa, F.; Trusheim, H.; Ruppert, C.; Markart, P.; Song, Y.; Tzima, E.; Kennerknecht, E.; Niepmann, M. *et al.* **Extracellular RNA Constitutes a Natural Procoagulant Cofactor in Blood Coagulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 6388-6393.
258. Vu, T.T.; Leslie, B.A.; Stafford, A.R.; Zhou, J.; Fredenburgh, J.C.; Weitz, J.I. **Histidine-Rich Glycoprotein Binds DNA and RNA and Attenuates their Capacity to Activate the Intrinsic Coagulation Pathway.** *Thromb Haemost* **2016**, *115*, 89-98.
259. Gould, T.J.; Vu, T.T.; Stafford, A.R.; Dwivedi, D.J.; Kim, P.Y.; Fox-Robichaud, A.E.; Weitz, J.I.; Liaw, P.C. **Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2015**, *35*, 2544-2553.
260. Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Taylor, F.B.; Esmon, N.L.; Lupu, F.; Esmon, C.T. **Extracellular Histones are Major Mediators of Death in Sepsis.** *Nat Med* **2009**, *15*, 1318-1321.
261. Yang, X.; Li, L.; Liu, J.; Lv, B.; Chen, F. **Extracellular Histones Induce Tissue Factor Expression in Vascular Endothelial Cells Via TLR and Activation of NF- κ B and AP-1.** *Thromb Res* **2016**, *137*, 211-218.
262. Gould, T.J.; Lysov, Z.; Swystun, L.L.; Dwivedi, D.J.; Zarychanski, R.; Fox-Robichaud, A.E.; Liaw, P.C. **Extracellular Histones Increase Tissue Factor Activity and Enhance Thrombin Generation by Human Blood Monocytes.** *Shock* **2016**, *46*, 655-662.
263. Müller, F.; Mutch, N.J.; Schenk, W.A.; Smith, S.A.; Esterl, L.; Spronk, H.M.; Schmidbauer, S.; Gahl, W.A.; Morrissey, J.H.; Renné, T. **Platelet Polyphosphates are Proinflammatory and Procoagulant Mediators *in Vivo*.** *Cell* **2009**, *139*, 1143-1156.
264. Semeraro, F.; Ammollo, C.T.; Morrissey, J.H.; Dale, G.L.; Friese, P.; Esmon, N.L.; Esmon, C.T. **Extracellular Histones Promote Thrombin Generation through Platelet-Dependent Mechanisms: Involvement of Platelet TLR2 and TLR4.** *Blood* **2011**, *118*, 1952-1961.
265. Fuchs, T.A.; Bhandari, A.A.; Wagner, D.D. **Histones Induce Rapid and Profound Thrombocytopenia in Mice.** *Blood* **2011**, *118*, 3708-3714.

-
- 266.** Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Xu, J.; Esmon, N.L.; Esmon, C.T. **Extracellular Histones Increase Plasma Thrombin Generation by Impairing Thrombomodulin-Dependent Protein C Activation.** *J Thromb Haemost* **2011**, *9*, 1795-1803.
- 267.** Geddings, J.E.; Mackman, N. **New Players in Haemostasis and Thrombosis.** *Thrombosis and haemostasis* **2014**, *111*, 570-574.
- 268.** Seif, K.; Alidzanovic, L.; Tischler, B.; Ibrahim, N.; Zagrapan, B.; Rauscher, S.; Salzmann, M.; Hell, L.; Mauracher, L.; Budde, U. *et al.* **Neutrophil-Mediated Proteolysis of Thrombospondin-1 Promotes Platelet Adhesion and String Formation.** *Thromb Haemost* **2018**, *118*, 2074-2085.
- 269.** Elaskalani, O.; Abdol Razak, N.B.; Metharom, P. **Neutrophil Extracellular Traps Induce Aggregation of Washed Human Platelets Independently of Extracellular DNA and Histones.** *Cell communication and signaling* **2018**, *16*, 24.
- 270.** Sorvillo, N.; Mizurini, D.; Coxon, C.; Martinod, K.; Tilwawala, R.; Cherpokova, D.; Salinger, A.; Seward, R.; Staudinger, C.; Weerapana, E. *et al.* **Plasma Peptidylarginine Deiminase IV Promotes VWF-Platelet String Formation and Accelerates Thrombosis After Vessel Injury.** *Circulation research* **2019**, *125*, 507-519.
- 271.** Dong, J.; Moake, J.L.; Nolasco, L.; Bernardo, A.; Arceneaux, W.; Shrimpton, C.N.; Schade, A.J.; McIntire, L.V.; Fujikawa, K.; López, J.A. **ADAMTS-13 Rapidly Cleaves Newly Secreted Ultralarge Von Willebrand Factor Multimers on the Endothelial Surface Under Flowing Conditions.** *Blood* **2002**, *100*, 4033-4039.
- 272.** Sundén-Cullberg, J.; Norrby-Teglund, A.; Rouhiainen, A.; Rauvala, H.; Herman, G.; Tracey, K.J.; Lee, M.L.; Andersson, J.; Tokics, L.; Treutiger, C.J. **Persistent Elevation of High Mobility Group Box-1 Protein (HMGB1) in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock.** *Crit Care Med* **2005**, *33*, 564-573.
- 273.** Stark, K.; Philippi, V.; Stockhausen, S.; Busse, J.; Antonelli, A.; Miller, M.; Schubert, I.; Hoseinpour, P.; Chandraratne, S.; Von Brühl, M. *et al.* **Disulfide HMGB1 Derived from Platelets Coordinates Venous Thrombosis in Mice.**
- 274.** Maugeri, N.; Campana, L.; Gavina, M.; Covino, C.; De Metrio, M.; Panciroli, C.; Maiuri, L.; Maseri, A.; D'Angelo, A.; Bianchi, M.E. *et al.* **Activated Platelets Present High Mobility Group Box 1 to Neutrophils, Inducing Autophagy and Promoting the Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps.** *J Thromb Haemost* **2014**, *12*, 2074-2088.

275. Dyer, M.R.; Chen, Q.; Haldeman, S.; Yazdani, H.; Hoffman, R.; Loughran, P.; Tsung, A.; Zuckerbraun, B.S.; Simmons, R.L.; Neal, M.D. **Deep Vein Thrombosis in Mice is Regulated by Platelet HMGB1 through Release of Neutrophil-Extracellular Traps and DNA.** *Sci Rep* **2018**, *8*, 2068.
276. Tadie, J.; Bae, H.; Jiang, S.; Park, D.W.; Bell, C.P.; Yang, H.; Pittet, J.; Tracey, K.; Thannickal, V.J.; Abraham, E. *et al.* **HMGB1 Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation through Interactions with Toll-Like Receptor 4.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2013**, *304*, 342.
277. Cui, M.; Fan, M.; Jing, R.; Wang, H.; Qin, J.; Sheng, H.; Wang, Y.; Wu, X.; Zhang, L.; Zhu, J. *et al.* **Cell-Free Circulating DNA: A New Biomarker for the Acute Coronary Syndrome.** *Cardiology* **2013**, *124*, 76-84.
278. Helseth, R.; Solheim, S.; Arnesen, H.; Seljeflot, I.; Opstad, T.B. **The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute Myocardial Infarction Or Stable Angina Pectoris.** *Mediators Inflamm* **2016**, *2016*, 2182358.
279. Mangold, A.; Alias, S.; Scherz, T.; Hofbauer, T.; Jakowitsch, J.; Panzenböck, A.; Simon, D.; Laimer, D.; Bangert, C.; Kammerlander, A. *et al.* **Coronary Neutrophil Extracellular Trap Burden and Deoxyribonuclease Activity in ST-Elevation Acute Coronary Syndrome are Predictors of ST-Segment Resolution and Infarct Size.** *Circ Res* **2015**, *116*, 1182-1192.
280. Hofbauer, T.M.; Mangold, A.; Scherz, T.; Seidl, V.; Panzenböck, A.; Ondracek, A.S.; Müller, J.; Schneider, M.; Binder, T.; Hell, L. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps and Fibrocytes in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction.** *Basic Res Cardiol* **2019**, *114*, 33.
281. Mangold, A.; Hofbauer, T.M.; Ondracek, A.S.; Artner, T.; Scherz, T.; Speidl, W.S.; Krychtiuk, K.A.; Sadushi-Kolici, R.; Jakowitsch, J.; Lang, I.M. **Neutrophil Extracellular Traps and Monocyte Subsets at the Culprit Lesion Site of Myocardial Infarction Patients.** *Sci Rep* **2019**, *9*, 16304.
282. Liberale, L.; Holy, E.W.; Akhmedov, A.; Bonetti, N.R.; Nietlispach, F.; Matter, C.M.; Mach, F.; Montecucco, F.; Beer, J.H.; Paneni, F. *et al.* **Interleukin-1 β Mediates Arterial Thrombus Formation Via NET-Associated Tissue Factor.** *J Clin Med* **2019**, *8*.
283. Novotny, J.; Chandraratne, S.; Weinberger, T.; Philippi, V.; Stark, K.; Ehrlich, A.; Pircher, J.; Konrad, I.; Oberdieck, P.; Titova, A. *et al.* **Histological Comparison of Arterial Thrombi in Mice and Men and the Influence of Cl-Amidine on Thrombus Formation.** *PLoS One* **2018**, *13*, e0190728.

-
- 284.** de Boer, O.J.; Li, X.; Teeling, P.; Mackaay, C.; Ploegmakers, H.J.; van der Loos, C.M.; Daemen, M.J.; de Winter, R.J.; van der Wal, A.C. **Neutrophils, Neutrophil Extracellular Traps and Interleukin-17 Associate with the Organisation of Thrombi in Acute Myocardial Infarction.** *Thrombosis and haemostasis* **2013**, *109*, 290-297.
- 285.** Borissoff, J.I.; Joosen, I.A.; Versteyleen, M.O.; Brill, A.; Fuchs, T.A.; Savchenko, A.S.; Gallant, M.; Martinod, K.; Ten Cate, H.; Hofstra, L. *et al.* **Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin are Independently Associated with Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2013**, *33*, 2032-2040.
- 286.** Langseth, M.S.; Opstad, T.B.; Bratseth, V.; Solheim, S.; Arnesen, H.; Pettersen, A.Å.; Seljeflot, I.; Helseth, R. **Markers of Neutrophil Extracellular Traps are Associated with Adverse Clinical Outcome in Stable Coronary Artery Disease.** *Eur J Prev Cardiol* **2018**, *25*, 762-769.
- 287.** Sharma, S.; Hofbauer, T.M.; Ondracek, A.S.; Chausheva, S.; Alimohammadi, A.; Artner, T.; Panzenböck, A.; Rinderer, J.; Shafran, I.H.; Mangold, A. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps Promote Fibrous Vascular Occlusions in Chronic Thrombosis.** *Blood* **2020**.
- 288.** Vallés, J.; Lago, A.; Santos, M.T.; Latorre, A.M.; Tembl, J.I.; Salom, J.B.; Nieves, C.; Moscardó, A. **Neutrophil Extracellular Traps are Increased in Patients with Acute Ischemic Stroke: Prognostic Significance.** *Thromb Haemost* **2017**, *117*, 1919-1929.
- 289.** Lozano, M.L.; Garabet, L.; Fernandez-Perez, M.P.; De Los Reyes-García, A.M.; Diaz-Lozano, P.; Garcia-Barbera, N.; Aguila, S.; Vicente, V.; Ghanima, W.; Martinez, C. *et al.* **Platelet Activation and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in Immune Thrombocytopenia: Is there an Association?** *Platelets* **2020**, *31*, 906-912.
- 290.** Jiménez-Alcázar, M.; Limacher, A.; Panda, R.; Méan, M.; Bitterling, J.; Peine, S.; Renné, T.; Beer, J.H.; Aujesky, D.; Lämmle, B. *et al.* **Circulating Extracellular DNA is an Independent Predictor of Mortality in Elderly Patients with Venous Thromboembolism.** *PLoS One* **2018**, *13*, e0191150.
- 291.** Laridan, E.; Denorme, F.; Desender, L.; François, O.O.; Andersson, T.T.; Deckmyn, H.; Vanhoorelbeke, K.; De Meyer, S.F. **Neutrophil Extracellular Traps in Ischemic Stroke Thrombi.** *Ann Neurol*. **2017**, *82*, 223.
- 292.** Tripodi, A.; Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Colucci, M.; Malchiodi, E.; Verrua, E.; Ferrante, E.; Arnaldi, G.; Trementino, L.; Padovan, L. *et al.* **Hypercoagulability in Patients with Cushing Disease Detected by Thrombin Generation Assay is Associated with Increased Levels of Neutrophil Extracellular Trap-Related Factors.** *Endocrine* **2016**, *56*, 298.

293. Le Joncour, A.; Martos, R.; Loyau, S.; Lelay, N.; Dossier, A.; Cazes, A.; Fouret, P.; Domont, F.; Papo, T.; Jandrot-Perrus, M. *et al.* **Critical Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Patients with Behcet's Disease.** *Ann Rheum Dis* **2019**, *78*, 1274.
294. Li, J.; Tong, D.; Wang, Y.; Liu, Y.; Zhang, X.; Liu, N.; Wang, S.; Xu, Y.; Li, Y.; Yin, X. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps Enhance Procoagulant Activity in Patients with Essential Hypertension.** *J Thromb Haemost* **2020**.
295. Diaz, J.A., MD; Fuchs, T.A., PhD; Jackson, T.O., BA; Kremer Hovinga, J.A., MD; Lämmle, B., MD; Henke, P.K., MD; Myers, Daniel D., DVM, MPH; Wagner, D.D., PhD; Wakefield, T.W., MD. **Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis.** *Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders (New York, NY)* **2013**, *1*, 341-348.e1.
296. Demers, M.; Krause, D.S.; Schatzberg, D.; Martinod, K.; Voorhees, J.R.; Fuchs, T.A.; Scadden, D.T.; Wagner, D.D. **Cancers Predispose Neutrophils to Release Extracellular DNA Traps that Contribute to Cancer-Associated Thrombosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 13076-13081.
297. Hemmat, N.; Derakhshani, A.; Bannazadeh Baghi, H.; Silvestris, N.; Baradaran, B.; De Summa, S. **Neutrophils, Crucial, Or Harmful Immune Cells Involved in Coronavirus Infection: A Bioinformatics Study.** *Front. Genet.* **2020**, *0*.
298. Blanch-Ruiz, M.A.; Ortega-Luna, R.; Gómez-García, G.; Martínez-Cuesta, M.Á.; Álvarez, Á. **Role of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 Progression: An Insight for Effective Treatment.** *Biomedicines* **2021**, *10*.
299. Middleton, E.A.; He, X.; Denorme, F.; Campbell, R.A.; Ng, D.; Salvatore, S.P.; Mostyka, M.; Baxter-Stoltzfus, A.; Borczuk, A.C.; Loda, M. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Immunothrombosis in COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome.** *Blood* **2020**, *136*, 1169-1179.
300. Ng, H.; Havervall, S.; Rosell, A.; Aguilera, K.; Parv, K.; von Meijenfeldt, F.A.; Lisman, T.; Mackman, N.; Thålin, C.; Phillipson, M. **Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps are of Prognostic Value in Patients with COVID-19.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2021**, *41*, 988-994.
301. Zuo, Y.; Yalavarthi, S.; Shi, H.; Gockman, K.; Zuo, M.; Madison, J.A.; Blair, C.; Weber, A.; Barnes, B.J.; Egeblad, M. *et al.* **Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19.** *JCI Insight* **2020**, *5*.
302. Petito, E.; Falcinelli, E.; Paliani, U.; Cesari, E.; Vaudo, G.; Sebastiano, M.; Cerotto, V.; Guglielmini, G.; Gori, F.; Malvestiti, M. *et al.* **Neutrophil More than Platelet Activation Associates with Thrombotic Complications in COVID-19 Patients.** *J Infect Dis* **2020**.

-
303. Guéant, J.; Guéant-Rodriguez, R.; Fromonot, J.; Oussalah, A.; Louis, H.; Chery, C.; Gette, M.; Gleye, S.; Callet, J.; Raso, J. *et al.* **Elastase and Exacerbation of Neutrophil Innate Immunity are Involved in Multi-Visceral Manifestations of COVID-19.** *Allergy* **2021**, *76*, 1846-1858.
304. Godement, M.; Zhu, J.; Cerf, C.; Vieillard-Baron, A.; Maillon, A.; Zuber, B.; Bardet, V.; Geri, G. **Neutrophil Extracellular Traps in SARS-CoV2 Related Pneumonia in ICU Patients: The NETCOV2 Study.** *Front Med (Lausanne)* **2021**, *8*, 615984.
305. Lang, S.; Mary-Krause, M.; Cotte, L.; Gilquin, J.; Partisani, M.; Simon, A.; Boccarda, F.; Bingham, A.; Costagliola, D. **Increased Risk of Myocardial Infarction in HIV-Infected Patients in France, Relative to the General Population.** *AIDS* **2010**, *24*, 1228-1230.
306. Obel, N.; Farkas, D.K.; Kronborg, G.; Larsen, C.S.; Pedersen, G.; Riis, A.; Pedersen, C.; Gerstoft, J.; Sørensen, H.T. **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*, 130-136.
307. Martin, A.; Bloch, M.; Amin, J.; Baker, D.; Cooper, D.A.; Emery, S.; Carr, A. **Simplification of Antiretroviral Therapy with Tenofovir-Emtricitabine Or Abacavir-Lamivudine: A Randomized, 96-Week Trial.** *Clin Infect Dis* **2009**, *49*, 1591-1601.
308. Durand, M.; Sheehy, O.; Baril, J.; Lelorier, J.; Tremblay, C.L. **Association between HIV Infection, Antiretroviral Therapy, and Risk of Acute Myocardial Infarction: A Cohort and Nested Case-Control Study using Québec's Public Health Insurance Database.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2011**, *57*, 245-253.
309. Young, J.; Xiao, Y.; Moodie, E.E.M.; Abrahamowicz, M.; Klein, M.B.; Bernasconi, E.; Schmid, P.; Calmy, A.; Cavassini, M.; Cusini, A. *et al.* **Effect of Cumulating Exposure to Abacavir on the Risk of Cardiovascular Disease Events in Patients from the Swiss HIV Cohort Study.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2015**, *69*, 413-421.
310. Marcus, J.L.; Neugebauer, R.S.; Leyden, W.A.; Chao, C.R.; Xu, L.; Quesenberry, C.P.; Klein, D.B.; Towner, W.J.; Horberg, M.A.; Silverberg, M.J. **Use of Abacavir and Risk of Cardiovascular Disease among HIV-Infected Individuals.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2016**, *71*, 413-419.
311. Choi, A.I.; Vittinghoff, E.; Deeks, S.G.; Weekley, C.C.; Li, Y.; Shlipak, M.G. **Cardiovascular Risks Associated with Abacavir and Tenofovir Exposure in HIV-Infected Persons.** *AIDS* **2011**, *25*, 1289-1298.

- 312.** Cutrell, A.; Brothers, C.; Yeo, J.; Hernandez, J.; Lapierre, D. **Abacavir and the Potential Risk of Myocardial Infarction.** *Lancet* **2008**, *371*, 1413.
- 313.** De Pablo, C.; Orden, S.; Calatayud, S.; Martí-Cabrera, M.; Esplugues, J.V.; Alvarez, A. **Differential Effects of Tenofovir/Emtricitabine and Abacavir/Lamivudine on Human Leukocyte Recruitment.** *Antivir Ther* **2012**, *17*, 1615-1619.
- 314.** Hirahashi, J.; Hishikawa, K.; Kaname, S.; Tsuboi, N.; Wang, Y.; Simon, D.I.; Stavrakis, G.; Shimosawa, T.; Xiao, L.; Nagahama, Y. *et al.* **Mac-1 (CD11b/CD18) is a Critical Molecular Link between Inflammation and Thrombosis Following Glomerular Injury¹.** *Circulation* **2009**, *120*, 1255-1265.
- 315.** Wang, Y.; Gao, H.; Shi, C.; Erhardt, P.W.; Pavlovsky, A.; A. Soloviev, D.; Bledzka, K.; Ustinov, V.; Zhu, L.; Qin, J. *et al.* **Leukocyte Integrin Mac-1 Regulates Thrombosis Via Interaction with Platelet GPIIb.** *Nat Commun* **2017**, *8*, 15559.
- 316.** Khawaja, A.A.; Taylor, K.A.; Lovell, A.O.; Nelson, M.; Gazzard, B.; Boffito, M.; Emerson, M. **HIV Antivirals Affect Endothelial Activation and Endothelial-Platelet Crosstalk.** *Circ Res* **2020**, *127*, 1365-1380.
- 317.** Melchjorsen, J.; Risør, M.W.; Søgaaard, O.S.; O'Loughlin, K.L.; Chow, S.; Paludan, S.R.; Ellermann-Eriksen, S.; Hedley, D.W.; Minderman, H.; Østergaard, L. *et al.* **Tenofovir Selectively Regulates Production of Inflammatory Cytokines and Shifts the IL-12/IL-10 Balance in Human Primary Cells.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **2011**, *57*, 265-275.
- 318.** Barreto, J.; Karathanasis, S.K.; Remaley, A.; Sposito, A.C. **Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor: Mechanistic Insight and Potential Clinical Use.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2021**, *41*, 153-166.
- 319.** Mentrup, T.; Cabrera-Cabrera, F.; Schröder, B. **Proteolytic Regulation of the Lectin-Like Oxidized Lipoprotein Receptor LOX-1.** *Front Cardiovasc Med* **2020**, *7*, 594441.
- 320.** Akhmedov, A.; Sawamura, T.; Chen, C.; Kraler, S.; Vdovenko, D.; Lüscher, T.F. **Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1): A Crucial Driver of Atherosclerotic Cardiovascular Disease.** *Eur Heart J* **2021**, *42*, 1797-1807.
- 321.** Lalo, U.; Jones, S.; Roberts, J.A.; Mahaut-Smith, M.P.; Evans, R.J. **Heat Shock Protein 90 Inhibitors Reduce Trafficking of ATP-Gated P2X1 Receptors and Human Platelet Responsiveness.** *J Biol Chem* **2012**, *287*, 32747-32754.

-
- 322.** Mahaut-Smith, M.P.; Jones, S.; Evans, R.J. **The P2X1 Receptor and Platelet Function.** *Purinergic Signal* **2011**, *7*, 341-356.
- 323.** Rothmeier, A.S.; Marchese, P.; Petrich, B.G.; Furlan-Freguia, C.; Ginsberg, M.H.; Ruggeri, Z.M.; Ruf, W. **Caspase-1-Mediated Pathway Promotes Generation of Thromboinflammatory Microparticles.** *J Clin Invest* **2015**, *125*, 1471-1484.
- 324.** Müller, C.E.; Baqi, Y.; Namasivayam, V. **Agonists and Antagonists for Purinergic Receptors.** *Methods Mol Biol* **2020**, *2041*, 45-64.

VIII. ANEXO I: CERTIFICADOS



Hospital Clínic Universitari



INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Don Julio Palmero da Cruz, Secretario Técnico del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínic Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de comisión ordinaria (Acta nº367), de fecha 25 de marzo de 2021, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

Nº DE ORDEN: 2021/038

TÍTULO: Receptores P2X7 y respuesta inflamatoria vascular: desde la evidencia obtenida con Abacavir hasta la caracterización de nuevos mediadores protrombóticos

PROTOCOLO: versión 1 de fecha 7 de febrero de 2021

HIP/CI centro de transfusiones: versión 2 de fecha 10 de marzo de 2021

HIP/CI cordones umbilicales: versión 2 de fecha 10 de marzo de 2021

HIP/CI muestras sangre pacientes VIH: versión 3 de fecha 29 de marzo de 2021

PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN: Proyectos I +D generación de conocimiento y proyectos I+D+I retos investigación

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia por el Dr. Juan Vicente Esplugues Mota y la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 30 de marzo de 2021

Fdo. Don Julio Palmero da Cruz

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:

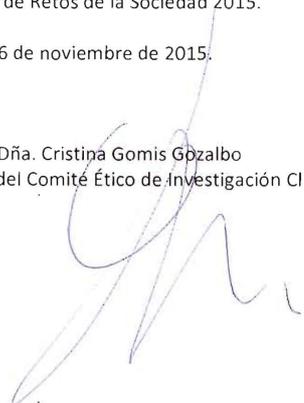
Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito/endotelio/plaqueta

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, Somerset 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



M^º Dolores Simó Piera, 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

The image shows a handwritten signature in blue ink to the left of a circular official stamp. The stamp is blue and contains the text 'COMITÉ DE BIOSEGURIDAD' at the top, 'UNIVERSITAT DE VALÈNCIA' at the bottom, and a central emblem featuring a book and a lamp.

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.

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**

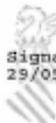
Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

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



Kelly Sheehan-Rooney | EMBO | Meyerhofstr. 1 | 69117 Heidelberg | Germany

Ms. Maria Amparo Blanch Ruiz
Universidad de Valencia
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Farmacología
46010 Valencia
Spain

FELLOWSHIP PROGRAMME

Dr. Kelly Sheehan-Rooney
Head, Fellowship Programme

phone +49-6221-8891-122
fax +49-6221-8891-215

fellowships@embo.org

9 February 2023

Certificate for EMBO Scientific Exchange Grant Number 9546

To whom it may concern,

The purpose of this document is to certify that Ms. Maria Amparo Blanch Ruiz has received an EMBO Scientific Exchange Grant (number 9546) to conduct research in the lab of Prof. Cornelia Halin (Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zurich, Wolfgang-Paulistr. 10, HCI G490, CH-8093 Zurich, Switzerland). The topic of the research project is "Investigating the functional relevance of neutrophil extracellular traps on neutrophil entry into lymph nodes and their effects on adaptive immune response."

The fellowship started on 2 May 2022, and EMBO funding was granted for a total period of 90 days.

If you need any further confirmation or information, please contact me.

Yours sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'K Sheehan-Rooney', with a stylized flourish at the end.

Kelly Sheehan-Rooney

