

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE CALCITRIOL FRENTE A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LAMIVUDINA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS”

LUGAR DE DESARROLLO
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

CAMILO IGNACIO ALARCÓN MARTÍNEZ

Unidad de investigación para optar al Título de Químico Farmacéutico

Director
Mario Navarro Márquez

Santiago de Chile
2025

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

"EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE CALCITRIOL FRENTE A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LAMIVUDINA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS"

CAMILO IGNACIO ALARCÓN MARTÍNEZ

COMISIÓN CORRECTORA:

Profesor (a) Corrector: Sebastián Fuentes Retamal

Profesor(a) Corrector: Paulina Rojas Domínguez

Santiago de Chile
2025

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

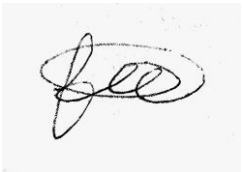
Se declara por este medio que el trabajo de titulación presentado para su defensa y evaluación es original; las fuentes, herramientas y aplicaciones utilizadas que contribuyeron a la investigación realizada están debidamente citadas en el texto y acreditadas en el apartado de las referencias, conforme con los requisitos que establece el estilo bibliográfico Vancouver y respetando los aspectos que conciernen a la propiedad intelectual.

Por lo tanto, ante cualquier falta de integridad académica encontrada y que atente contra la Ley N°17.336 de Propiedad Intelectual, se asume la responsabilidad que representa para tal efecto, dejando constancia de ello, con fecha 15 de Septiembre de 2025, en la ciudad de Santiago.

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

Título del trabajo: EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE CALCITRIOL FRENTE A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LAMIVUDINA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS



Camilo Alarcón

COMISIÓN CORRECTORA

Mario Navarro Márquez

Químico Farmacéutico, P. Universidad Católica de Chile.

Doctor en Farmacología, Universidad de Chile.

Sebastián Fuentes Retamal

Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

Doctor en Farmacología, Universidad de Chile.

Postdoctorado, Universidad de Chile.

Docente de Farmacología, Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello.

Paulina Rojas Domínguez

Licenciada en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Doctor en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Docente de Farmacología, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello.

Secretaria del Comité Ético Científico, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a la realización de este trabajo. Este logro no habría sido posible sin su apoyo.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional y por estar siempre conmigo desde el día que comencé mi carrera universitaria. Especialmente por parte de mis abuelas Silvia y Guillermina que han sido grandes ejemplos de esfuerzo, cariño y dedicación para mi vida.

A mi madre Sylvia Martínez, por ser un apoyo constante y soporte en mi vida, quien siempre confío en mis habilidades, me alentó a seguir adelante cuando sentí que todo estaba perdido.

A mis amigos, por ser una fuente constante de apoyo, soporte, confianza, cariño, empatía y comprensión, durante toda mi experiencia universitaria. Javiera, Isabel, David, Fernanda, Carolina, Cristian y Alexandra. Ahora todo cobra sentido, gracias a ustedes.

También quiero agradecer a mi director de trabajo, Doctor Mario Navarro, por su orientación, dedicación, cariño, paciencia y su disposición para ayudarme a cumplir con mi trabajo de investigación.

Por último, mi agradecimiento para el equipo del laboratorio de Abate Molina, profesores y estudiantes, sobre todo a Tamara Sáez, Pablo, Anaís, Isabel y la señora Marina por hacer un lugar más agradable para comenzar el día con ánimo y alegría.

TABLA DE CONTENIDOS

Pág.

Resumen …….. 1

Abstract …… 2

1. Introducción ……. 4

1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) …….. 5

1.2 Tratamiento Farmacológico del VIH …….. 7

1.3 INTR …… 8

1.3.1 Toxicidad muscular causada por INTR ……. 10

1.4 Lamivudina ……. 10

1.5 Calcitriol ……. 12

2. Hipótesis …….. 14

3. Objetivos …….. 16

3.1 Objetivo general …… 16

3.2 Objetivos específicos ……... 16

4. Metodología ……. 18

4.1 Cultivo celular C2C12 …….. 18

4.1.1 Condición de cultivo celular …….. 18

4.2 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT ……. 18

4.2.1 Preparación del reactivo MTT …….. 19

4.2.2 Preparación solución de lamivudina ……... 19

4.2.3 Incubación y estimulación de mioblastos C2C12 con

lamivudina …… 21

4.2.4 Ejecución del método MTT ……. 22

4.3 Preparación solución de lamivudina y calcitriol …… 23

4.3.1 Tinción de Giemsa …… 26

4.4 Análisis estadístico …… 26

5. Resultados …….. 28

5.1 Ensayo de viabilidad celular con 3TC …….. 29

5.2 Ensayo de viabilidad de 3TC con calcitriol ……. 30

5.2.1 Tinción de Giemsa en mioblastos C2C12 con calcitriol …… 33

6. Discusión ……. 35

6.1 Análisis del uso de lamivudina en mioblastos C2C12 …… 37

6.2 Implicaciones del uso de calcitriol en la prevención del daño celular en mioblastos C2C12 …… 39

7. Conclusiones …….. 40

8. Referencias bibliográficas ……. 42

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Nuevos casos confirmados de VIH en Chile según nacionalidad.	5
Tabla 2	Reacciones adversas de los INTR	9
Tabla 3	Solución de lamivudina en distintas concentraciones	20
Tabla 4	Control vehículo de las muestras de 3TC	21
Tabla 5	Solución de lamivudina con calcitriol	24
Tabla 6	Control vehículo de las muestras de calcitriol y 3TC	25

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Ciclo de replicación del VIH	6
Figura 2	Curso clínico de la infección por VIH	7
Figura 3	Estructura química Lamivudina (3TC)	11
Figura 4	Efecto de calcitriol en mioblastos C2C12 a los días 1,2 y 3 de proliferación celular	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Pág
Gráfico 1	Casos confirmados de infección por VIH en Chile desde el año 2013-2024	4
Gráfico 2	MTT en mioblastos C2C12 en presencia de 3TC a 24 horas	29
Gráfico 3	MTT en mioblastos C2C12 en presencia de 3TC a 72 horas	30
Gráfico 4	MTT en mioblastos C2C12 en presencia de Calcitriol 100 nM y 3TC a 72 horas	31
Gráfico 5	MTT en mioblastos C2C12 en presencia de Calcitriol 200 nM y 3TC a 72 horas	32
Gráfico 6	MTT en mioblastos C2C12 en presencia de Calcitriol 100 y 200 nM a 72 horas	33

RESUMEN

El VIH es una enfermedad crónica causada por un retrovirus que infecta los linfocitos T CD4+, lo que puede llevar a un estado de inmunodeficiencia si no se trata adecuadamente. La terapia de gran actividad antirretroviral (TARGA) ha mejorado significativamente la morbimortalidad asociada al VIH mediante la combinación de fármacos antirretrovirales, donde los inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa reversa (INTR) son la base de la terapia, siendo lamivudina uno de los INTR más usados. Aunque es considerada segura, se ha identificado que lamivudina puede causar como reacción adversa toxicidad muscular, al alterar la función mitocondrial en las células musculares, lo que disminuye la respiración celular y la producción de ATP, aumentando la formación de lactato. Esta disfunción mitocondrial genera un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede causar daño y muerte celular.

Estudios previos han mostrado que la calcitriol puede prevenir la toxicidad muscular inducida por la zidovudina, un fármaco de la misma familia farmacológica, mediante su efecto antioxidante. En este trabajo se propone investigar si la calcitriol también puede proteger contra la toxicidad muscular inducida por lamivudina. El objetivo es evaluar el efecto citotóxico de la lamivudina y el potencial efecto protector de la calcitriol en células musculares esqueléticas mediante el método de MTT. Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Unidad de Investigación de la Universidad Andrés Bello.

Los resultados obtenidos muestran que lamivudina solo produce un efecto citotóxico significativo en concentraciones supraterapéuticas en mioblastos C2C12. Por otro lado, calcitriol no genera un efecto favorable en la viabilidad celular, posiblemente por su efecto inhibitorio en la proliferación. Por ende, se requieren nuevas condiciones experimentales para verificar si calcitriol presenta un rol protector ante agentes citotóxicos en el músculo esquelético.

ABSTRACT

HIV is a chronic disease caused by a retrovirus that infects CD4+ T lymphocytes, which can lead to immunodeficiency if left untreated. Highly active antiretroviral therapy (HAART) has significantly improved HIV-associated morbidity and mortality through combination antiretroviral drugs, with nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) being the mainstay of treatment, with lamivudine being one of the most widely used NRTIs. Although considered safe, lamivudine has been identified as a potential cause of muscle toxicity by altering mitochondrial function in muscle cells, thereby decreasing cellular respiration and ATP production and increasing lactate formation. This mitochondrial dysfunction leads to an increase in reactive oxygen species (ROS), which can cause cell damage and death.

Previous studies have shown that vitamin D can prevent muscle toxicity induced by zidovudine, a drug from the same pharmacological family, through its antioxidant effect. This study aims to investigate whether vitamin D can also protect against lamivudine-induced muscle toxicity. The objective is to evaluate the cytotoxic effect of lamivudine and the potential protective effect of vitamin D in skeletal muscle cells using the MTT method. This work was carried out in the Research Unit Laboratory of Andrés Bello University.

The results show that lamivudine only produces a significant cytotoxic effect at supratherapeutic concentrations in C2C12 myoblasts. On the other hand, vitamin D does not have a favorable impact on cell viability, possibly due to its inhibitory effect on proliferation. Therefore, new experimental conditions are required to verify whether vitamin D protects against cytotoxic agents in skeletal muscle.

INTRODUCCIÓN

1. introducción

El VIH-1 es una enfermedad infecciosa crónica causada por un retrovirus que infecta principalmente los linfocitos CD4+ la que, si no recibe tratamiento, progresa a un estado de inmunodeficiencia (1). Esta enfermedad es un problema de salud pública global, existiendo cada año un aumento en el número de contagios en el mundo. Latinoamérica no es la excepción, con un aumento del 8% en el número de nuevos casos en el año 2022, en comparación a cifras del año 2010. En nuestro país, el número de casos nuevos confirmados ha mostrado fluctuaciones importantes desde el año 2013 en adelante, alcanzando los 4327 casos en 2024 (Gráfico 1) (2, 3).

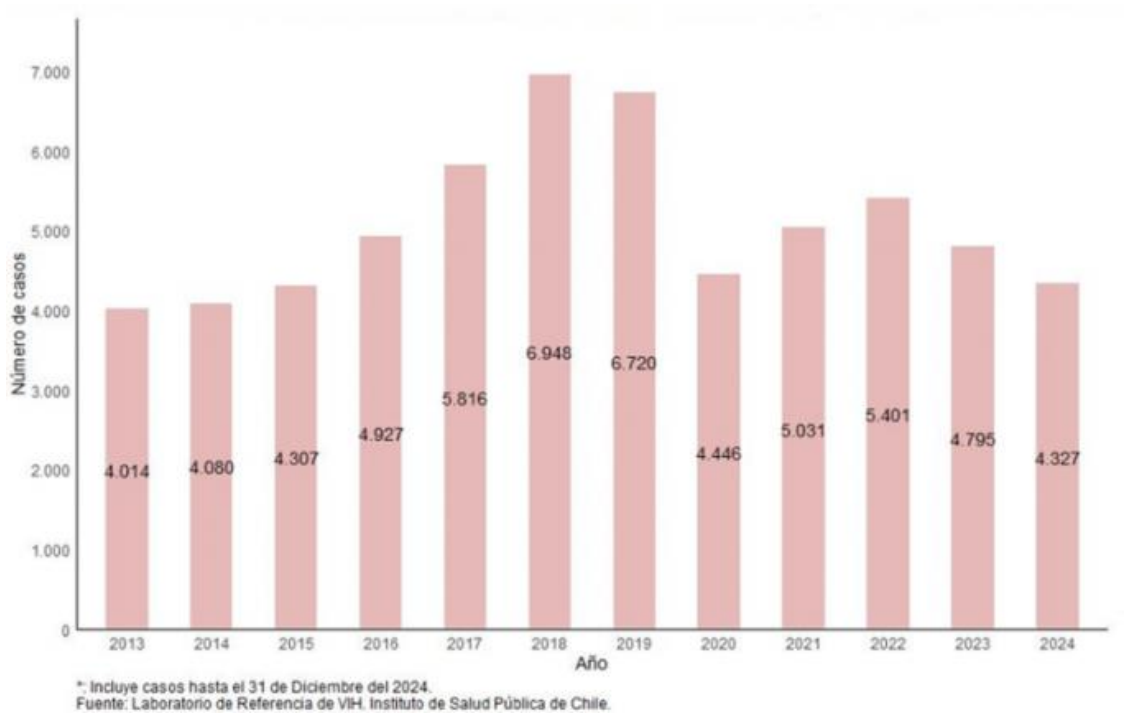


Gráfico 1. Casos confirmados de infección por VIH en Chile desde el año 2013-2024 (2).

En Chile, se observa un cambio en la distribución de nuevos contagios, con un aumento en la proporción de casos extranjeros (Tabla 1). El grupo de pacientes

jóvenes entre 20-39 años es el grupo de mayor tasa de nuevos contagios en nuestro país, y se estima que hay aproximadamente 80 mil personas portadoras de esta patología hasta el año 2022 (2, 4).

Tabla 1. Nuevos casos confirmados de VIH en Chile según nacionalidad, período 2015-2022

Año	Total	Casos chilenos	Casos extranjeros (%)	
2015	4.307	3.815	492	11%
2016	4.927	4.056	871	18%
2017	5.816	4.303	1.513	26%
2018	6.948	4.340	2.608	38%
2019	6.720	4.015	2.705	40%
2020	4.446	2.647	1.799	40%
2021	5.031	2.835	2.196	44%
2022	5.401	2.756	2.632	49%

Tabla 1. Nuevos casos confirmados de VIH en Chile según nacionalidad (2).

1.1 **Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

El VIH corresponde a un retrovirus cuyo material genético está formado por 2 hebras de ARN simple (5). Tiene una envoltura formada por una bicapa lípidica que le otorga una forma esférica. Esta envoltura contiene en su superficie glicoproteínas (gp41 y gp120) que se adhieren a los correceptores CCR5 o CXCR4 de la superficie celular de los linfocitos CD4+, dependiendo de la variante del VIH. Esta unión causa una modificación en la conformación de la glicoproteína gp41 y permite la fusión de las membranas, permitiendo la internalización del material genético viral y sus componentes. Cuando los componentes del virus se encuentran en el citoplasma, se activa su transcriptasa inversa, dando inicio a la retrotranscripción del ARN viral a ADN proviral de doble hebra, el cual es transportado hacia el núcleo de la célula, y con la ayuda de la integrasa viral se incorpora al ADN de la célula infectada. En el momento en que el linfocito se activa e inicia su expansión clonal, comienza la transcripción de sus genes, transcribiendo también el ARN viral y el ARN mensajero (ARNm) que codifica para las proteínas del virus. Estos son

transportados al citosol, siendo traducidos por los ribosomas, los cuales generan proteínas como gag, pol y env, las cuales son necesarias para la formación de la partícula viral inmadura. Finalmente, por acción de la proteasa viral, ocurre el procesamiento y maduración de las proteínas virales, seguido del ensamblaje de los viriones y su posterior exocitosis (Figura 1) (6,7).

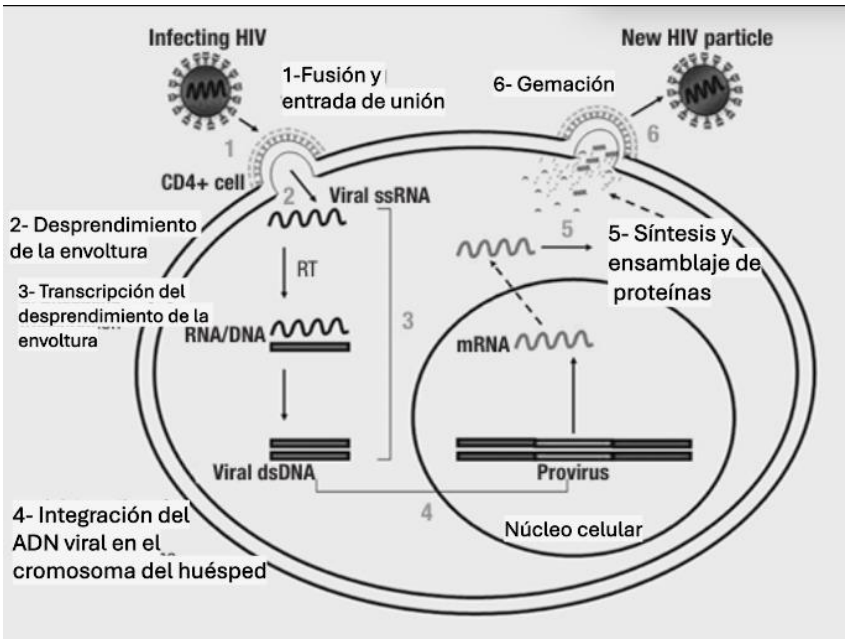


Figura 1. Ciclo de replicación del VIH (adaptado de 6).

La carga viral, definida como la cantidad de copias del retrovirus presente en el plasma, se asocia con una mayor capacidad de infección. Mientras esta se mantenga elevada, continuarán infectándose nuevos linfocitos, especialmente aquellos que se encuentran en división celular y en estado de activación, ya que son más susceptibles a la infección debido a la mayor expresión de correceptores como CCR5 y CXCR4. Esto disminuye la correcta funcionalidad de los linfocitos CD4+, junto con una muerte progresiva de ellos, provocando una reducción en la respuesta del sistema inmune, lo que finalmente lleva a un estado de inmunodeficiencia, en donde patógenos oportunistas pueden causar enfermedades o la muerte del paciente. Este estado más avanzado de la

enfermedad se conoce como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (8, 9).

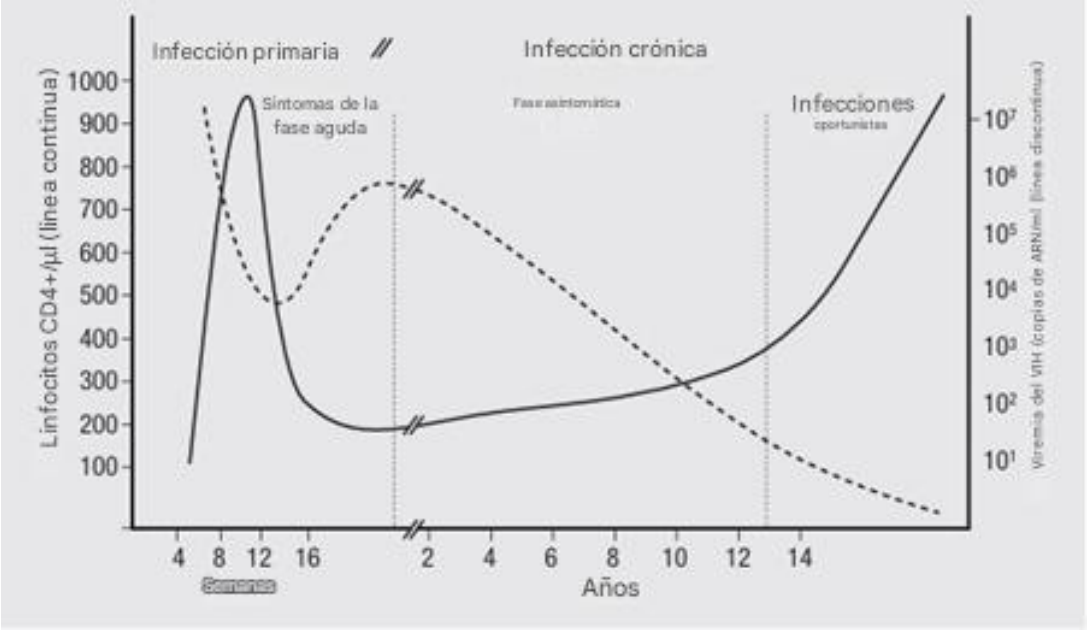


Figura 2. Curso clínico de la infección por VIH (adaptado de 6).

El contagio de esta enfermedad ocurre principalmente a través de tres vías: transmisión sexual, contacto con hemoderivados o transfusión de sangre, y transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo y/o la lactancia. De estas, la vía sexual representa la forma de transmisión más prevalente, tanto en Chile como a nivel mundial (10).

1.2 **Tratamiento Farmacológico del VIH**

El tratamiento farmacológico para esta patología se inicia una vez confirmada su presencia, independientemente del recuento de linfocitos CD4+ del paciente. Es fundamental tener precaución al iniciar o mantener la terapia en pacientes con compromiso renal o hepático, ya sea estructural o funcional. Además, debe considerarse cuidadosamente las posibles interacciones farmacológicas con los tratamientos que este recibiendo el paciente (11, 12).

En este contexto, la terapia de gran actividad (TARGA) para el VIH, constituye el esquema de elección, este consiste en el uso combinado de dos o tres fármacos antirretrovirales de distinta familia, o bien dos fármacos de la misma familia más un tercero de otra. La estrategia más utilizada incluye dos inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa reversa (INTR) y un inhibidor de la integrasa (INI) lo que permite una supresión viral eficaz y sostenida (13, 14).

1.3 **INTR**

Los INTR fueron la primera familia farmacológica desarrollada para el tratamiento del VIH, siendo zidovudina (AZT) el primer fármaco aprobado para este propósito (15). Sin embargo, AZT demostró desarrollar una alta incidencia de reacciones adversas, siendo algunas de ellas severas como anemia y leucopenia, esto propuso desarrollar nuevos derivados con un mejor perfil de seguridad. De manera relevante, también se observó una toxicidad muscular significativa en algunos pacientes tratados con AZT, lo cual en varios casos llevó a la suspensión de la terapia (16-19).

INTR	Reacciones adversas comunes	Reacciones adversas musculares
Zidovudina (AZT)	Náuseas, vómitos, dolor de cabeza, malestar general, calambres abdominales, dolor abdominal, dispepsia, escalofríos, fatiga, insomnio y neuropatía.	Dolor musculoesquelético y mialgia.
Lamivudina (3TC)	Cefalea, fatiga, malestar general, parestesia, neuropatía, insomnio, trastorno del sueño, erupción cutánea, náuseas, diarrea, dolor de garganta, vómitos, neutropenia, aumento de alanina aminotransferasa sérica, hepatomegalia y tos.	Dolor musculoesquelético.
Emtricitabina	Acidosis láctica, malestar gastrointestinal, hipercolesterolemia, cefalea y reacciones cutáneas, sueños anormales, astenia mareos, dolor de cabeza, insomnio, aumento de la creatina fosfoquinasa en plasma, aumento de la tos y rinitis.	
Tenofovir alafenamida (TAF)	Dolor de cabeza, disminución de la densidad mineral ósea en la columna lumbar, aumento de la alanina aminotransferasa sérica y tos.	
Tenofovir disoproxil fumarato (TDF)	Aumento de los triglicéridos séricos, diarrea, náuseas, astenia, aumento de la alanina aminotransferasa sérica, dolor de cabeza y nasofaringitis.	Aumento de la creatina fosfoquinasa y mialgia.

Tabla 2. Reacciones adversas de los INTR (20, 21, 22, 23).

1.3.1 Toxicidad muscular causada por los INTR

Se ha comprobado que la toxicidad muscular inducida por zidovudina se relaciona con el daño mitocondrial en las células musculares (24). Una vez fosforilado, el fármaco se une a la ADN polimerasa gamma de la mitocondria, enzima responsable de la replicación del ADN mitocondrial. Esta inhibición compromete la síntesis adecuada de ADN mitocondrial, lo que se traduce en la reducción de la producción de ARN y proteínas esenciales para el funcionamiento de este organelo. Como consecuencia la mitocondria pierde la capacidad de llevar a cabo funciones biológicas esenciales como la respiración celular aeróbica, ya que disminuyen proteínas clave para el ensamblaje de la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la generación de ATP (25, 26). Esta disfunción gatilla el aumento de la respiración anaeróbica como proceso compensatorio, lo cual conduce a la acumulación intracelular de lactato, generando estrés oxidativo, favoreciendo el daño estructural y en última instancia, ocasionando daño y muerte celular (17). Si bien lamivudina presenta un mejor perfil de seguridad más favorable en comparación a los otros INTR, especialmente zidovudina, se han reportado efectos adversos musculoesqueléticos y mialgias (20, 27).

1.3.2 Lamivudina

Lamivudina (3TC), es una de las opciones terapéuticas más utilizadas en el tratamiento del VIH (13). Este fármaco, una vez que ingresa a la célula, requiere ser fosforilado por quinasas intracelulares en tres pasos consecutivos, para convertirse en su forma activa, lamivudina trifosfato (Figura 2) (28, 29). Este metabolito activo, actúa como falso sustrato, interfiriendo con la enzima transcriptasa inversa del VIH, al competir con los nucleótidos de citidina en la cadena creciente del ADN viral, lo que provoca la terminación prematura en la síntesis de ADN (30,31).

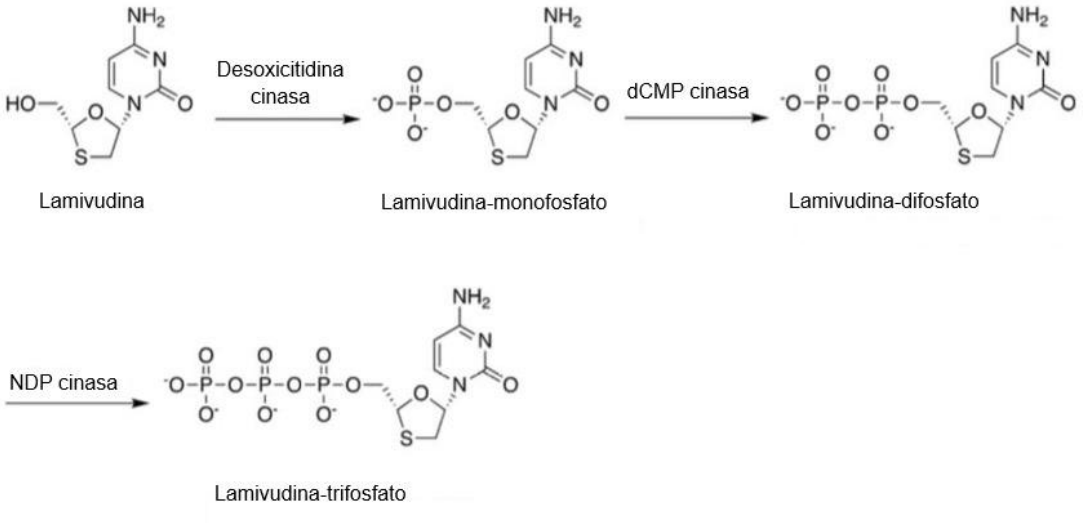


Figura 3. Estructura química lamivudina y su proceso de activación por fosforilación (adaptado de 32).

Lamivudina se absorbe rápidamente tras su administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre las 0,5-1,5 horas. Su absorción no se ve afectada por la ingesta de alimentos. Presenta una biodisponibilidad oral cercana al 82% en adultos y un 68% en niños. Su eliminación ocurre principalmente por vía renal, excretándose hasta un 70% de manera inalterada a través de la orina. Por esta razón, en pacientes con disfunción renal se requiere un ajuste de dosis para evitar acumulación y toxicidad (30, 33).

Si bien lamivudina es una opción farmacológica considerada segura en el tratamiento para el VIH, no está exenta de reacciones adversas, como las que afectan al musculo esquelético, causadas por la interacción del fármaco activo con la polimerasa mitocondrial (27, 34). En base a esto, podemos hipotetizar que agentes capaces de preservar la función mitocondrial pueden prevenir o contrarrestar estos efectos (29). En este sentido, algunos estudios han planteado que calcitriol podría ejercer un rol protector sobre el músculo esquelético (35, 36).

1.4 **Calcitriol**

La vitamina D es una hormona que se sintetiza de forma natural en el organismo. En la dermis, 7-dehidrocolesterol actúa como precursor, el cual al exponerse a la radiación ultravioleta B de la luz solar, absorbe los fotones generando colecalciferol. Este metabolito se distribuye por el torrente sanguíneo unido a proteínas transportadoras de vitamina D. En el hígado, el colecalciferol es hidroxilado por acción de la 25-hidroxilasa para formar 25-OH vitamina D. Posteriormente, es transportado a los túbulos renales, donde ocurre una segunda hidroxilación catalizada por la 1-hidroxilasa generando el metabolito activo 1,25-$(OH)_2$ calcitriol (calcitriol) (37).

El calcitriol cumple diversas funciones fisiológicas esenciales, tales como la regulación de la absorción intestinal de calcio y fósforo en los enterocitos (38). En el musculo esquelético se ha descrito una alta expresión del receptor de vitamina D (VDR), en donde estimula la diferenciación de las células musculares, su proliferación e hipertrofia (35, 36, 38).

Desde una perspectiva mitocondrial, el calcitriol ha demostrado inducir la actividad de la citrato sintasa, enzima que cataliza la formación de citrato desde acetil-CoA y oxalacetato en el ciclo de Krebs. También estimula la expresión de proteínas como OPA_1 de la mitocondria, encargada del mantenimiento y fisión de la estructura de la cresta mitocondrial. Por otro lado, se ha observado que calcitriol tiene efectos protectores ante el daño de estrés oxidativo en las mitocondrias de células musculares esqueléticas (39, 40).

Cabe destacar que se ha documentado una relación entre infección por VIH y concentraciones plasmáticas de vitamina D disminuidas, en comparación con individuos sin la enfermedad (41). Una disminución de esta vitamina ha mostrado que provoca una disminución en la fuerza muscular (42, 43).

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El calcitriol previene la citotoxicidad inducida por lamivudina en células musculares esqueléticas C2C12.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Investigar el efecto protector de calcitriol sobre la citotoxicidad inducida por lamivudina en células musculares esqueléticas.

3.2. Objetivos específicos

I. Identificar el efecto citotóxico de lamivudina en mioblastos C2C12.

II. Evaluar el efecto de calcitriol en la prevención de la citotoxicidad inducida por lamivudina.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1 Cultivo celular C2C12

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular murina C2C12 (adquirida a través de ATCC), derivada de mioblastos del músculo esquelético. En condiciones de cultivo celular con alto contenido de suero fetal bovino estas células proliferan como mioblastos mononucleados, al reducir la concentración de suero, son capaces de diferenciarse en miotubos, que emulan la estructura de la fibra muscular madura.

Las células C2C12 son ampliamente utilizadas en estudios *in vitro* para el estudio la citotoxicidad inducida por fármacos en el músculo esquelético, debido a su alta reproducibilidad, capacidad de diferenciación y expresión de marcadores comparables con células musculares humanas (44, 45). En este estudio, se utilizó mioblastos en fase proliferativa ya que son más susceptibles a daño y muerte celular, dependiendo de estímulos externos (46, 47).

4.1.1 Condición de cultivo celular

Las células se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomicina, para prevenir contaminación microbiana, en incubador a 37°C en 5% de CO_2 (35,48).

4.2 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es una técnica colorimétrica que permite medir la viabilidad celular de manera indirecta, debido a que el compuesto MTT (de color amarillo) es reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, generando formazán (de color azul-violeta), el cual una vez solubilizado puede ser medido a 570 nm por espectrofotometría (49, 50).

4.2.1 Preparación del reactivo MTT

5 mg de MTT (Sigma-Aldrich, M5655), fueron disueltos en 1 mL de DMSO bajo campana, posteriormente se filtró con un filtro de 0,22 µm en un tubo cónico (Falcon) de 15 mL, el cual se cubrió con papel aluminio y se refrigeró a 4°C (51).

4.2.2 Preparación solución de lamivudina

Para preparar la solución de lamivudina, se pesaron 57,32 mg de lamivudina (Cayman Chemical, 18514) la cual se disolvió en 1 mL de DMSO dando la concentración de 250 mM (52). Esta concentración inicial se utilizó como solución stock, para preparar las soluciones de trabajo mediante la fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde C_1 corresponde a la concentración inicial de lamivudina, C_2 la concentración de la solución que se desea preparar y V_2 el volumen final de la solución a preparar, la cual depende de la cantidad de pocillos que se desea colocar cada condición, considerando 200 µL de la solución estímulo y un mínimo de 5 pocillos por condición y V_1 corresponde al volumen que se debe tomar de la solución inicial para preparar la solución final.

En la siguiente tabla se muestran las soluciones utilizadas para cada condición de estímulo:

Solución	Preparación
3TC 1 µM	1 µL 3TC 1 mM + 1199 µL de MC
3TC 10 µM	10 µL 3TC 1 mM + 1190 µL de MC
3TC 100 µM	100 µL 3TC 1 mM + 1100 µL de MC
3TC 250 µM	1,2 µL 3TC 250 mM + 1199 µL de MC
3TC 500 µM	2,4 µL 3TC 250 mM + 1198 µL de MC
3TC 1000 µM	4,8 µL 3TC 250 mM + 1195 µL de MC
3TC 10000 µM	48 µL 3TC 250 mM + 1152 µL de MC
Control negativo de viabilidad	500 µL de DMSO + 500 µL de MC
Control positivo de viabilidad	1000 µL de MC

Tabla 3. Solución de lamivudina en distintas concentraciones. 3TC: lamivudina. MC: medio de cultivo. DMSO: dimetilsulfóxido.

Debido a que lamivudina se disolvió en DMSO, se realizó control de vehículo de las distintas soluciones de trabajo, para descartar posibles efectos causados por el DMSO. En la siguiente tabla se indica los controles de vehículo utilizados:

Concentración final 3TC (µM)	Volumen de DMSO (µL)	Volumen MC (µL)
1	1	1999
10	10	1190
100	100	1100
250	1,2	1199
500	2,4	1198
1000	4,8	1195
10000	48	1152

Tabla 4. Control vehículo de las muestras de 3TC

4.2.3 Incubación y estimulación de mioblastos C2C12 con lamivudina

Las células se dejaron incubando en una placa de 96 pocillos con 200 µL de medio de cultivo, y se incubaron por 24 horas para permitir una correcta adhesión y proliferación celular (como se mencionó en el punto 3.2.1). Transcurrido este período, y bajo campana de flujo laminar, para prevenir contaminación de la muestra, se cambió el medio de cultivo por 200 µL de las soluciones de estímulos (Tabla 3) o controles de vehículos (Tabla 4). Posteriormente, las placas fueron incubadas por 24 horas correspondiente a

la primera condición experimental establecida en este estudio. Este procedimiento fue realizado en tres réplicas independientes (n=3) utilizando pasajes celulares distintos y días diferentes con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de los resultados y reducir la variabilidad experimental.

De manera análoga, se realizó un ensayo con estimulación por 72 horas, utilizando una densidad de $1x10^4$ células por pocillo en placas de 96 pocillos. Este protocolo se ejecutó en cinco réplicas independientes (n=5), empleando pasajes celulares distintos, con el objetivo de evaluar los efectos de la exposición prolongada al estímulo y garantizar la reproductibilidad de los resultados.

Concluida esta parte, se procedió a realizar el método MTT para establecer los efectos que causo el fármaco en los mioblastos C2C12.

4.2.4 Ejecución del método MTT

Se procedió a añadir 50 µL de MTT (5 ng/mL) y 200 µL de MC en cada pocillo, tras lo cual la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C, protegida de la luz, para una correcta reducción del MTT a su cristal de formazán, observando cada 10 minutos la placa para detectar la formación de cristales. Concluido el tiempo de incubación, se retiró el reactivo diluido de cada pocillo y se agregó 200 µL de isopropanol y se esperó 10 minutos para que se disolvieran completamente los cristales formados. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 y 700 nm en el equipo *Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System* (marca Biotek). La medición a 700 nm fue utilizada como blanco para realizar una corrección a la absorbancia de 570 nm, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{(Abs_{570nm} - Abs_{700nm})\ 3TC\ o\ DMSO}{(Abs_{570nm} - Abs_{700nm})Control\ vida} \text{ x } 100$$

4.3 Preparación solución de lamivudina y calcitriol

Para la preparación de calcitriol, se disolvió 1 mg de calcitriol (Cayman Chemical Company, 71820) en 2 mL de DMSO, dando una solución de concentración 1,2 mM (53). A partir de esta solución inicial, se tomaron alícuotas y disolvieron con medio de cultivo, para preparar las muestras de calcitriol, con la siguiente formula:

$$C_1 \text{ x } V_1 = C_2 \text{ x } V_2$$

Las concentraciones de trabajo para las muestras de calcitriol con y sin lamivudina se indican en la siguiente tabla:

Concentración final 3TC (μM)/Calcitriol (nM)	Volumen stock (μL) Calcitriol 1,2 mM	Volumen stock (μL) 3TC 250 mM	Volumen MC (μL)
- /100	0,33	-	4000
250/100	0,33	4	3996
500/100	0,33	8	3992
1000/100	0,33	16	3984
10000/100	0,33	160	3840
-/200	0,66	-	3999
250/200	0,66	4	3995
500/200	0,66	8	3991
1000/200	0,66	16	3983
10000/200	0,66	160	3839

Tabla 5. Solución de lamivudina con calcitriol.

Para esta parte del experimento se usó controles de vehículo para cada condición, los que se encuentran indicados en la siguiente tabla:

Concentración 3TC (µM)/ Calcitriol (nM)	Volumen stock (µL) DMSO	Volumen MC (µL)
250/100	4,33	3996
500/100	8,33	3992
1000/100	16,33	3984
10000/100	160,33	3840
250/200	4,67	3995
500/200	8,67	3991
1000/200	16,67	3983
10000/200	160,67	3839

Tabla 6. Control vehículo de las muestras de calcitriol y 3TC.

4.3.1 Tinción de Giemsa

Inicialmente se preparó una solución madre de Giemsa, la cual contiene: 7,6 gramos de reactivo en polvo Giemsa; 500 mL de glicerol y 500 mL de metanol. En un frasco color ámbar se pusieron 100 mL de metanol, luego se añadieron los 7,6 gramos del reactivo en polvo y se agitó en movimientos circulares por 3 minutos. Posteriormente se agregaron los 500 mL de glicerol y se agitó por 3 minutos más. Finalmente, se le añadió el metanol restante y

se agitó de la misma manera que al inicio (se mantuvo en agitación constante por 5 días, y se almacenó en un lugar seco y sin exposición a la luz). La solución de trabajo se preparó mezclando en un vaso precipitado 3 mL de agua destilada y 1 mL de la solución stock de Giemsa (solución Giemsa al 20%). Se procuró utilizar esta solución de inmediato luego de prepararla.

El día del experimento, las células se lavaron 2 veces con PBS estéril y posteriormente se añadió 1 mL de metanol a cada pocillo para fijación (15 minutos a temperatura ambiente). Luego se añadió 1 mL de la solución Giemsa al 20% a cada pocillo y se incubó por 20 minutos, tras lo cual se extrajo la solución y se lavó 2 veces con 1 mL de agua (54). Finalmente se observó en el microscopio invertido (Motic AE31 Series) con el aumento 20x y se tomaron fotos para observar la morfología celular distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas).

4.4 Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio ± error estándar de la media (SEM) en al menos, tres experimentos independientes. La comparación de estos grupos se llevó a cabo por el análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA) de una vía, con un nivel de confianza que fue menor al 5% ($p<0.05$), se utilizó el post de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Ensayo de viabilidad celular con 3TC

Dado que los estudios previos sobre la toxicidad muscular inducida por lamivudina se han realizado principalmente en mioblastos C2C12, en este trabajo se buscó determinar el rango de concentración en el que lamivudina provoca una disminución significativa de la viabilidad celular, tanto a corto plazo (24 horas) como a largo plazo (72 horas). Para ello, se empleó el ensayo de MTT en cultivos de mioblastos C2C12 expuestos a distintas concentraciones de fármaco, utilizando como referencia estudios previos sobre toxicidad mitocondrial y muerte celular (14,17,26,34,46).

Como se muestra en el Gráfico 2, únicamente la exposición a 10 mM de lamivudina durante 24 horas resultó en una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular, en comparación con las concentraciones menores evaluadas (gráfico 2).

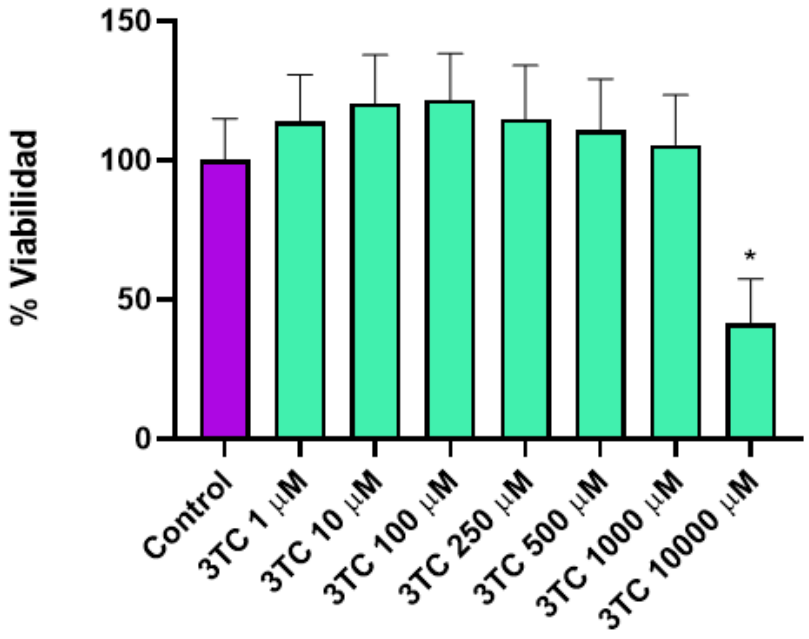


Gráfico 2: MTT en mioblastos C2C12 en presencia de 3TC a 24 horas. Resultados del ensayo MTT para evaluar porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de lamivudina sobre mioblastos C2C12 (Promedio ± SEM; n=3). * p<0,05 vs control. Test ANOVA de una vía; Post-test de Tukey.

Dado que lamivudina no indujo muerte en el rango de concentraciones cercano al alcanzado en el plasma, se decidió evaluar el efecto citotóxico de lamivudina en períodos más largos de incubación. La incubación de los mioblastos C2C12 por 72 horas con lamivudina a distintas concentraciones mostró resultados similares a los observados a las 24 horas, con una reducción estadíticamente significativa solo con lamivudina 10 mM, concentración muy superior a la encontrada en el plasma (gráfico 3).

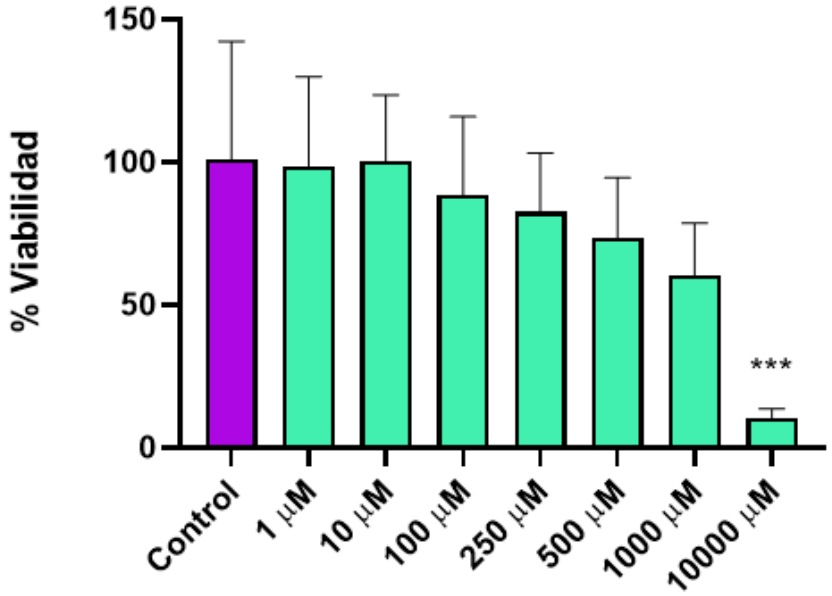


Gráfico 3: MTT en mioblastos C2C12 en presencia de 3TC a 72 horas. Resultados del ensayo MTT para evaluar porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de lamivudina sobre mioblastos C2C12 (Promedio ± SEM; n=5). * p<0,05 vs control. Test ANOVA de una vía; Post-test de Tukey.

5.2 Ensayo de viabilidad con calcitriol y lamivudina

Para determinar si calcitriol por si solo tenía algún efecto sobre la viabilidad celular, se realizó un ensayo de MTT evaluando el impacto de calcitriol 100 y 200 nM en este parámetro (incubación por 72 horas), observándose una tendencia a la reducción en la viabilidad con ambas concentraciones (gráfico 4). Estas concentraciones de calcitriol fueron seleccionadas en base a las concentraciones plasmáticas de calcitriol reportadas en literatura (55).

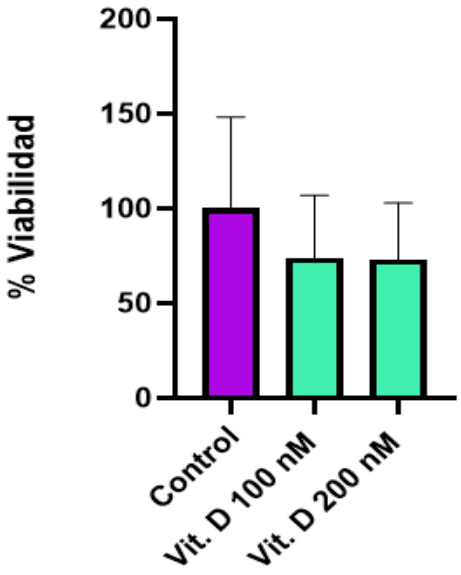


Gráfico 4: MTT en mioblastos C2C12 en presencia de calcitriol 100 y 200 nM a 72 horas. Resultados del ensayo MTT para evaluar porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de calcitriol sobre mioblastos C2C12 (Promedio ± SEM; n=2). * p<0,05 vs control. Test ANOVA de una vía; Post-test Tukey en comparación a la condición control.

Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto de la incubación en conjunto de calcitriol 100 nM y concentraciones crecientes de lamivudina, en el rango 250 µM -10 mM. A pesar de que solo se realizó 2 veces este experimento, se observa una clara tendencia a la reducción en la viabilidad celular con todas las concentraciones de lamivudina estudiadas (gráfico 5). Resultados muy similares se obtuvieron utilizando calcitriol 200 nM en presencia de concentraciones crecientes de lamivudina (gráfico 6).

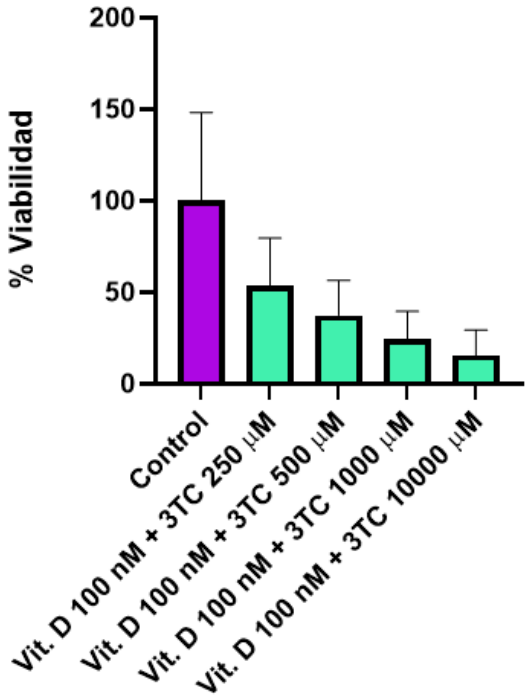


Gráfico 5: MTT en mioblastos C2C12 en presencia de calcitriol 100 nM y 3TC a 72 horas. Resultados del ensayo MTT para evaluar porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de lamivudina sobre mioblastos C2C12 (Promedio ± SEM; n=2). * p<0,05 vs control. Test ANOVA de una vía; Post-test Tukey en comparación a la condición control. No presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control.

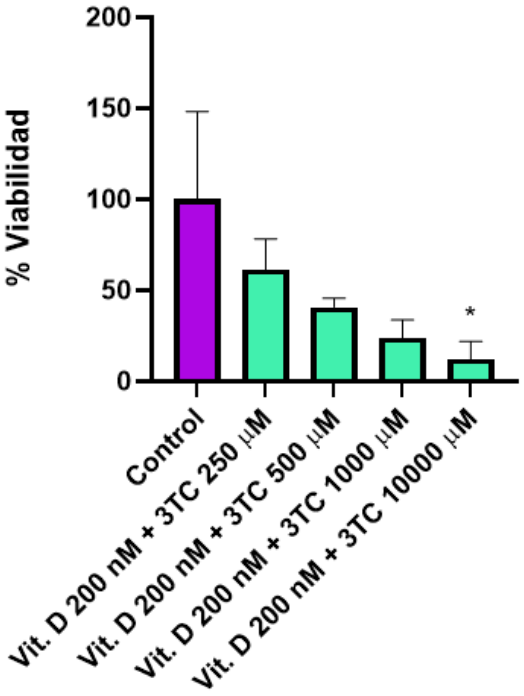


Gráfico 6: MTT en mioblastos C2C12 en presencia de calcitriol 200 nM y 3TC a 72 horas. Resultados del ensayo MTT para evaluar porcentaje de viabilidad a diferentes concentraciones de lamivudina sobre mioblastos C2C12 (Promedio ± SEM; n=2). * p<0,05 vs control. Test ANOVA de una vía; Post-test Tukey en comparación a la condición control.

5.2.1 Tinción de Giemsa en mioblastos C2C12 estimulados con calcitriol

Con el objetivo de evaluar posibles cambios en la morfología en los mioblastos inducida por el tratamiento con calcitriol, se realizó la tinción de Giemsa en cultivos celulares sometidos a diferentes condiciones experimentales. Las células fueron distribuidas en tres grupos: un control positivo de viabilidad (cultivo solo en medio de crecimiento), y dos grupos tratados con calcitriol a concentraciones de 100 y 200 nM (niveles plasmáticos normales) (55). La incubación con calcitriol se realizó por 24 (D_1), 48 (D_2) y 72 horas (D_3). De forma preliminar se observa una disminución en el número de mioblastos tras 48 y 72 horas de incubación con calcitriol, asociado a cambios en la morfología celular (figura 4).

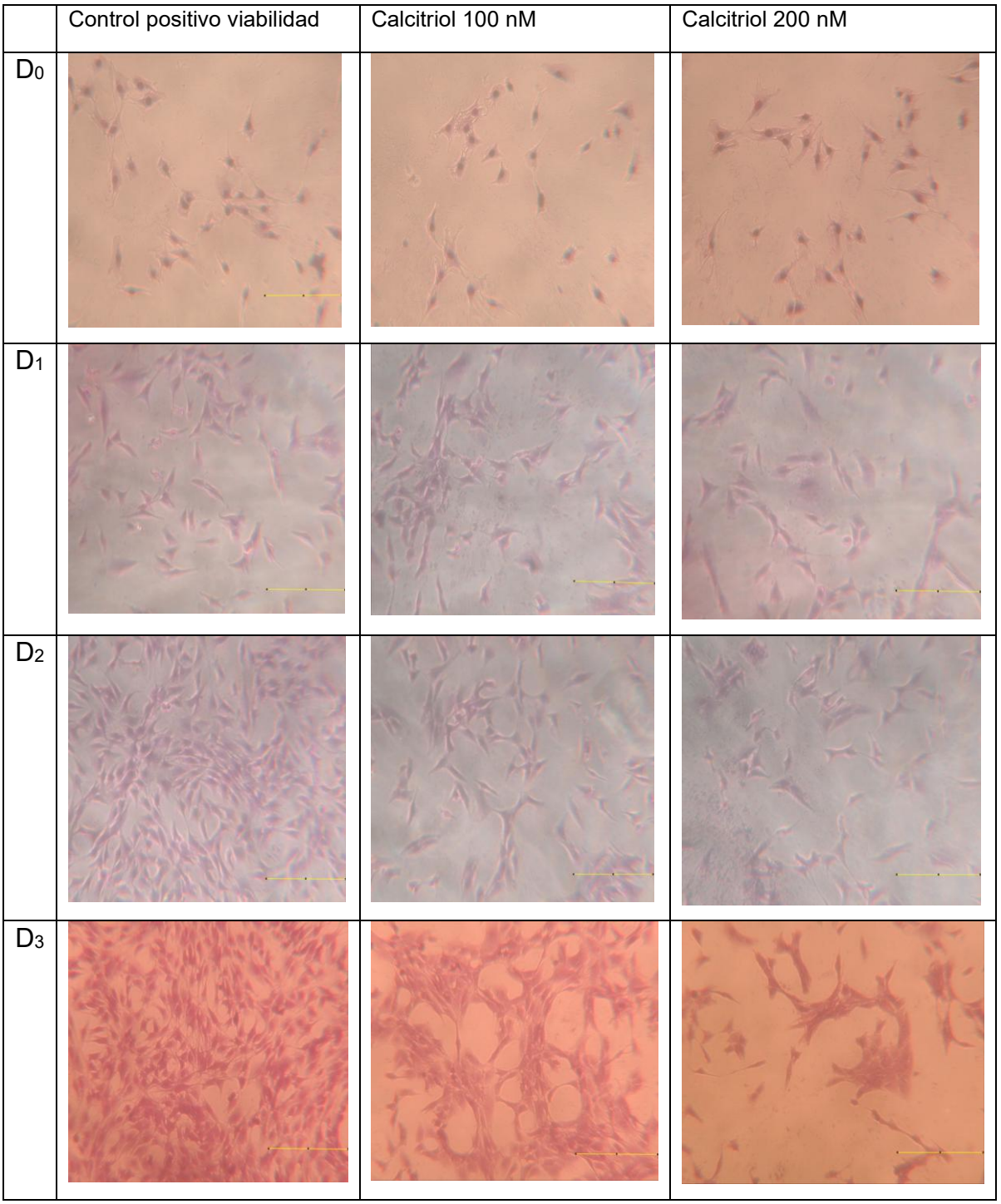


Figura 4. Efecto de calcitriol en la morfología de mioblastos C2C12. Imágenes representativas de los resultados obtenidos en la tinción de Giemsa en los mioblastos en ausencia y presencia de calcitriol (100 y 200 nM) 24, 48 y 72 horas (n=1). Imágenes tomadas con el programa Celestron Digital Imager HD en microscopio invertido. Barra escala 20 µm.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El VIH sigue siendo un problema de salud pública en Chile, con tasas de contagio importantes, sobre todo entre la población joven (2). Si bien la terapia antirretroviral actual es efectiva y segura, sus efectos a largo plazo siguen siendo una preocupación, sobre todo en poblaciones más frágiles, como los adultos mayores. En este sentido, la detección temprana, la prevención y el manejo de reacciones adversas a medicamentos es esencial para lograr una buena adherencia al tratamiento.

El manejo farmacológico del VIH está conformado por una combinación de medicamentos antirretrovirales, entre los que destaca lamivudina, por ser uno de los fármacos más utilizados en la actualidad (13,14). Aunque posee un perfil de seguridad favorable, se ha descrito que el uso prolongado de lamivudina puede inducir efectos adversos musculoesqueléticos, como dolor muscular y miopatía, los cuales comprometen la funcionalidad del músculo esquelético (20, 30). Por otro lado, se ha descrito que los pacientes con VIH tienden a presentar un déficit de calcitriol, lo que se correlaciona con una menor expresión de VDR, aumento de ROS intracelular y disfunción mitocondrial, condiciones que contribuyen al desarrollo de atrofia muscular (41, 56). El objetivo de este trabajo fue explorar el potencial rol protector de la forma activa de la vitamina D (calcitriol) frente a los efectos citotóxicos de lamivudina sobre mioblastos C2C12.

6.1 Análisis del efecto citotóxico de lamivudina en mioblastos C2C12

En este trabajo, para determinar el efecto citotóxico de lamivudina, se utilizó como modelo de estudio mioblastos C2C12, debido a que esta línea celular, derivado de mioblastos de ratón, ha sido ampliamente usada para identificar reacciones adversas a medicamentos en el músculo esquelético (44, 45, 46). Inicialmente, se evaluó el efecto citotóxico de lamivudina a diferentes concentraciones tras 24 horas de exposición al fármaco (gráfico 2), sin que se observara una disminución en la viabilidad celular, excepto en el último punto de concentración (10 mM). Esta concentración se encuentra muy por sobre los

valores del fármaco alcanzados en plasma sanguíneo (1-10 μM), por lo que este dato sería poco relevante si lo extrapolamos a una situación fisiológica (27). Interesantemente, se observa una leve tendencia al aumento en el porcentaje de viabilidad con concentraciones de lamivudina entre 1-1000 μM. Si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa, se sugiere realizar experimentos complementarios que ayuden a aclarar este punto.

Al no encontrarse el resultado esperado tras 24 horas de exposición a lamivudina, se realizó un experimento similar, esta vez incubando los mioblastos con la droga por 72 horas (gráfico 3). Nuevamente, solo la condición 10 mM causó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular. Sin embargo, con este tiempo de incubación se observó una tendencia a la disminución en la viabilidad celular con concentraciones de lamivudina desde 100 μM. Esta diferencia se puede explicar por el daño acumulativo que podría generar lamivudina tras varios días de exposición, sobre todo considerando un mayor número de ciclos de replicación del DNA mitocondrial, aunque esta hipótesis requiere demostración empírica.

Previamente se ha descrito que lamivudina 200 μM induce muerte celular en mioblastos C2C12 tras 8 días de exposición, evaluada mediante incorporación de yoduro de propidio (46). En ese mismo trabajo no se observó muerte celular con concentraciones de lamivudina de 8 y 40 μM. Esta diferencia en los resultados obtenidos respecto a nuestro trabajo se puede explicar por diferencias en los períodos de incubación y en las técnicas utilizadas para detectar viabilidad celular.

El método MTT se utiliza para evaluar la viabilidad celular de manera indirecta y su fundamento se basa en la actividad mitocondrial. Esta técnica tiene limitaciones debido a que depende de la integridad de las mitocondrias, y dado que lamivudina podría causar daño mitocondrial, puede afectar en los resultados del ensayo (49,50). Sin embargo, desde un punto de vista teórico, si lamivudina hubiera afectado la función mitocondrial esperaríamos haber observado una mayor reducción en la formación de formazán en las condiciones tratadas con el fármaco, hecho que no ocurrió. Para complementar

este ensayo se pudo haber realizado otro ensayo de viabilidad como la exclusión del colorante azul de tripán (57). Cabe mencionar que previamente se ha demostrado que zidovudina y lamivudina podrían tener efectos diferentes a nivel celular: Lin *et al* demostraron que zidovudina inhibe la autofagia, lo que produce acumulación de mitocondrias defectuosas y aumento en la producción de ROS intracelular, efecto que no se observa con lamivudina (46). A pesar de lo anterior, en el mismo trabajo se muestra que la activación de la autofagia causada por la inhibición de mTOR revierte la muerte celular inducida por lamivudina 200 µM (46).

6.2 Implicaciones del uso de calcitriol en la prevención del daño celular en mioblastos C2C12.

Antes de realizar experimentos combinados con calcitriol y lamivudina, evaluamos el efecto de calcitriol (100 y 200 nM) en la viabilidad celular (gráfico 4). La elección de estas concentraciones se fundamenta en reportes que indican que calcitriol genera un efecto protector ante daño mitocondrial en estas concentraciones (38, 40). Si bien no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se observa una reducción en la viabilidad celular en las condiciones tratadas con calcitriol. Este resultado, si bien es inesperado, puede responder más bien al efecto que ejerce calcitriol en la proliferación y diferenciación celular. Garcia *et al* demostraron previamente que calcitriol, a través de su unión a receptores VDR, provoca una reducción en la proliferación celular y un aumento en la expresión de genes relacionados con la diferenciación en células musculares, como MyoD (58). Las imágenes obtenidas mediante tinción de Giemsa (figura 4) muestran que calcitriol 100 y 200 nM produce un cambio en la morfología celular, sobre todo a las 72 horas, lo que podría ser concordante con la inducción de la diferenciación inducida por calcitriol antes descrita. Los métodos utilizados en este trabajo no permiten confirmar si calcitriol estimula la diferenciación de mioblastos, por lo que se sugiere realizar análisis complementarios de *western blot*, PCR y microscopía con este fin (51, 58).

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de viabilidad celular MTT (gráficos 5 y 6) evidenciaron una tendencia a la disminución en la viabilidad de los mioblastos C2C12 al ser expuestos a concentraciones superiores a 250 µM de lamivudina durante 72 horas, en presencia de calcitriol, aunque solo se alcanzó significancia estadística con concentraciones de 10 mM del fármaco (gráfico 6). Esta observación sugiere que lamivudina en concentraciones muy elevadas, puede ejercer un efecto citotóxico sobre células musculares en cultivo, lo que concuerda con estudios previos que reportan efectos adversos de otros INTR como es el caso de zidovudina en dosis terapéuticas sobre tejidos no diana, incluyendo el músculo esquelético (29,46). Sin embargo, esta concentración de lamivudina supera por mucho los niveles plasmáticos medidos en pacientes, así que este resultado no se puede extrapolar a usuarios del fármaco. En base a reportes previos, suponemos que la exposición a lamivudina por períodos más prolongados podría tener un impacto mayor en la viabilidad celular (46). Además, queda por determinar si la acción aditiva de lamivudina y calcitriol se debe a efectos citotóxicos, o se relaciona también con la reducción de la proliferación e inducción de la diferenciación descritos para calcitriol en células musculares.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En las condiciones experimentales definidas para este estudio no se observó un efecto citotóxico considerable de lamivudina en células musculares esqueléticas. Se sugiere determinar alteraciones funcionales no relacionadas con la muerte celular y evaluar citotoxicidad inducida por el fármaco en períodos más largos de tiempo.

Por otro lado, calcitriol produjo una tendencia a la reducción en la viabilidad celular, lo cual requiere un análisis más profundo para determinar su efecto citotóxico real o su relación con cambios en los procesos de proliferación y diferenciación celular asociados a esta hormona.

Finalmente, no se observó que calcitriol protegiera de la muerte celular inducida por lamivudina. Por el contrario, el tratamiento conjunto parece incrementar la citotoxicidad inducida por lamivudina, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

En resumen, estos hallazgos indican que lamivudina no induce muerte celular en las condiciones estudiadas, aunque no podemos descartar alteraciones en otros procesos celulares. Además, las acciones de calcitriol en células musculares son complejas y se requieren estudios complementarios para comprender sus acciones en la viabilidad, proliferación y diferenciación muscular.

REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, *29*(1), 58–65. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.10.001

2. Blamey R, Sciaraffia A, Piñera C, Silva M, Araya X, Ceballos ME, et al. Situación epidemiológica de VIH a nivel global y nacional: Puesta al día. Rev Chil Infectol. abril de 2024;41(2):248-58.

3. Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. Gob.cl. [marzo de 2025]. Disponible en: https://www.ispch.gob.cl/biomedico/vigilancia-de-laboratorio/ambitos-de-vigilancia/vigilancia-vih-sida/

4. De Salud M. Instituto de Salud Pública. Instituto de Salud Pública Ministerio de Salud. 2010;13(7):2023. Disponible en: https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2023/11/BoletinVIH02-09112023A_FINAL.pdf

5. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. Human immunodeficiency virus (HIV). Transfus Med Hemother [Internet]. 2016;43(3):203–22. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1159/000445852

6. Alcamí J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica [Internet]. 2004 ;22(8):486–96. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-avances-inmunopatologia-infeccion-por-el-13066856

7. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *46*(1), 5–14. https://doi.org/10.4415/ANN_10_01_02

8. Iwuji CC, Churchill D, Gilleece Y, Weiss HA, Fisher M. Older HIV-infected individuals present late and have a higher mortality: Brighton, UK cohort study. BMC Public Health [Internet]. 2013;13:397. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-13-397

9. Mocroft A, Johnson MA, Phillips AN. Factors affecting survival in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. AIDS. 1996;10(10):1057–65.

10. World Health Organization: WHO. VIH/sida [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2019. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids

11. Ambrosioni J, Levi L, Alagaratnam J, Van Bremen K, Mastrangelo A, Waalewijn H, et al. Major revision version 12.0 of the European AIDS Clinical Society guidelines 2023. HIV Med [Internet]. 2023;24(11):1126–36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/hiv.13542

12. McCabe SM, Ma Q, Slish JC, Catanzaro LM, Sheth N, DiCenzo R, et al. Antiretroviral therapy: pharmacokinetic considerations in patients with renal or hepatic impairment: Pharmacokinetic considerations in patients with renal or hepatic impairment. Clin Pharmacokinet [Internet]. 2008;47(3):153–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200847030-00002

13. European AIDS Clinical Society (EACS). Guía Clínica EACS 2019 [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.eacsociety.org/media/guidelines-10.0-spanish.pdf

14. Zidovudine, tenofovir or abacavir? Different adverse effect profiles. Prescrire Int. 2016;25(173):180–3.

15. Sperling R. Zidovudine. infect dis obstet gynecol [internet]. 1998; 6(5):197–203. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-0997(1998)6:5<197::AID-IDOG2>3.0.CO; 2-1

16. Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. N Engl J Med [Internet]. 1990;322(16):1098–105. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199004193221602

17. Corraliza ES, Martín AF. Efectos adversos de los fármacos antirretrovirales: Fisiopatología, manifestaciones clínicas y tratamiento. Anales De Medicina Interna [Internet]. 2006 [citado el 20 de septiembre de 2024];23(7):338–44.

Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0212-71992006000700010

18. Herbert EK, Herbert SR, Herbert KE. Skeletal muscle mitochondrial toxicity [Internet]. Mitochondrial Dysfunction Caused by Drugs and Environmental Toxicants. Wiley; 2018. p. 111–31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/9781119329725.ch8

19. Peters BS, Winer J, Landon DN, Stotter A, Pinching AJ. Mitochondrial myopathy associated with chronic zidovudine therapy in AIDS. The Quarterly journal of medicine [Internet]. 1993 Jan;86(1):5–15. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8438050/

20. UpToDate. Lamivudina: Información de medicamentos. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024. Disponible en: https://www-uptodate-com.recursosbiblioteca.unab.cl/contents/lamivudine-drug-information

21. UpToDate. Emtricitabina: Información de medicamentos. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024. Disponible en: https://www-uptodate-com.recursosbiblioteca.unab.cl/contents/emtricitabine-drug-information

22. UpToDate. Tenofovir alafenamida: Información de medicamentos. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024. Disponible en: https://www-uptodate-com.recursosbiblioteca.unab.cl/contents/tenofovir-alafenamide-drug-information#F49209963

23. UpToDate. Tenofovir disoproxil fumarato: Información de medicamentos. UpToDate [internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024. Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/tenofovir-disoproxil-fumarate-drug-information

24. Kohler JJ, Lewis W. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. Environ Mol Mutagen [Internet]. 2007;48(3–4):166–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/em.20223

25. Maagaard A, Kvale D. Mitochondrial toxicity in HIV-infected patients both off and on antiretroviral treatment: a continuum or distinct underlying mechanisms?

J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009;64(5):901–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp316

26. Mallon PWG, Unemori P, Sedwell R, Morey A, Rafferty M, Williams K, et al. In vivo, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors alter expression of both mitochondrial and lipid metabolism genes in the absence of depletion of mitochondrial DNA. J Infect Dis [Internet]. 2005;191(10):1686–96. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1086/429697

27. Eron JJ, Benoit SL, Jemsek J, MacArthur RD, Santana J, Quinn JB, et al. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party. N Engl J Med [Internet]. 1995;333(25):1662–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199512213332502

28. Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1986;83(21):8333–7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.21.8333

29. Anderson PL, Rower JE. Zidovudine and lamivudine for HIV infection. Clin Med Rev Ther [Internet]. 2010;2:a2004. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4137/cmrt.s4557

30. Gray NM, Marr CL, Penn CR, Cameron JM, Bethell RC. The intracellular phosphorylation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) and the incorporation of 3TC 5'-monophosphate into DNA by HIV-1 reverse transcriptase and human DNA polymerase gamma. Biochem Pharmacol [Internet]. 1995;50(7):1043–51. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(95)96620-a

31. Sarafianos SG, Das K, Clark AD Jr, Ding J, Boyer PL, Hughes SH, et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1999;96(18):10027–32. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.18.10027

32. Yoshida, Y., Honma, M., Kimura, Y., & Abe, H. (2021). Structure, synthesis and inhibition mechanism of nucleoside analogues as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *ChemMedChem*, *16*(5), 743–766. https://doi.org/10.1002/cmdc.202000695

33. Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. Clin Pharmacokinet [Internet]. 1999;36(1):41–66. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199936010-00004

34. Xu H, Wang Z, Zheng L, Zhang W, Lv H, Jin S, et al. Lamivudine/telbivudine-associated neuromyopathy: neurogenic damage, mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion. J Clin Pathol [Internet]. 2014;67(11):999–1005. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2013-202069

35. Ryan ZC, Craig TA, Wang X, Delmotte P, Salisbury JL, Lanza IR, et al. 1α,25-dihydroxyvitamin D3 mitigates cancer cell mediated mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2018;496(2):746–52. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.092

36. Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, Wang X, Lanza IR, Schaible NS, et al. 1α,25-dihydroxyvitamin D3 regulates mitochondrial oxygen consumption and dynamics in human skeletal muscle cells. J Biol Chem [Internet]. 2016;291(3):1514–28. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.684399

37. Valero Zanuy MÁ, Hawkins Carranza F. Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de calcitriol. Rev Esp Enferm Metab Óseas [Internet]. 2007 ;16(4):63–70. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-reemo-70-articulo-metabolismo-fuentes-endogenas-exogenas-vitamina-13108019

38. Girgis CM, Mokbel N, Cha KM, Houweling PJ, Abboud M, Fraser DR, et al. The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. Endocrinology [Internet]. 2014;155(9):3227–37. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1210/en.2014-1016

39. Salles J, Chanet A, Guillet C, Vaes AM, Brouwer-Brolsma EM, Rocher C, et al. Vitamin D status modulates mitochondrial oxidative capacities in skeletal muscle: role in sarcopenia. Commun Biol [Internet]. 2022;5(1):1288. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s42003-022-04246-3

40. Ashcroft SP, Bass JJ, Kazi AA, Atherton PJ, Philp A. The vitamin D receptor regulates mitochondrial function in C2C12 myoblasts. Am J Physiol Cell Physiol [Internet]. 2020;318(3):C536–41. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00568.2019

41. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Gangemi S, Iaria C, Cascio A. Vitamin D deficiency in HIV infection: Not only a bone disorder. Biomed Res Int [Internet]. 2015;2015:735615. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1155/2015/735615

42. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Mokbel N, Cheng K, Gunton JE. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells. Endocrinology [Internet]. 2014;155(2):347–57. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1205

43. Janoušek J, Pilařová V, Macáková K, Nomura A, Veiga-Matos J, Silva DD da, et al. Vitamin D: sources, physiological role, biokinetics, deficiency, therapeutic use, toxicity, and overview of analytical methods for detection of vitamin D and its metabolites. Crit Rev Clin Lab Sci [Internet]. 2022;59(8):517–54. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/10408363.2022.2070595

44. Bouitbir J, Panajatovic MV, Frechard T, Roos NJ, Krähenbühl S. Imatinib and dasatinib provoke mitochondrial dysfunction leading to oxidative stress in C2C12 myotubes and human RD cells. Front Pharmacol [Internet]. 2020;11:1106. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.01106

45. Schirris TJJ, Renkema GH, Ritschel T, Voermans NC, Bilos A, van Engelen BGM, et al. Statin-induced myopathy is associated with mitochondrial complex III inhibition. Cell Metab [Internet]. 2015;22(3):399–407. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.002

46. Lin H, Stankov MV, Hegermann J, Budida R, Panayotova-Dimitrova D, Schmidt RE, et al. Zidovudine-mediated autophagy inhibition enhances

mitochondrial toxicity in muscle cells. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2019;63(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01443-18

47. Campbell GR, Pallack ZT, Spector SA. Vitamin D attenuates nucleoside reverse transcriptase inhibitor induced human skeletal muscle mitochondria DNA depletion. AIDS [Internet]. 2013;27(9):1397–401. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e32836010dd

48. Besser RR, Bowles AC, Alassaf A, Carbonero D, Maciel R, Saporta M, et al. A chemically defined common medium for culture of C2C12 skeletal muscle and human induced pluripotent stem cell derived spinal spheroids. Cell Mol Bioeng [Internet]. 2020;13(6):605–19. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s12195-020-00624-1

49. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988;48(17):4827–33.

50. Choi BH, Kim M-R, Jung YN, Kang S, Hong J. Interfering with color response by porphyrin-related compounds in the MTT tetrazolium-based colorimetric assay. Int J Mol Sci [Internet]. 2022;24(1):562. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms24010562

51. Sáez T. Evaluación de la participación de la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) en la diferenciación de células musculares esqueléticas [Internet] [Tesis de pregrado]. UNAB (Universidad Andrés Bello); 2023. Disponible en: https://repositorio.unab.cl/items/fa9d5a26-d73d-42d4 9b69-c69df29cff02

52. Lamivudine (CAS 134678-17-4) [Internet]. Caymanchem.com. Disponible en: https://www.caymanchem.com/product/18514

53. Calcitriol (CAS 32222-06-3) [Internet]. Caymanchem.com. Disponible en: https://www.caymanchem.com/product/71820/calcitriol

54. Li X, Zhang S, Zhang Y, Liu P, Li M, Lu Y, et al. Myoblast differentiation of C2C12 cell may related with oxidative stress. Intractable Rare Dis Res [Internet]. 2021;10(3):173–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5582/irdr.2021.01058

55. Ramasamy I. Vitamin D metabolism and guidelines for vitamin D supplementation. Clin Biochem Rev [Internet]. 2020;41(3):103–26. Disponible en: http://dx.doi.org/10.33176/AACB-20-00006

56. Dzik KP, Kaczor JJ. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. Eur J Appl Physiol [Internet]. 2019;119(4):825–39. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00421-019-04104-x

57. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol [Internet]. 2015;111(1):A3.B.1-A3.B.3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111

58. Garcia LA, King KK, Ferrini MG, Norris KC, Artaza JN. 1,25(OH)2vitamin D3 stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. Endocrinology [Internet]. 2011;152(8):2976–86. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-0159

59. Wagatsuma A, Sakuma K. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. Biomed Res Int [Internet]. 2014;2014:121254. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1155/2014/121254