



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**Facultad de Medicina y Odontología**

**Departamento de Farmacología**

**Doctorado en Biomedicina y Farmacia**

**EFFECTOS PROINFLAMATORIOS DE LOS  
FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES  
INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA  
INVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDO  
*IN VITRO E IN VIVO***

**Tesis Doctoral**

**CARMEN DE PABLO BERNAL**

**Directores**

**Dra. ÁNGELES ÁLVAREZ RIBELLES**

**Dr. JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA**

**Valencia, 2013**





## UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

### Facultad de Medicina y Odontología

### Departamento de Farmacología

**Dña. ÁNGELES ÁLVAREZ RIBELLES**, Profesora Asociada del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia e Investigadora de la Fundación General de la Universidad de Valencia.

**D. JUAN VICENTE ESPLUGUES MOTA**, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

#### **CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado "Efectos proinflamatorios de los fármacos antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido *in vitro* e *in vivo*", presentado por la Licenciada en Farmacia **Dña. CARMEN DE PABLO BERNAL**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

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

Valencia, a 3 de Junio de 2013.

**Fdo. Dra. Ángeles Álvarez Ribelles**      **Fdo. Dr. Juan Vicente Esplugues Mota**



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

**BES-2008-004338:** Beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación Español.

**SAF-2007-60021:** "Efectos de los fármacos antirretrovirales sobre la interacción leucocito-endotelio". Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia Español-Programa de Biomedicina. IP: Ángeles Álvarez Ribelles. 2008-2010.

**SAF-2010-16030:** "Estudio de los mecanismos celulares y moleculares que median la toxicidad vascular inducida por la terapia antirretroviral". Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación Español-Programa de Biomedicina. IP: Ángeles Álvarez Ribelles. 2011-2013.



***“Y como no sabía que era imposible... lo hizo”***

*- Albert Einstein -*

***A mi familia***





## ***Agradecimientos...***

Hace algunos años alguien me dijo que si luchas por algo todo lo que te rodea termina “reorganizándose” para que lo consigas. No tengo claro que esto ocurra siempre, ni a todas las personas, sin embargo yo me considero una persona afortunada. Tampoco sé muy bien donde está el límite, si es el azar el que hace que las cosas cambien en el momento adecuado hacia la dirección adecuada, o si son las propias personas quienes, con su esfuerzo, mueven y provocan las situaciones. Probablemente sea la suma de las dos fuerzas motoras, unas veces tirará más el azar y otras la voluntad. Este pensamiento ha iluminado los rincones del largo camino que me ha traído hasta aquí, momento que comenzó cuando me incorporé a trabajar en el Departamento de Farmacología. El azar hizo que recién llegada a Valencia me encontrara en el lugar y en el momento adecuados y la voluntad hizo no importarme que dicho trabajo fuera únicamente por un mes y además en farmacología... Pufff!!! Mi asignatura “favorita” en la carrera!!! Así, la palabra “Tesis Doctoral”, que parecía tan lejana cuando me incorporé a la Universidad, ha ido vislumbrándose poco a poco en mi horizonte hasta que se ha convertido en una realidad.

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis hasta que no se ha terminado. Para mí suponen una parte muy importante, muy difícil y sobre todo muy especial de mi tesis doctoral. Consisten en un arduo trabajo de retrospectiva, memoria, análisis, valoración y expresión de sentimientos de lo que ha sido mi vida durante estos últimos cinco años, así que comprenderéis que no es tarea fácil. Es llegado este momento cuando te das cuenta de cuánto tienes que agradecer y a cuanta gente. Intentaré concentrar en estas líneas la gratitud que siento hacia todas las personas que han colaborado en esta “reorganización”, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

En primer lugar darles las gracias a mis directores de tesis. A la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles por haberme concedido la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Gracias Ángeles por haber creído en mí, haberme apoyado de manera totalmente incondicional desde el principio, por defender sin límites aquello en lo que crees, por tu dedicación, esfuerzo e ilusión, por enseñarme que “piedrita a piedrita se hace pared”, por tu perfección que hace que la mía sea insignificante, por hacerme sentir tan orgullosa del mini-equipo que formamos... Pero sobre todo, por tu cariño, aunque nunca te lo he dicho eres mi “mami” valenciana, que no te quepa duda que has sido la mejor directora de tesis que podría haber tenido y que porque de momento hacer otra tesis no está en mis planes, si no te elegiría de nuevo. Al Dr. Juan Vicente Esplugues Mota porque sin su apoyo este camino hubiera sido imposible, especialmente agradecerle de forma conjunta con el Dr. Juan Esplugues Requena su ayuda a los jóvenes investigadores.

A mis compis de laboratorio, especialmente a ti Samu o mejor dicho... “Deditos de príncipe”, “Samulin colorado”, “Ordenillos”... sé que me vas a matar por poner esto aquí... Pero con ellos quería reflejar que aunque ya éramos amigos antes de que la ciencia apareciera en nuestras vidas, ahora te has convertido en uno de esos amigos que se cuentan con los dedos de la mano. Gracias Samu por todo y por todos los momentos que hemos vivido antes y durante esta etapa. Silvi, mi “Super nanny” gracias por cuidarme, por escucharme, por tus consejos, por tus sustos, por tantos momentos de risas e historias de ciencia ficción, por tus miles de detalles, por tus chuches, tus cocas, tus tortillas... Jesús, gracias por tu buen rollo, por tu alegría, por nuestras conversaciones filosóficas a la hora del café y sobre todo “Cosin” por convertirte en mi amigo. Amparo y Dora, mis “suegras de oro”, gracias por ser tan excelentes personas, en especial gracias a Amparo por toda la trabajera montando cordones, sin ti esta tesis no tendría sentido, pero sobre todo gracias por las charlas en cultivos con las cuales he crecido personalmente, por hacerme ver que todavía quedan personas

con valores, con ideales y que defienden sus principios. Amelia, gracias porque con tus locuras has alegrado mis días, conseguías que el café siempre acabara en risas. Mario, gracias por no dejar que me hundiera en el pozo, por sacarme la sonrisa cada día, por los vales, por las tardes de montaditos y las noches de traca, por buscarme un puente bajo el que dormir en San Diego, gracias por hacerme sentir que aunque este a miles de kilómetros de aquí puedo contar contigo para lo que necesite, por ser uno de mis amarillos. A ti, Cris, gracias por intentar ir a correr conmigo, por nuestras conversaciones de “footing” y sobre todo por ser la alegría en persona, porque así da gusto ir a trabajar. A Maruja, por sus historias de juventud, por sus buenos días y por clasificarme como persona “normal”. Raquel y María, aunque acabéis de llegar al laboratorio gracias por la alegría que desprendéis, podría haber pinitoles todos los días!!!.

A los que aún están, Ana, Haryes, Víctor, Dolo, Nade, Lara, Jorge, Brian... y a los que estuvieron, Sonia, Jackie, Josep, Bibi, Antonio, Wilfredo, Annia, Irene, Reme, Miriam, Dani, Elena, Natalia, Clara... gracias a todos vosotros por haber colaborado de una u otra forma a la realización de esta tesis. A l@s “mayores”, Loles, Sara, M<sup>a</sup> Ángeles, Carlos, Elsa, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar, por aportar ideas, consejos y por ser un ejemplo de dedicación a la ciencia.

Klaus Ley, como responsable de mi estancia en San Diego, gracias por tener siempre una solución para cualquier problema, por ir siempre con una sonrisa, por permitirme ver la ciencia desde otra perspectiva, pero sobre todo por hacer mi estancia tan sencilla, agradable y fructífera.

A los donantes, enfermeras, técnicos, médicos y demás personas que aunque no aparezcan aquí con nombre y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

Además de a las personas directamente relacionadas con mi vida científica quiero dar las gracias especialmente a todas aquellas

personas que indirectamente pero activamente han hecho que en este momento esté escribiendo estas líneas...

A mis padres por haberme enseñado que la vida es para los valientes y hacer de la frase “el que no arriesga no gana” mi filosofía de vida. De vosotros he aprendido que no vale todo en esta vida y que la dignidad es un cimiento firme sobre el que sentirse seguro. Por estar incondicionalmente a mi lado en los buenos y en los malos momentos, animándome siempre a continuar. Por llamarme todos los días de esta tesis únicamente para oír mi voz, para saber si estoy bien, aguantando de vez en cuando mis malos ratos, mi mal humor... Siempre al pie del cañón. Mamá...gracias especialmente a ti, por el cariño y la fuerza de esos email que han hecho que se me salten las lágrimas cientos de veces a primera hora de la mañana. Por ser tan comprensivos, generosos, tiernos.... Habéis hecho que me sienta orgullosa de ser como soy y eso os lo debo a vosotros. Necesitaría un millón de tesis para agradecer todo lo que me habéis aportado...Aunque no os lo diga tanto como debería... os quiero con locura.

A mi hermana, Rebe, aunque llevemos media vida jugando al ratón y al gato, cada una en una punta de España, sé que siempre estás aquí, a mi ladito, apoyándome y queriéndome. Gracias por compartir conmigo miles de experiencias, anécdotas, viajes, locuras, cotilleos y toneladas de risas. Por hacer de todo lo que hemos vivido juntas momentos especiales. Te quiero pequeña!!!

A mi familia, que ha sabido disculpar mis ausencias y siempre ha tenido palabras de ánimo. Por preocuparse de cómo iba mi tesis, mi trabajo y mi vida en Valencia. Estoy absolutamente convencida de que si de algo puedo presumir en esta vida es de la gran familia que tengo, lo que me hace sentir la persona más afortunada de este mundo.

A mis amigas las boticarias, porque aunque ya hayan pasado seis años desde que acabamos la carrera y estemos desperdigadas por el mundo, siempre hay ganas de juntarnos y cada vez que lo hacemos es como si no hubiera pasado el tiempo. Gracias por las miles de agujetas

de la risa!!! A mis amigos “los sorianos”, que tendrá el agua de Soria, o ese gen Numantino... que duros que somos!!! Tres haciendo la tesis... Fati la excepción que confirma la regla... gracias por estar ahí siempre, por preocuparte, por escucharme, por tus esfuerzos por juntarnos todos. Patri, mi segunda hermana, gracias por ser como eres, tan “ladie”, tan mona, tan tú... Inés, tu por partida doble, gracias por tu apoyo, por tus visitas, tus charlas, tus confidencias, tus risas, tu tiempo. A mi profesor de italiano por llenar mi final de tesis de sonrisas y del mejor tiramisú del mundo. A mi Pelu, gracias por ser el rey de nuestros castillos, pero lo más importante, por hacer feliz a la princesa. A Mele, Laura, Laurita, Jorge, Terry, Prassun... Gracias a todos vosotros por lo que hemos vivido juntos antes y durante este tiempo y por todo lo que nos deparará el futuro.

***Mil gracias a todos...***



## **ABREVIATURAS**





**3TC:** Lamivudina

**ABC:** Abacavir

**ADA:** Adenosina deaminasa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADP:** Adenosin difosfato

**AK:** Adenilato quinasa

**AMP:** Adenosin monofosfato

**APV:** Amprenavir

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosin trifosfato

**ATV:** Atazanavir

**BCA:** Ácido bicinconínico

**BGG:** "Brilliant Blue G pure"

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**cART:** Terapia antiretroviral combinada

**Cmax:** Concentración plasmática máxima

**CT:** Colesterol total

**CV:** Carga viral

**DCFH-DA:** Diclorofluoresceína-diacetato

**ddC:** Zalcitabina

**ddI :** Didanosina

**DLV:** Delavirdina

**DPBS:** "Dubelcco's phosphate buffered saline"

**DRV:** Darunavir

**EBM-2:** "Endothelial cell basal medium-2"

**ECL:** "Enhanced luminol-based chemoluminiscent"

**E-NDP-K:** Ecto-nucleósido difosfato quinasa

**EEM:** Error estándar de la media

**EFV:** Efavirenz

**ELAM-1:** "Endothelial leukocyte adhesion molecule-1"

**ENF:** Enfuvirtida

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**E-NPP:** Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa

**E-NTPDasa:** Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ESL-1:** "E-selectin ligand-1"

**ET-1:** Endotelina-1

**ETR:** Etravirina

**fAPV:** Fosamprenavir

**FDA:** "Food and Drug Administration"

**FITC:** Fluoresceína

**FTC:** Emtricitabina

**GA:** "Gentamicine sulfate amphotericine B"

**GC:** Guanilil ciclase

**GESIDA:** Grupo de Estudio de SIDA

**GMPc:** Guanosin monofosfato cíclico

**GTP:** Guanosina trifosfato

**HBSS:** "Hank's balanced salt solution"

**HDL-c:** "High-density lipoprotein-cholesterol"

**hFGF-B:** "Human fibroblast growth factor-basic"

**HRP:** "Horseradish peroxidase"

**HSA:** Albúmina sérica humana

**HUAEC:** Células endoteliales de arteria de cordón umbilical humano

**HUVEC:** Células endoteliales de venas de cordón umbilical humano

**IC:** Intervalo de confianza

**ICAM-1:** "Intercellular cell adhesion molecule-1"

**ICCR5:** Inhibidores del co-receptor CCR5

**IDV:** Indinavir

**IF:** Inhibidores de la fusión

**II:** Inhibidores de la integrasa

**IKB- $\alpha$ :** Inhibidor de NF-KB

**IL:** Interleucina

**IP:** Inhibidores de proteasa

**ITIAN:** Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido

**ITINAN:** Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

**JAM-3:** "Junctional adhesion molecule-3"

**JAMA:** "Journal of the American Medical Association"

**LFA-1:** "Lymphocyte function associated-1"

**LPV:** Lopinavir

**Mac-1:** "Macrophage 1 antigen "

**MCP-1:** "Monocyte chemotactic protein-1"

**MIP-1 $\alpha$ :** "Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ "

**MRC:** Maraviroc

**NF-KB:** Factor nuclear kappa B

**NFV:** Nelfinavir

**NO:** Óxido nítrico

**NVP:** Nevirapina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ONUSIDA:** Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA

**OR:** Odds ratio

**PAF:** Factor activador de plaquetas

**PAM:** Presión arterial media

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica

**PBS:** "Phosphate buffered saline"

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PE:** Ficoeritrina

**PECAM-1:** "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1"

**PMN:** Células polimorfonucleares de sangre periférica

**PNP:** Purino nucleósido fosforilasa

**PSGL-1:** "P-selectin glycoprotein ligand-1"

**R<sup>3</sup>-IGF-1:** "Recombinant long R<sup>3</sup> Insuline-like growth factor-1"

**RAL:** Raltegravir

**rhEGF:** "Recombinant human epidermal growth factor"

**RPMI:** "Roswell park memorial Institute medium"

**RPV:** Rilpivirina

**RR:** Riesgo relativo

**RTV:** Ritonavir

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**SQV:** Saquinavir

**T20:** Enfuvritide

**TDF:** Tenofovir

**TG:** Triglicéridos

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TPV:** Tripanavir

**UDP:** Uridina difosfato

**UTP:** Uridina trifosfato

**VCAM-1:** "Vascular cell adhesion molecule-1"

**VEGF:** "Vascular endotelial growth factor"

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VLA-4:** "Very late antigen-4"

**vWF:** Factor de von Willebrand

**ZDV:** Zidovudina

# ÍNDICE



<b>I. RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>29</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>1. INFECCIÓN POR VIH, SIDA Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL.....</b>	<b>37</b>
1.1 Generalidades de la infección .....	37
1.2 Ciclo biológico del VIH .....	40
1.3 Fármacos antirretrovirales .....	42
1.3.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN) .....	44
1.3.2 Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINAN) .....	47
1.3.3 Inhibidores de la proteasa (IP) .....	48
1.3.4 Inhibidores de la fusión (IF) .....	50
1.3.5 Inhibidores del co-receptor CCR5 (ICCR5) .....	50
1.3.6 Inhibidores de la integrasa (II).....	50
1.4 Terapéutica recomendada en la actualidad .....	51
1.5 Efectos adversos de la terapia antirretroviral .....	53
1.5.1 Toxicidad asociada a los fármacos ITIAN .....	54
1.5.2 Toxicidad asociada a los fármacos ITINAN .....	55
1.5.3 Toxicidad asociada a los fármacos IP .....	55
1.6 Terapia antirretroviral vs. enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio .....	56
1.6.1 ITIAN vs. enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio .....	59
<b>2. PROCESO INFLAMATORIO: ACUMULACIÓN LEUCOCITARIA .....</b>	<b>61</b>
2.1 Generalidades del proceso inflamatorio .....	61
2.2 Interacción leucocito-endotelio .....	62
2.3 Papel del ATP en el proceso inflamatorio .....	68
2.3.1 Liberación extracelular de nucleótidos bajo condiciones fisiológicas/patológicas .....	68
2.3.2 Señalización purinérgica .....	69
2.3.3 Ruta de degradación/formación del ATP .....	72

2.3.4 Implicación de los fármacos ITIAN análogos de purina en la señalización purinérgica y en la toxicidad cardiovascular .....	74
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>77</b>
<b>IV. METODOLOGÍA .....</b>	<b>81</b>
<u>MÉTODOS</u> .....	83
<u><b>BLOQUE I: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i></b></u> .....	83
<b>1. CULTIVO Y AISLAMIENTO CELULAR .....</b>	<b>83</b>
1.1 Cultivo de células endoteliales .....	83
1.2 Aislamiento de leucocitos .....	85
1.2.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN) .....	85
1.2.2 Leucocitos mononucleares (PBMC) .....	85
<b>2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO .....</b>	<b>86</b>
<b>3. ADHESIÓN DINÁMICA EN CÁMARA PARALELA DE FLUJO .....</b>	<b>89</b>
3.1 Parámetros leucocitarios a determinar .....	92
3.2 Protocolo experimental .....	93
<b>4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN         POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....</b>	<b>94</b>
4.1 Células endoteliales .....	95
4.1.1 Protocolo experimental .....	95
4.2 Leucocitos .....	96
4.2.1 Protocolo experimental .....	96
<b>5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ATP INTRACELULAR .....</b>	<b>97</b>
5.1 Células endoteliales .....	98
5.2 Leucocitos .....	99
5.3 Protocolo experimental .....	99
<b>6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>100</b>
6.1 Células endoteliales .....	100
6.2 Leucocitos .....	100
6.3 Obtención de extractos proteicos citosólicos y nucleares .....	101
6.4 Determinación de la cantidad de proteína: ensayo del ácido bicinconínico (BCA) .....	101



6.5 Western blot .....	103
6.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	103
6.5.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa .....	104
6.5.3 Incubación con anticuerpos .....	104
6.5.4 Revelado: Detección por quimioluminiscencia .....	106
6.5.5 Reutilización de membranas de nitrocelulosa “stripping” .....	106
<b>7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: CITOMETRÍA</b>	
<b>ESTÁTICA</b> .....	107
7.1 Producción de ERO .....	108
7.1.1 Protocolo experimental .....	108
<u><b>BLOQUE II: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i></b></u> .....	109
<b>1. MICROSCOPIA INTRAVITAL</b> .....	109
1.1 Parámetros leucocitarios a determinar .....	111
1.2 Parámetros hemodinámicos a determinar .....	112
1.3 Protocolo experimental .....	112
<u><b>MATERIAL</b></u> .....	115
<u><b>COMITÉS ÉTICOS</b></u> .....	118
<u><b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b></u> .....	118
<b>V. RESULTADOS</b> .....	119
<u><b>BLOQUE I: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i></b></u> .....	121
<b>1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE ITIAN SOBRE LA INTERACCIÓN         LEUCOCITO-ENDOTELIO</b> .....	121
1.1 Efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio .....	121
1.2 Efecto de otros fármacos ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio .....	125
1.3 Estudio comparativo del efecto de las combinaciones de ITIAN empleadas frecuentemente en la terapéutica actual sobre la interacción leucocito-endotelio .....	129

<b>2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ITIAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN .....</b>	<b>131</b>
2.1 Estudio del efecto de ABC y ddi sobre la expresión de moléculas de adhesión .....	131
2.1.1 Células endoteliales .....	131
2.1.2 Leucocitos humanos .....	134
2.2 Estudio del efecto de otros ITIAN sobre la expresión de moléculas de adhesión .....	137
2.2.1 Células endoteliales .....	137
2.2.2 Leucocitos humanos .....	138
<b>3. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC Y ddi .....</b>	<b>140</b>
<b>4. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL ENDOTELIO EN ESTA RESPUESTA .....</b>	<b>143</b>
4.1 Análisis del tipo celular implicado (endotelio o leucocito) en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC .....	143
4.2 Producción de ERO en células endoteliales tras su tratamiento con ABC o ddi .....	145
4.3 Determinación del efecto de ABC sobre los factores de transcripción IKB- $\alpha$ y NF-KB en células endoteliales .....	148
4.4 Determinación de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales tras su tratamiento con ABC o ddi a tiempos más largos .....	150
<b>5. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA RUTA DEL ATP EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC Y ddi .....</b>	<b>153</b>
5.1 Cuantificación de ATP intracelular .....	154
5.1.1 Células endoteliales .....	154
5.1.2 Leucocitos .....	154
5.2 Determinación de los niveles de proteínas CD73 y CD39 .....	155
5.2.1 Células endoteliales .....	156
5.2.2 Leucocitos .....	157

5.3 Análisis de la implicación del ATP y sus receptores en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC .....	158
<b><u>BLOQUE II: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i></u></b> .....	161
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO .....	161
2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS EN SANGRE DE RATA .....	163
3. ESTUDIO DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC O ddl <i>IN VIVO</i> .....	165
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	169
<b>VII: CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	185
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	191
<b>IX. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS</b> .....	209



## **I.RESUMEN/SUMMARY**



Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN) son una familia de fármacos empleados en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este grupo de antirretrovirales está presente en todas las opciones terapéuticas en combinación con fármacos antirretrovirales de otras familias. La administración de estos compuestos, en particular de abacavir (ABC) y didanosina (ddI), se ha asociado con la aparición de efectos adversos a nivel cardiovascular; sin embargo los mecanismos responsables permanecen sin esclarecer.

Empleando modelos *in vitro* e *in vivo*, hemos evaluado los efectos de concentraciones clínicamente relevantes de estos antirretrovirales sobre la interacción leucocito-endotelio, la cual es el primer paso en la génesis de las enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio tales como infarto de miocardio, aterosclerosis y trombosis.

ABC (fármaco más utilizado de esta familia y análogo de purina), indujo la interacción de leucocitos con el endotelio (venoso y arterial) *in vitro* e *in vivo* así como un incremento en la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos y monocitos tanto humanos como de rata. Aunque la expresión de ICAM-1 no se vio modificada por este fármaco, la acumulación leucocitaria inducida por ABC se debe a la interacción Mac-1/ICAM-1, esto se hace evidente por el hecho de que anticuerpos bloqueantes frente a estas moléculas previnieron los diferentes parámetros leucocitarios. Los estudios en los que cada tipo celular (endotelio o leucocitos) fue tratado individualmente indican que el endotelio también posee un papel importante en esta respuesta. Además, a nivel endotelial, ABC

## I.RESUMEN

---

promueve la producción de ERO, así como la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y la pérdida citosólica de su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Nuestros estudios mostraron una relación estructura-actividad debido al modo en el que los diferentes antirretrovirales actúan: Así, ddI (análogo de purina) reprodujo los efectos tóxicos de ABC, mientras que los análogos de pirimidina lamivudina (3TC), zidovudina (ZDV) y emtricitabina (FTC) o el análogo de nucleótido tenofovir (TDF) no produjeron cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados. Esto sugiere que ABC y ddI están afectando a la ruta de señalización purinérgica y que el ATP está implicado en estos efectos. De este modo, ABC causó tanto un incremento en los niveles de ATP intracelular como una reducción de la expresión de CD73 (enzima responsable de la degradación del ATP) tanto a nivel endotelial como leucocitario. Además, comprobamos el papel del ATP a través de sus receptores P2X<sub>7</sub> en el reclutamiento leucocitario inducido por este ITIAN.

Por último, la combinación terapéutica ABC/3TC produce el mismo efecto proinflamatorio que ABC. Sin embargo, la alternativa terapéutica FTC/TDF no promueve dichos efectos.

En conclusión, el presente trabajo describe el mecanismo proinflamatorio por el cual los ITIAN análogos de purina y más concretamente, ABC, inducen la acumulación leucocitaria previa al desarrollo de patologías cardiovasculares. Además, destaca la importancia de la estructura química de estos fármacos en el desarrollo de estos efectos tóxicos y apoya la asociación clínica entre estos fármacos y las patologías cardiovasculares.



Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) are a family of drugs used in the treatment of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. This antiretroviral group is a constant in all therapeutic options in combination with drugs from other antiretroviral families. The administration of these compounds, especially abacavir (ABC) and didanosine (ddI), has been linked with cardiovascular side effects, though the mechanism implicated remains unclear.

Using *in vitro* and *in vivo* models, we evaluated the effects of clinically relevant concentrations of these antiretroviral drugs on leukocyte-endothelium interactions, which are the first phase in the onset of cardiovascular diseases with an inflammatory component, such as myocardial infarction, atherosclerosis and thrombosis.

ABC (the most employed drug of this family and a purine analogue), induced leukocyte-endothelium (venular and arteriolar) interactions *in vitro* and *in vivo*, and enhanced the expression of the leukocyte adhesion molecule Mac-1 (CD11b/CD18) on neutrophils and monocytes from both human and rat blood. Although ICAM-1 expression was not modified by ABC, the leukocyte accumulation it induced was mediated by Mac-1/ICAM-1 interaction; this was evident in the fact that blocking antibodies against these adhesion molecules prevented the different leukocyte parameters. Further studies in which each cellular type (endothelium or leukocyte) was treated individually revealed that the endothelium also played a key role in this response. Moreover, at the endothelial level, ABC was found to promote reactive oxygen species (ROS) production, as well as

## I.SUMMARY

---

translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus and cytosolic degradation of its inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Our studies have highlighted a structure-activity relationship in the way the different antiretroviral drugs work: didanosine (ddI, purine analogue) reproduced the toxic effects of ABC, while the pyrimidine analogues lamivudine (3TC), zidovudine (ZDV) and emtricitabine (FTC) or the nucleotide analogue tenofovir (TDF) did not produce significant changes in either of the parameters evaluated. This suggests that ABC and ddI exert an effect on the purine signalling pathway, and that the ATP molecule is implicated in these effects. In this way, ABC increases intracellular levels of ATP and undermines the expression of CD73 (an enzyme responsible for the degradation of ATP) on the endothelium and on leukocytes. Furthermore, it has been observed that the role of ATP in the leukocyte recruitment induced by this NRTI takes place through its P2X<sub>7</sub> receptors.

Finally, the therapeutic combination of ABC/3TC produced the same proinflammatory effect than ABC. However, the alternative combination of FTC/TDF did not promote this action.

In conclusion, the present study highlights the proinflammatory mechanism by which the purine analogues NRTI, and specifically ABC, induce leukocyte accumulation which precedes the development of cardiovascular diseases. It also highlights the relevance of the chemical structure of these drugs in the genesis of this toxic effect and supports a clinical association between these drugs and cardiovascular pathologies.

# **I.INTRODUCCIÓN**



### **1. INFECCIÓN POR VIH, SIDA Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL:**

#### **1.1 GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN:**

Los primeros casos de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) se comunicaron a principios de la década de 1980 cuando se diagnosticaron los primeros enfermos de la naciente pandemia, conocida actualmente como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) <sup>1</sup>.

Este virus pertenece a la familia de los retrovirus, concretamente a la subfamilia lentivirus. Se conoce la existencia de dos tipos, VIH-1 y VIH-2, identificados ambos como agentes causales del SIDA. Aunque poseen la misma organización genética, difieren en las glucoproteínas de su envoltura. El VIH-1 es el más virulento e infeccioso siendo el causante de la mayoría de las infecciones en el mundo mientras que el VIH-2 es menos transmisible y patogénico, por ello se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental <sup>2, 3</sup>.

La infección por VIH se asocia a una intensa replicación viral en el organismo humano que tiene lugar principalmente en linfocitos T CD4+ pero también puede ocurrir, aunque en menor medida, en monocitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y células de la microglía del cerebro. Los mecanismos inmunológicos de la persona infectada permiten neutralizar los nuevos viriones y regenerar las células inmunes que se destruyen aceleradamente, lográndose un equilibrio entre la cantidad de virus circulante, conocida como carga viral (CV) y el sistema inmunológico, medido habitualmente como recuento de linfocitos T CD4+. De esta manera, la persona infectada se mantiene

## II.INTRODUCCIÓN

---

asintomática; sin embargo, después de un periodo variable de tiempo se rompe este equilibrio, la CV comienza a aumentar y los recuentos de linfocitos T CD4+ declinan progresivamente <sup>4-6</sup>. Este deterioro inmunológico permite la aparición de diversas infecciones, clásicas y oportunistas, con lo que llega la etapa de SIDA <sup>7</sup>, que de no mediar tratamiento, en un plazo relativamente corto de tiempo lleva a la muerte.

Lejos todavía de conseguir una vacuna para el VIH, la prevención primaria sigue siendo la forma más eficiente para prevenir la epidemia y el tratamiento antirretroviral constituye la herramienta clave para frenar tanto la magnitud de los síntomas como el número de muertes de los pacientes infectados.

La terapia antirretroviral combinada (cART) suprime, en la mayoría de los casos, la replicación viral con lo que la CV se hace indetectable, se detiene el deterioro del sistema inmunológico y se recupera cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune <sup>8</sup> permitiendo tanto alargar como mejorar la calidad de vida de estos pacientes, evitando llegar a la fase de SIDA. Se recomienda el inicio del tratamiento cuando el recuento de linfocitos T CD4+ se encuentra por debajo de 350 células/ $\mu$ L o tras la aparición de síntomas inequívocos de la enfermedad <sup>9</sup>. Desafortunadamente, con esta cART no se logra erradicar el genoma viral de los tejidos reservorio por lo que su suspensión conlleva a la reaparición del virus circulante y a un nuevo deterioro inmunológico y clínico. Así, las terapias actuales deben considerarse de por vida.

Según datos recogidos en el último informe realizado a finales del 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA), existen en la actualidad 34 millones de personas

viviendo con el VIH, esta tasa es la más alta registrada desde que se notificaron los primeros casos de la infección. Este ascenso en el número de infectados se debe [además de a las nuevas infecciones contraídas cada año (2.5 millones en 2011) y al descenso en el número de muertes asociadas al VIH (1.7 millones en 2011, un 24 % menos que en 2005)] al incremento en el número de personas que tienen acceso a la terapia antirretroviral (8 millones en 2011, un 63 % más que en 2009) y por lo tanto a sus efectos beneficiosos los cuales prolongan la vida del enfermo <sup>10</sup>. En consecuencia, pese a que el número de personas infectadas por VIH en todo el mundo continúa aumentando, el acceso generalizado a la cART (especialmente en el primer mundo) ha supuesto una esperanzadora reducción en el número de muertes.

Sin embargo, la disminución de la mortalidad por causas definitorias de SIDA ha desvelado un aumento paralelo en diferentes patologías no directamente asociadas al SIDA. Esta nueva situación clínica supone un reto para la medicina e investigación científica en el ámbito del VIH. En la actualidad el aumento de patología oncológica <sup>11, 12</sup>, la alta proporción de enfermedades cardiovasculares (actualmente la tercera causa de muerte en los pacientes infectados por VIH en EEUU) <sup>13, 14</sup> y los problemas que se derivan de la falta de respuesta tras la inmunización por diferentes vacunas <sup>15</sup> son ya una realidad en el manejo clínico de este tipo de pacientes. Por lo tanto, los esfuerzos en investigación se están dirigiendo actualmente a reducir las comorbilidades no asociadas al estadio de SIDA (Eventos no SIDA).

## II.INTRODUCCIÓN

---

### 1.2 CICLO BIOLÓGICO DEL VIH:

Los órganos linfoides, concretamente los ganglios linfáticos, constituyen la principal sede de replicación del virus.

El ciclo replicativo del VIH consta de una serie de fases (Figura 1):

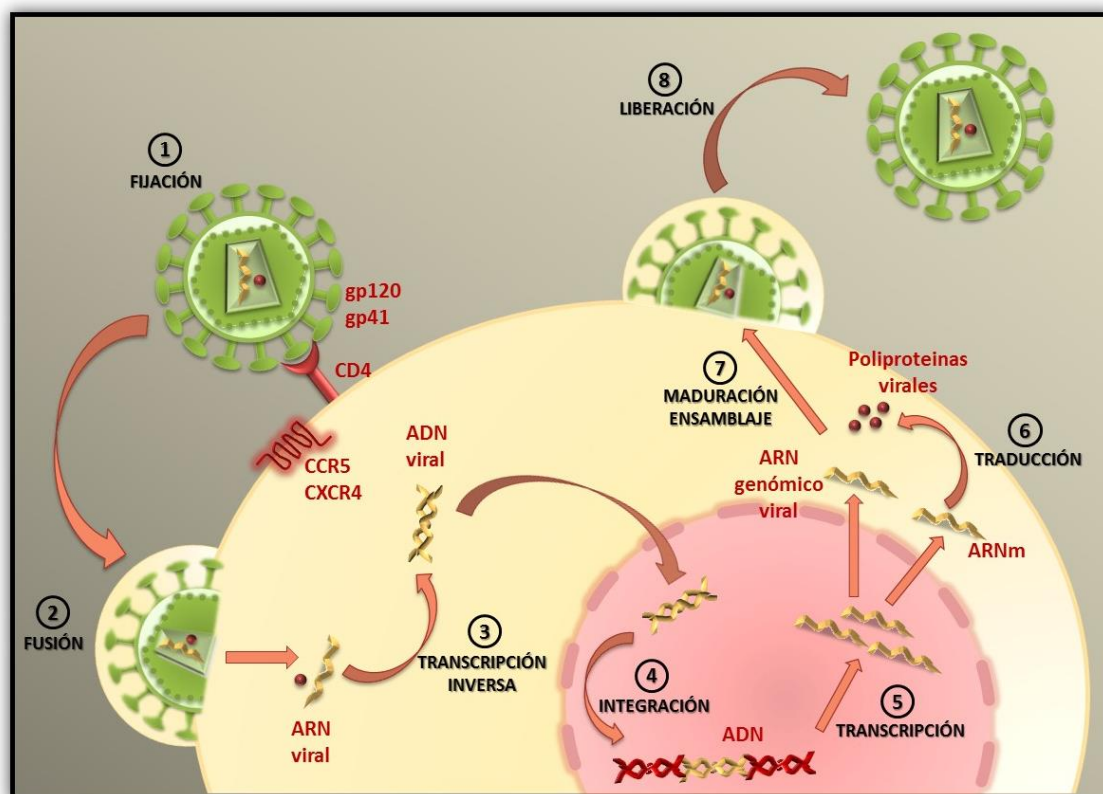
- **Fijación:** La fase inicial de la infección consiste en el anclaje de la partícula viral a la membrana de la célula hospedadora. Esta fijación está mediada por interacciones entre las glicoproteínas gp120 y gp41 de la cubierta viral con receptores celulares CD4, presentes en linfocitos T (CD4+), macrófagos, etc. Simultáneamente, se requiere la unión a un co-receptor de quimiocinas que en linfocitos es CXCR4 y en macrófagos es CCR5, siendo sensibles a la infección sólo aquellas células que expresen estos receptores.
- **Fusión:** Penetración del virus y denudación de su cápside, quedando el ARN viral libre en el citoplasma de la célula hospedadora.
- **Transcripción inversa:** La enzima transcriptasa inversa emplea la cadena de ARN viral como molde y crea una doble cadena de ADN, la cual es translocada al núcleo de la célula hospedadora.
- **Integración:** El ADN viral es insertado en el genoma de la célula hospedadora gracias a la acción de la enzima integrasa. El VIH una vez integrado en el genoma de la célula hospedadora puede replicarse masivamente (viremias altas) tal y como ocurre en la primoinfección y en



los estadios finales, hacerlo de forma controlada (viremias bajas persistentes) o permanecer latente (presencia del virus sin replicación, provirus).

- **Transcripción:** Cuando existe replicación, el ADN viral es transcrito a ARN viral, que a través de los poros nucleares emigra hacia el citoplasma de la célula hospedadora.
- **Traducción:** Una vez en el citoplasma, se produce la traducción del ARNm a poliproteínas virales, las cuales todavía no son funcionales.
- **Maduración y ensamblaje:** Por acción de las proteasas, estas poliproteínas son cortadas formando las proteínas constitutivas del virus, las cuales se ensamblan con ARN virales para formar los componentes de la estructura del virión.
- **Liberación:** Por último, se produce la liberación de los nuevos viriones al exterior celular para poder infectar nuevas células.

## II.INTRODUCCIÓN



**Figura 1.** Esquema representativo del ciclo biológico del VIH. La figura muestra las distintas etapas del ciclo replicativo del virus: Fijación, fusión, transcripción inversa, integración, transcripción, traducción, maduración, ensamblaje y liberación de los nuevos viriones.

### 1.3 FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES:

A finales de la década de los años 80 surgen los primeros fármacos antirretrovirales. Este descubrimiento supuso un gran avance y sobre todo una dosis de esperanza para aquellos enfermos que hasta la fecha únicamente contaban con medicamentos eficaces para paliar parcialmente el deterioro sintomatológico causado por la infección.

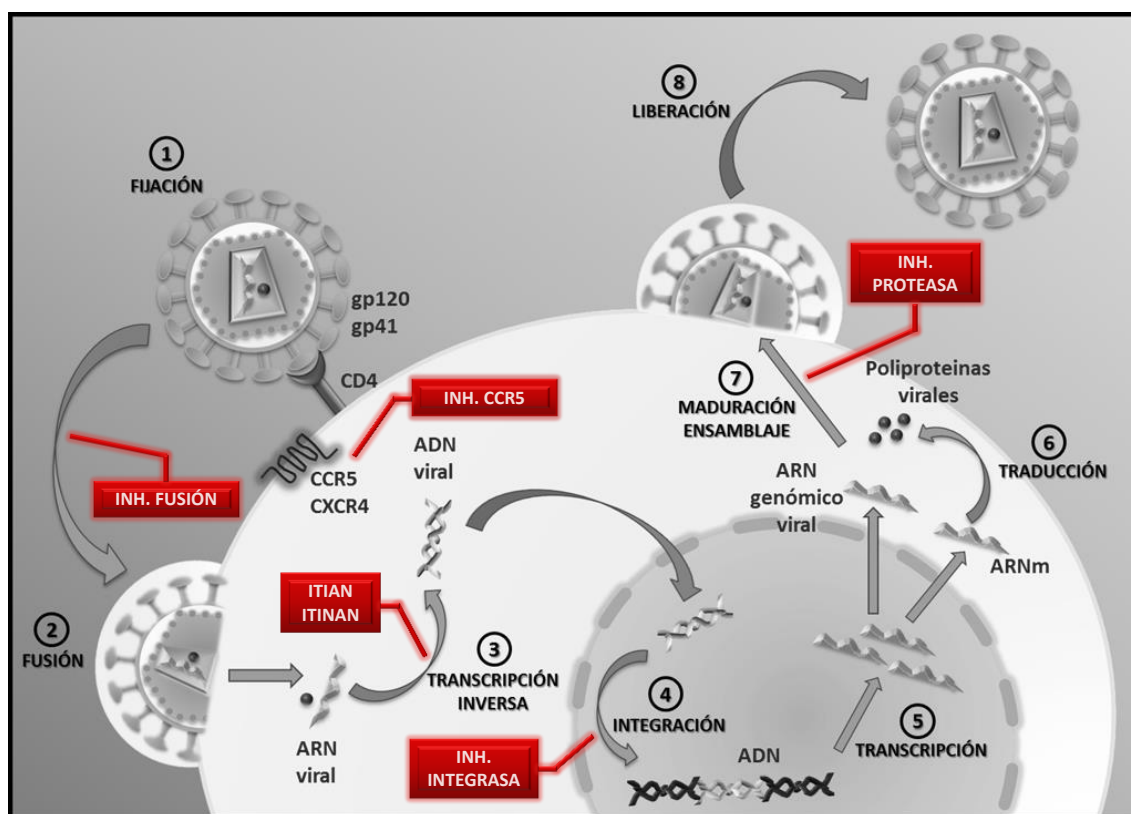
Estos fármacos pioneros en la terapéutica del VIH se administraban en monoterapia o en biterapia demostrando tener una escasa eficacia ya que apenas reducían la replicación viral y por lo tanto, no mejoraban notablemente ni el estado de la infección, ni la sintomatología clínica asociada.

Fue a partir del año 1996 cuando empezó la nueva era antirretroviral denominada cART, la cual se basa en la administración combinada de varios fármacos antirretrovirales, permitiendo, con su empleo continuado, reducir la CV y recuperar progresivamente el número de células CD4+, restaurando con el transcurso del tiempo el sistema inmune del paciente <sup>16, 17</sup>.

Los fármacos antirretrovirales empleados en la cART inhiben diferentes fases del ciclo replicativo del VIH, distinguiéndose así seis grupos farmacológicos <sup>18, 19</sup> (Figura 2):

- Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN).
- Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINAN).
- Inhibidores de la proteasa (IP).
- Inhibidores de la fusión (IF).
- Inhibidores del co-receptor CCR5 (ICCR5).
- Inhibidores de la integrasa (II).

## II.INTRODUCCIÓN



**Figura 2.** Mecanismos por los que actúan los grupos de fármacos antirretrovirales. La figura muestra las diferentes familias de fármacos empleados en la terapéutica del SIDA, así como las fases del ciclo replicativo del VIH donde actúa cada grupo de fármacos.

### 1.3.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN):

El grupo de los ITIAN fue la primera familia de fármacos antirretrovirales que se desarrolló. En concreto la zidovudina (ZDV) fue la pionera de todos ellos, siendo aprobada por la “Food and Drug Administration” (FDA) para el tratamiento del SIDA en 1987 <sup>20</sup>.

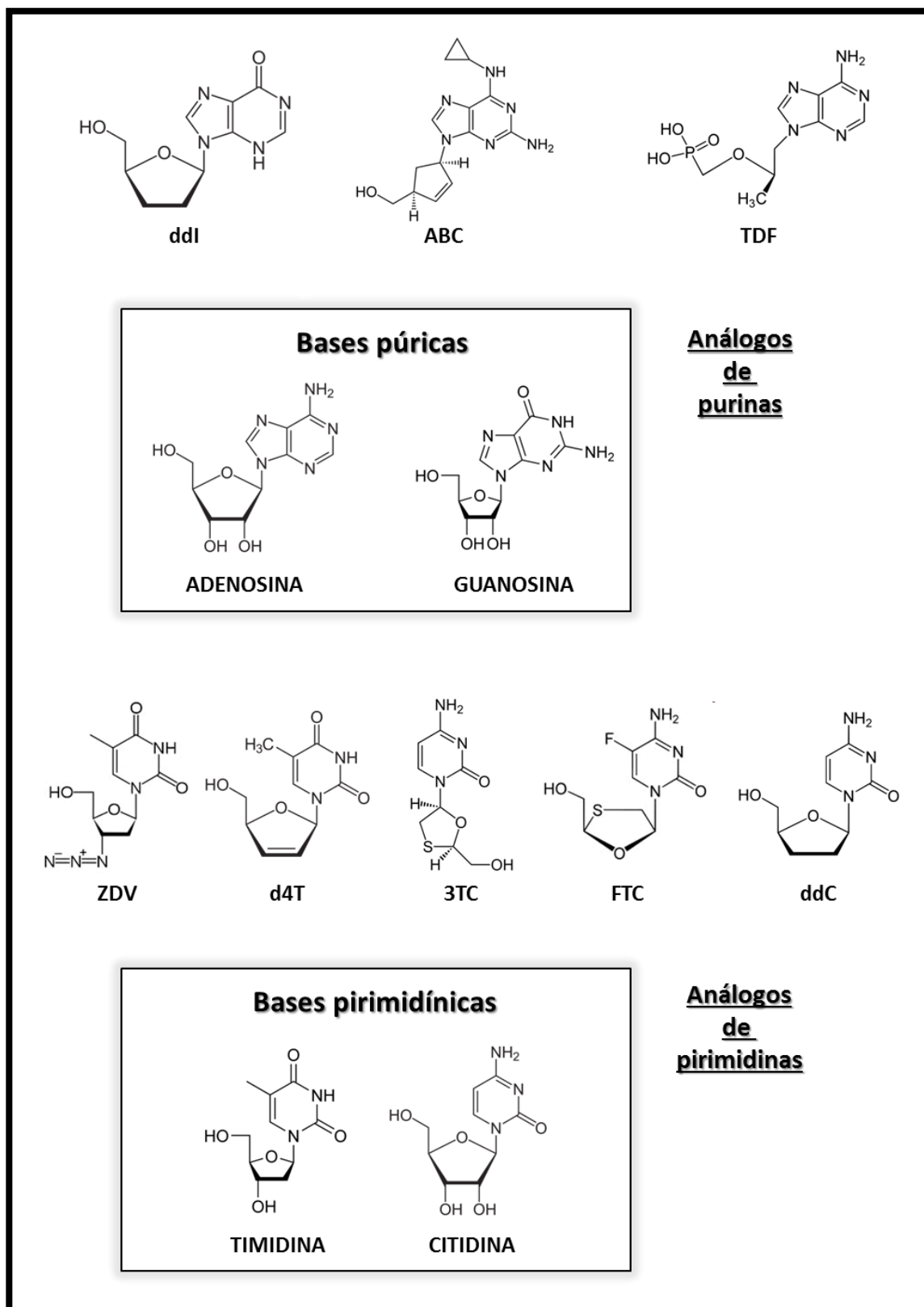
Este grupo de fármacos actúa inhibiendo la enzima transcriptasa inversa, evitando con ello la transformación del ARN viral en ADN viral y por tanto, su integración en el genoma de la célula hospedadora y el consecuente inicio de la replicación (Figura 2). Se trata de una inhibición competitiva con los

nucleósidos/nucleótidos fisiológicos, de los cuales difieren en pequeños cambios estructurales (fundamentalmente en la carencia o modificación del extremo 3' OH de la molécula de ribosa), impidiendo la formación del enlace 3'-5' fosfodiéster entre la cadena de ADN en elongación y el nucleósido 5' trifosfato entrante. Por tanto y en líneas generales, los ITIAN se incorporan a la cadena del DNA viral actuando como "falsos" nucleósidos, impidiendo la elongación de la misma y como consecuencia la replicación viral <sup>21, 22</sup>.

Los ITIAN se dividen, en función de su estructura química, en dos grupos (Figura 3): análogos de bases púricas y análogos de bases pirimidínicas. En el primer grupo se encuentran didanosina (ddI, análogo de adenosina) y abacavir (ABC, análogo de guanosina). Dentro del segundo grupo tenemos zidovudina (ZDV) y estavudina (d4T) que son análogos de timidina y lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) y zalcitabina (ddC) que son análogos de citidina. Todos ellos requieren tres fosforilaciones intracelulares para pasar a estado activo. Sin embargo existe un caso especial, el del tenofovir (TDF). Este fármaco es un análogo de adenina, pero se trata de un nucleótido por lo que sólo requiere de dos fosforilaciones para activarse <sup>23</sup>.

En la actualidad sólo siete de estos ocho ITIAN se encuentran disponibles comercialmente, ya que ddC fue retirado del mercado por su toxicidad y su compleja posología <sup>22</sup>.

## II.INTRODUCCIÓN



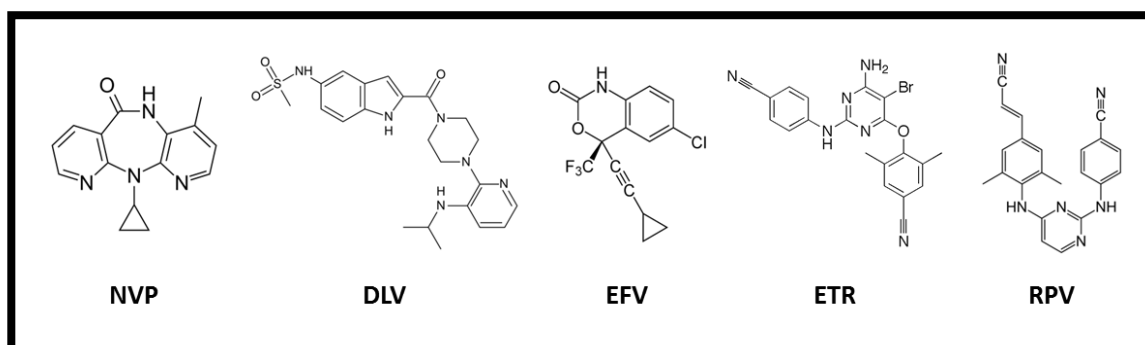
**Figura 3. Fármacos ITIAN.** La figura muestra las estructuras químicas de los distintos ITIAN aprobados para el tratamiento del VIH, así como las moléculas de los nucleósidos de bases púricas y pirimidínicas de las cuales son análogos. Didanosina (ddI), abacavir (ABC), tenofovir (TDF), zidovudina (ZDV), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) y zalcitabina (ddC).

### 1.3.2 Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINAN):

Este grupo de fármacos, al igual que el de los ITIAN, se caracteriza por inhibir la enzima transcriptasa inversa del VIH (Figura 2), pero en este caso lo hace por un mecanismo no competitivo. Desde el punto de vista de su estructura química constituyen un grupo de fármacos muy heterogéneo (Figura 4).

Se caracterizan por ser específicos del VIH-1 y por ser directamente activos (no necesitan ser modificados intracelularmente para ejercer su acción), es decir, se unen directamente a la enzima transcriptasa inversa bloqueándola. Concretamente se unen de manera directa y reversible al centro catalítico de la enzima o a un bolsillo hidrofóbico próximo a este. Esta unión desencadena un cambio conformacional en la transcriptasa inversa, interrumpiendo su actividad DNA polimerasa y por lo tanto, inhibiendo la replicación viral <sup>22, 24</sup>.

Actualmente existen comercializados cinco ITINAN (Figura 4): nevirapina (NVP), delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), etravirina (ETR) y rilpivirina (RPV).



**Figura 4. Fármacos ITINAN.** La figura muestra las estructuras químicas de los distintos ITINAN aprobados para el tratamiento del VIH. Nevirapina (NVP), delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), etravirina (ETR) y rilpivirina (RPV).

## II.INTRODUCCIÓN

---

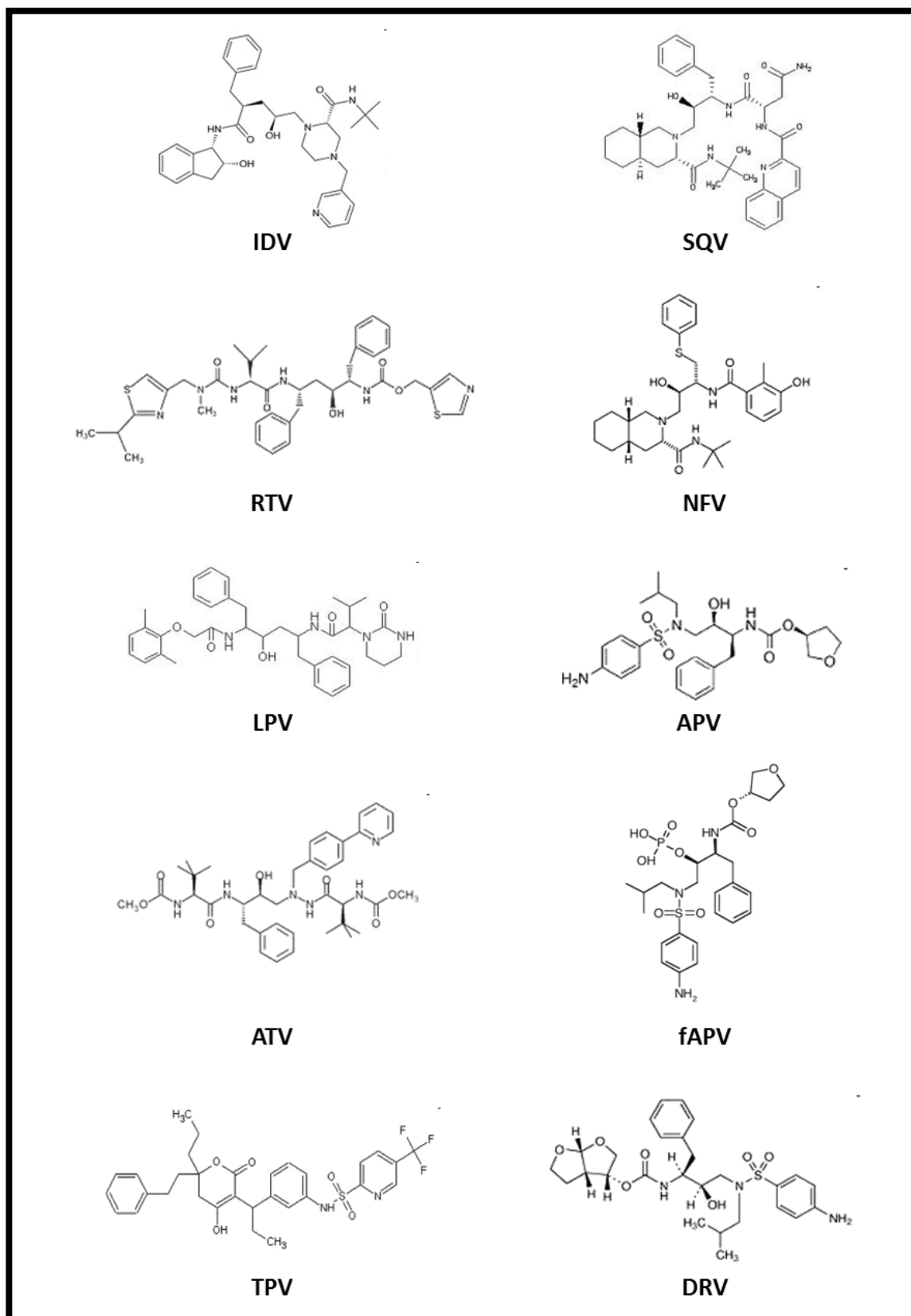
### **1.3.3 Inhibidores de la proteasa (IP):**

Los IP actúan inhibiendo la proteasa del VIH, por lo que impiden la maduración y ensamblaje de las proteínas virales, conllevando a la interrupción del ciclo replicativo del virus <sup>25, 26</sup> (Figura 2).

Son directamente activos, es decir, no necesitan ser modificados intracelularmente para ejercer su acción <sup>22</sup>. Estructuralmente son similares a los péptidos virales (sustrato de la proteasa) y poseen una gran avidéz por el centro activo de la enzima, por lo que tras su unión a él, inactivan la enzima y cesa así su capacidad para crear nuevas proteínas virales funcionales.

Existen diez IP aprobados para el tratamiento de la infección por VIH (Figura 5): indinavir (IDV), saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV), amprenavir (APV), atazanavir (ATV), fosamprenavir (fAPV), tripanavir (TPV) y darunavir (DRV).





**Figura 5. Fármacos IP.** La figura muestra las estructuras químicas de los distintos IP aprobados para el tratamiento del VIH. Indinavir (IDV), saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV), amprenavir (APV), atazanavir (ATV), fosamprenavir (fAPV), tripanavir (TPV) y darunavir (DRV).

## **II.INTRODUCCIÓN**

---

### **1.3.4 Inhibidores de la fusión (IF):**

Esta familia de fármacos se une a la glicoproteína gp41 presente en la cubierta del virus, inhibiendo la fusión de la envoltura del VIH con la membrana de la célula hospedadora y evitando finalmente la entrada del contenido viral al interior celular <sup>27</sup> (Figura 2).

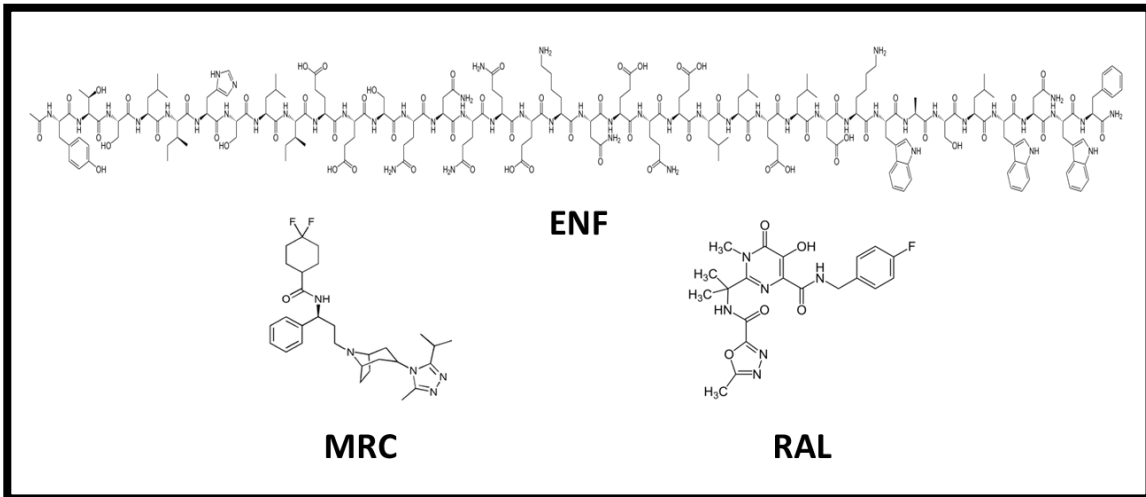
Actualmente únicamente se encuentra disponible comercialmente un fármaco de esta familia, la enfuvirtida (ENF o T-20) (Figura 6). Se administra por vía subcutánea y presenta una baja barrera genética por lo que si no se acompaña de otros antirretrovirales aparecen rápidamente mutaciones de resistencia, perdiendo su eficacia. Estos dos factores hacen que hoy en día el uso de este fármaco en la práctica clínica sea muy limitado <sup>22</sup>.

### **1.3.5 Inhibidores del co-receptor CCR5 (ICCR5):**

Únicamente disponemos de un representante de este grupo, el Maraviroc (MRC) (Figura 6). Actúa impidiendo la entrada del virus a la célula inhibiendo los co-receptores CCR5 presentes en determinadas células hospedadoras, principalmente macrófagos (Figura 2). Por ello, sólo está indicado en el tratamiento de la infección por VIH-1 con tropismo CCR5 y siempre en combinación con otros fármacos antirretrovirales <sup>22, 28</sup>.

### **1.3.6 Inhibidores de la integrasa (II):**

Raltegravir (RAL) (Figura 6) es el único inhibidor de la integrasa disponible comercialmente en la actualidad. Actúa bloqueando la enzima integrasa, impidiendo la integración del genoma viral en el DNA de la célula hospedadora <sup>29</sup> (Figura 2).



**Figura 6. Fármacos IF, ICCR5 e II.** La figura muestra las estructuras químicas los distintos IF, ICCR5 e II aprobados actualmente para el tratamiento del VIH. Enfuvirtida (ENF), maraviroc (MRC) y raltegravir (RAL).

**1.4 TERAPÉUTICA RECOMENDADA EN LA ACTUALIDAD:**

Como hemos comentado anteriormente, los tratamientos con un sólo fármaco e incluso con dos están contraindicados por su escasa eficacia y rápida aparición de resistencias siendo la administración combinada de al menos tres fármacos la que ha demostrado mayor eficacia, conociéndose como cART. La terapia estándar consiste en la administración de tres fármacos: dos ITIAN con un IP, dos ITIAN con un ITINAN o dos ITIAN con un II 30-32.

Las combinaciones terapéuticas recomendadas en la actualidad se indican en la Tabla 1.

## II.INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** cART recomendada en la actualidad.

<b>COMBINACIONES \ PAUTAS</b>	<b>PREFERENTE</b>	<b>ALTERNATIVA</b>
<b>2 ITIAN + 1 ITINAN</b>	<i>FTC/TDF + EFV</i> <i>ABC/3TC + EFV</i>	<i>FTC/TDF + NVP</i> <i>ABC/3TC + NVP</i>
<b>2 ITIAN + 1 IP</b>	<i>FTC/TDF + DRV</i> <i>FTC/TDF + ATV</i> <i>ABC/3TC + ATV</i>	<i>ABC/3TC + DRV</i> <i>FTC/TDF + LPV</i> <i>ABC/3TC + LPV</i>
<b>2 ITIAN + 1 II</b>	<i>FTC/TDF + RAL</i>	<i>ABC/3TC + RAL</i>

Combinaciones de fármacos antirretrovirales empleados actualmente en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH. Estas recomendaciones son una adaptación de las diferentes Guías de Tratamiento Antirretroviral como “Journal of American Medical Association” (JAMA) 2012 <sup>32</sup> y la actualización del Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA) 2013 <sup>31</sup>. Emtricitabina (FTC), tenofovir (TDF), efavirenz (EFV), abacavir (ABC), lamivudina (3TC), darunavir (DRV), atazanavir (ATV), raltegravir (RAL), nevirapina (NVP), lopinavir (LPV).

Actualmente, la administración de la terapia antirretroviral al paciente VIH debe ser considerada de por vida ya que no consigue erradicar el genoma viral de los tejidos reservorio.

El desarrollo de toda la farmacología anti-VIH se ha producido a gran velocidad debido a la gravedad de la infección, apenas 30 años han bastado para crear el arsenal terapéutico antirretroviral del que disponemos en la actualidad. La rápida introducción de estos fármacos en la práctica clínica, junto a otros factores como el hecho de tratarse de una terapia crónica, la reducción de la tasa de mortalidad de los pacientes infectados y el transcurso del tiempo de utilización de estos fármacos han sido determinantes en

la observación y notificación de numerosos efectos adversos asociados a la terapia antirretroviral.

Por tanto, los objetivos de la investigación farmacológica se están dirigiendo hoy en día a dilucidar los mecanismos toxicológicos de esta terapia, a intentar minimizar las comorbilidades asociadas a su administración, así como a buscar las combinaciones farmacológicas más inocuas para el paciente VIH.

### **1.5 EFECTOS ADVERSOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL:**

En líneas generales, tras una exposición aguda a esta terapia, los pacientes manifiestan de forma transitoria alteraciones cutáneas y ungueales (exantemas, erupciones, eccemas, alopecia, onicodistrofia, etc.), trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea, etc.), así como efectos adversos neuropsiquiátricos (alteraciones del sueño, mareo, dificultad de concentración, confusión, cefalea, irritabilidad, nerviosismo, etc.)<sup>31, 33</sup>.

A largo plazo, la terapia antirretroviral puede ocasionar alteraciones metabólicas (dislipemia, resistencia a la insulina, diabetes *mellitus*, etc.), anomalías en la distribución de la grasa corporal, nefrotoxicidad y osteopenia<sup>31, 33</sup>. Esta toxicidad crónica suele asociarse a procesos fisiológicos y/o comorbilidades relacionados con el envejecimiento. Algunas de estas reacciones adversas son específicas de cada fármaco particular y otras generales para cada familia de antirretrovirales.

## II.INTRODUCCIÓN

### 1.5.1 Toxicidad asociada a los fármacos ITIAN:

Entre los efectos adversos que manifiestan más frecuentemente los pacientes tratados con este grupo de fármacos destacan los siguientes: neuropatía periférica, miopatía, acidosis láctica, dislipemia, lipodistrofia, pancreatitis y hepatotoxicidad <sup>31, 34-36</sup>.

Las toxicidades específicas descritas de cada fármaco ITIAN se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Toxicidad de los fármacos ITIAN.

Efectos Adversos	ITIAN						
	ddl	ABC	TDF	FTC	3TC	ZDV	d4T
Acidosis láctica	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Dislipemia	✓	✓			✓	✓	✓
Hepatotoxicidad	✓					✓	✓
Hipersensibilidad		✓					
Hiperuricemia	✓						
Lipodistrofia	✓	✓			✓		✓
Miopatía				✓		✓	
Nefrotoxicidad			✓				
Neuropatía periférica	✓				✓		✓
Pancreatitis	✓				✓		✓
Pérdida de masa ósea			✓				
Riesgo Cardiovascular		✓					

Principales efectos adversos descritos para los fármacos pertenecientes al grupo ITIAN <sup>31, 34-36</sup>. Didanosina (ddl), abacavir (ABC), tenofovir (FDF), emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC), zidovudina (ZDV) y estavudina (d4T).

### 1.5.2 Toxicidad asociada a los fármacos ITINAN:

Los pacientes bajo tratamiento con la familia de fármacos ITINAN manifiestan diferentes efectos adversos, siendo los más frecuentes alteraciones cutáneas y hepatotoxicidad <sup>31, 34-37</sup>.

En la Tabla 3 se detallan las toxicidades individuales descritas de cada fármaco ITINAN.

**Tabla 3. Toxicidad de los fármacos ITINAN.**

Efectos Adversos	ITINAN				
	NVP	DLV	EFV	ETR	RPV
Dislipemia	✓		✓		
Hepatotoxicidad	✓		✓		
Hipersensibilidad	✓				
Reacciones cutáneas	✓	✓	✓	✓	✓
Resistencia a la insulina			✓		
Toxicidad en SNC			✓		

Principales efectos adversos descritos de cada uno de los fármacos pertenecientes al grupo ITNIAN <sup>31, 34-37</sup>. Nevirapina (NVP), delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), etravirina (ETR) y rilpivirina (RPV).

### 1.5.3 Toxicidad asociada a los fármacos IP:

Las principales reacciones adversas vinculadas al tratamiento con fármacos del grupo de los IP son alteraciones del metabolismo lipídico (dislipemia y lipodistrofia) y glucídico (resistencia a la insulina o hiperglucemia) <sup>31, 34, 38-42</sup>.

La toxicidad específica descrita de los IP empleados más frecuentemente en la terapéutica actual se detalla en la Tabla 4.

## II.INTRODUCCIÓN

**Tabla 4.** Toxicidad de los fármacos IP.

Efectos Adversos	IP							
	SQV	RTV	IDV	NFV	LPV	ATV	fAPV	DRV
Dislipemia	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hepatotoxicidad		✓						
Hiperbilirrubinemia			✓			✓		
Lipodistrofia	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
Nefrotoxicidad			✓			✓		
Resistencia insulina	✓	✓	✓	✓	✓		✓	

Principales efectos adversos de los fármacos pertenecientes al grupo IP <sup>31, 34, 38-42</sup>. Saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), fosamprenavir (fAPV) y darunavir (DRV).

### **1.6 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL VS. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES CON COMPONENTE INFLAMATORIO:**

Una vez que el aspecto de la supervivencia en pacientes VIH está garantizado, los esfuerzos actuales en investigación se están centrando en el estudio de comorbilidades asociadas en estos pacientes.

En los últimos años se viene observando un crecimiento en la tasa de mortalidad de enfermos VIH debido a enfermedades cardiovasculares, concretamente un porcentaje superior al 10 % de las muertes en estos pacientes se debe a estas patologías <sup>13, 43, 44</sup>, siendo la tercera causa de muerte en estos enfermos en EEUU <sup>14</sup>. Lo que desconocemos y en lo que se está poniendo especial énfasis es en dilucidar si este aumento del riesgo cardiovascular deriva de la propia infección VIH, del aumento de la esperanza de vida de estos pacientes, del



tratamiento antirretroviral o de una combinación de todos estos factores.

Está descrito que la infección por VIH está asociada a enfermedades vasculares <sup>45</sup>. En este sentido, estudios clínicos afirman que los pacientes infectados por este virus poseen un mayor riesgo de padecer enfermedad prematura de arterias coronarias <sup>46</sup>, aumento de la frecuencia de hipertensión pulmonar <sup>47</sup>, así como una mayor tasa de accidentes cerebrovasculares isquémicos <sup>48</sup>. Se ha observado la formación de depósitos de  $Ca^{2+}$  arteriales <sup>46</sup>, así como la presencia de anomalías en el músculo liso y en el endotelio de vasos pulmonares inducidas por citoquinas proinflamatorias como endotelina-1 (ET-1), interleucina (IL)-1 $\alpha$  e IL-6 y por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en estos pacientes <sup>47</sup>. Además está descrito que la infección por VIH produce una respuesta inflamatoria endotelial. Así, VIH es capaz de penetrar en el miocardio y en el cerebro atravesando el endotelio de arterias coronarias y cerebrales en vacuolas citoplasmáticas empleando una ruta transcelular (transcitosis) e iniciar posteriormente una respuesta inflamatoria y reacciones bioquímicas intracelulares desencadenando finalmente miocardiopatías y alteraciones de la barrera hematoencefálica respectivamente <sup>49</sup>. En este contexto, se han detectado alteraciones severas de la integridad de la estructura del endotelio de la aorta conllevando a cambios fenotípicos/morfológicos, así como un incremento en la acumulación de leucocitos humanos (principalmente monocitos) en el endotelio aórtico de pacientes infectados por virus VIH <sup>50</sup>. También se han descrito niveles superiores de citoquinas proinflamatorias [factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e IL-6], de moléculas solubles [factor de von Willebrand (vWF),

## II.INTRODUCCIÓN

---

fibronectina, endotelina y activador de plasminógeno] y de distintas moléculas de adhesión solubles [“Intercellular cell adhesion molecule-1” (ICAM-1), “Vascular cell adhesion molecule-1” (VCAM-1), E-selectina y “Endothelial leukocyte adhesion molecule-1” (ELAM-1)] en pacientes infectados por VIH que en pacientes control <sup>50-57</sup>. Además, se detectó una correlación entre los niveles plasmáticos de ICAM-1 y la progresión de la enfermedad así como una reducción en el número de células CD4+ <sup>54</sup>.

La posibilidad de que existiera una relación entre terapia antirretroviral y enfermedades cardiovasculares se puso de manifiesto en estudios clínicos que correlacionaron incidencia con período de exposición esta terapia. Así, la incidencia relativa de sufrir infarto de miocardio fue de 0.24, 1.34, 1.73, 1.98 y 2.55 en pacientes tratados con cART durante menos de 1 año, de 1 a 2 años, de 2 a 3 años, de 3 a 4 años y durante más de 4 años respectivamente <sup>58</sup>. Esto se corroboró en hombres y en mujeres jóvenes (18-33 años) infectados por VIH observando una correlación entre tratamiento con terapia antirretroviral y desarrollo de enfermedades coronarias (riesgo relativo (RR) = 2.06,  $p < 0.001$ ) <sup>59</sup>. Adicionalmente, en un estudio realizado en el año 2002 se observó que el 75 % de los pacientes VIH bajo cART presentaba acumulaciones de Ca<sup>2+</sup> a nivel arterial, el cual es indicativo de la formación de la placa aterosclerótica <sup>46</sup>. La terapia antirretroviral se argumenta como potencial responsable de estas enfermedades cardiovasculares debido a la combinación o potenciación de las toxicidades descritas individualmente para cada grupo de fármacos. El hecho de que los pacientes infectados por VIH reciban varios fármacos simultáneamente dificulta el esclarecimiento del papel que cada grupo particular de

antirretrovirales o agentes específicos posee en estos efectos adversos.

Inicialmente, se había apuntado a los IP como los fármacos responsables de la toxicidad cardiovascular ya que producen lipodistrofia e hiperlipidemia <sup>60</sup> [aumento de los niveles de triglicéridos (TG), colesterol total (CT) y del ratio CT/"High-density lipoprotein-cholesterol" (HDL-c)] <sup>61</sup> y a que causan un incremento en el riesgo de sufrir infarto de miocardio <sup>43, 62</sup>. Sin embargo, no se puede descartar al grupo de los ITIAN ya que están presentes en todas las modalidades terapéuticas de la cART y por lo tanto, se administran en combinación con el grupo de los IP, de los ITINAN o incluso con los II.

### **1.6.1 ITIAN vs. enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio:**

La posible relación entre ABC (uno de los ITIAN más empleados) e infarto de miocardio fue detectada por primera vez en el año 2005 <sup>63</sup> y desde entonces ha habido mucha controversia sobre el tema <sup>64</sup>. En los últimos años varios estudios clínicos han confirmado esta relación demostrando que los pacientes tratados con ITIAN análogos de purina (ABC y en menor medida ddi) tuvieron un mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio <sup>65-69</sup>. Datos recogidos en estos ensayos clínicos demuestran que existe un aumento del riesgo de padecer infarto de miocardio en un 90 % y en un 49 % en pacientes tratados con ABC y ddi respectivamente respecto a pacientes tratados con otros ITIAN <sup>66</sup>, y que el RR de sufrir infarto de miocardio se duplica tras el tratamiento con ABC, (RR previo ABC = 2.4/1000/año vs. RR post ABC = 5.7/1000/año) <sup>67</sup>. Estos datos son corroborados por otros dos estudios de cohortes observacionales caso-control en los que afirman que

## II.INTRODUCCIÓN

---

pacientes tratados con ABC poseen un mayor riesgo de infarto de miocardio (Odds ratio (OR) ABC = 2.19, 95 % Intervalo de confianza (IC): 1.19-4.02;  $p < 0.001$  <sup>68</sup> y OR ABC = 1.79, 95 % IC: 1.16-2.776;  $p < 0.001$ ) <sup>69</sup>. Sin embargo, varios estudios son contradictorios a estas observaciones. Concretamente dos ensayos clínicos financiados por la casa que comercializa ABC (GlaxoSmithKline®) y otros dos estudios sin vinculación a la farmacéutica describen que no hay relación alguna entre el uso de estos fármacos y la aparición del infarto de miocardio <sup>70-73</sup> (RR ABC = 2.09/1000/año vs. RR no ABC = 2.57/1000/año) <sup>71</sup>. Debido a todos estos estudios, a día de hoy no se ha clarificado la posible vinculación de los fármacos ITIAN y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El descubrimiento del mecanismo por el cual estos fármacos podrían producir esta toxicidad cardiovascular tendría gran relevancia tanto en la clarificación de este aspecto como en el desarrollo de estrategias que permitieran controlar dichos procesos.

La razón por la que este grupo de antirretrovirales producirían estos efectos adversos no está clara ya que no producen cambios en los factores de riesgo metabólico <sup>65, 66</sup>. Sin embargo, sí se ha observado que pacientes tratados con ABC presentan un incremento en los niveles de marcadores inflamatorios como proteína C reactiva (CRP, 27 %,  $P = 0.02$ ) e IL-6 (16 %,  $p = 0.02$ ) con respecto a pacientes tratados con otros ITIAN <sup>66</sup>. Por otro lado, el hecho de que este efecto se observe tras una exposición aguda ( $< 1$  año de tratamiento) y de que sea revertido cuando se dejan de administrar estos fármacos, apunta hacia un mecanismo de acción rápido de inflamación vascular <sup>65, 66, 74</sup>. En este sentido, ABC produce disminución en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y

aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células endoteliales pulmonares humanas <sup>75</sup>; situaciones ambas que pueden dar lugar a disfunción vascular y acumulación leucocitaria debido a que el óxido nítrico (NO) producido por la eNOS regula la vasodilatación endógena, el diámetro de los vasos y mantiene un ambiente anti-proliferativo y anti-trombótico en la pared vascular <sup>75</sup>, y el aumento de ERO inicia y amplifica la respuesta inflamatoria a través del reclutamiento de leucocitos y del aumento de la expresión de P-selectina y de integrinas  $\beta_2$ , así como del aumento de la liberación del factor activador de plaquetas (PAF) <sup>76, 77</sup>.

La acumulación leucocitaria a la cual conducirían la conjunción de todos los factores anteriormente citados es considerada el primer paso para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio tales como infarto de miocardio, trombosis o aterosclerosis <sup>74, 78</sup>.

## **2. PROCESO INFLAMATORIO: ACUMULACIÓN LEUCOCITARIA:**

### **2.1 GENERALIDADES DEL PROCESO INFLAMATORIO:**

El endotelio vascular es una monocapa continua de células que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos y que separa la sangre del tejido subendotelial. Se trata de un órgano altamente especializado y metabólicamente muy activo que interacciona con otras células y factores humorales regulando no sólo el mantenimiento del tono y la permeabilidad vascular sino también el tráfico leucocitario, la agregación plaquetaria, la coagulación, la fibrinólisis y la angiogénesis.

## **II.INTRODUCCIÓN**

---

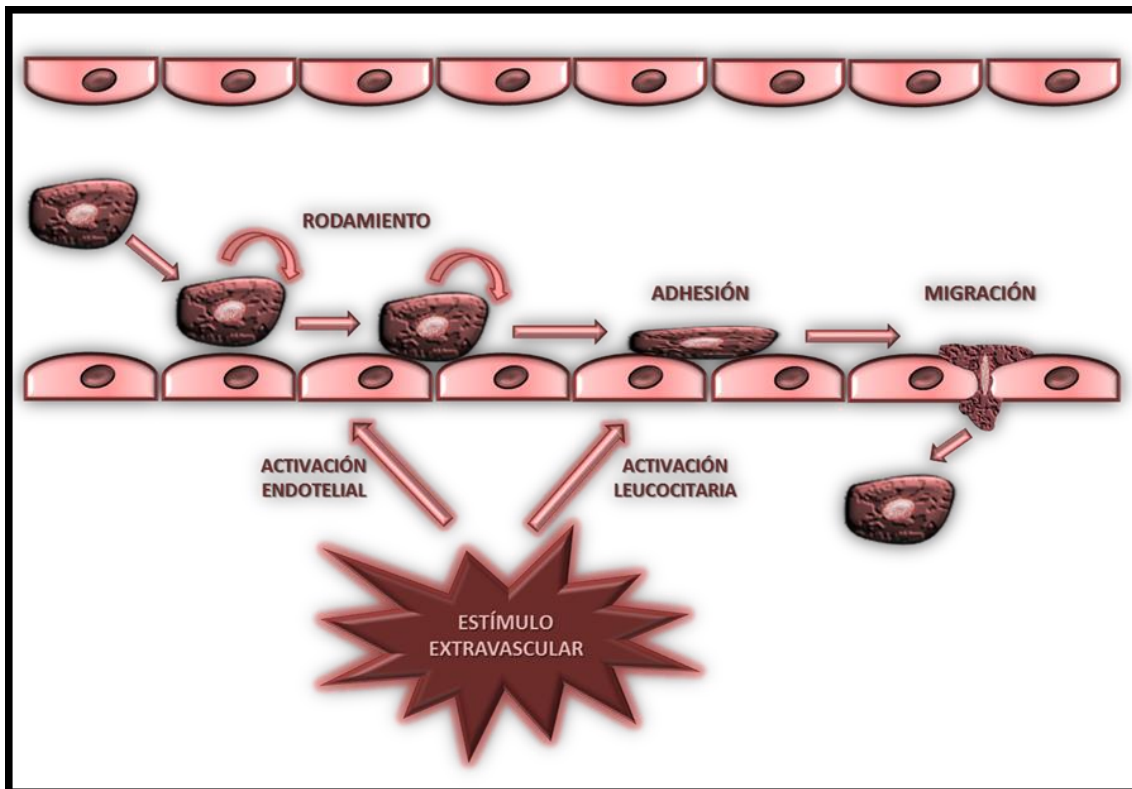
La célula endotelial, por su ubicación entre la sangre y los tejidos, juega un papel crucial en la respuesta inflamatoria. Cuando el endotelio es dañado, se genera una respuesta inflamatoria localizada, debido a que controla el ingreso de mediadores y de células inflamatorias a los focos de la inflamación. Estas funciones son reguladas por cambios en las propiedades adhesivas de las células.

El proceso inflamatorio asociado a diversas patologías tales como aterosclerosis, infarto de miocardio o procesos de isquemia-reperfusión se caracteriza por una acumulación excesiva de células leucocitarias en el endotelio vascular <sup>13, 74, 78, 79</sup>. En este sentido, uno de los primeros estadios del proceso inflamatorio lo constituye la interacción, de manera concertada, entre las moléculas de adhesión presentes en el endotelio vascular y sus correspondientes ligandos existentes en la célula leucocitaria implicada. Esta interacción es inducida por diferentes estímulos y da lugar a la extravasación de leucocitos desde el torrente circulatorio hasta el foco inflamado <sup>78, 80, 81</sup>.

### **2.2 INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

La interacción de los leucocitos con las células endoteliales está mediada por una cascada secuencial de reacciones reversibles y transitorias entre estos dos tipos celulares.

La secuencia de las fases principales por las que los leucocitos interaccionan con el endotelio es la siguiente (Figura 7).



**Figura 7. Fases de la interacción leucocito-endotelio.** La figura muestra las fases de rodamiento, adhesión y migración leucocitarias.

- **Rodamiento o “Rolling” leucocitario:** Inicialmente, los leucocitos producen una deceleración en su tránsito (Figura 7). Este proceso es iniciado por mediadores generados en respuesta a un daño previo, los cuales producen una rápida activación de leucocitos y/o de células endoteliales con el resultado del aumento de la expresión de moléculas de adhesión de la familia de las selectinas (P-selectina, E-selectina y L-selectina) responsables principales de este proceso.

P-selectina y E-selectina en el endotelio interactúan con ligandos presentes en los leucocitos [“P-selectin glycoprotein ligand-1” (PSGL-1), CD44, “E-selectin ligand-1” (ESL-1) y otros ligandos glicosilados] y L-selectina en los leucocitos interactúa con ligandos que

## II. INTRODUCCIÓN

---

se encuentran en las células endoteliales activadas (PSGL-1, mucinas y otros ligandos glicosilados). Estas moléculas de adhesión actúan secuencialmente iniciando los enlaces que conducen a un enlentecimiento de la velocidad de los leucocitos y a un incremento de su contacto con el endotelio <sup>81-83</sup>.

También se han implicado en el rodamiento leucocitario a las integrinas  $\alpha_4$ ; en concreto se ha demostrado que  $\alpha_4\beta_1$  [“Very late antigen-4” (VLA-4)] y  $\alpha_4\beta_7$  median el rodamiento de eosinófilos y de linfocitos respectivamente <sup>84, 85</sup> y que ambas son importantes en procesos inflamatorios crónicos.

Revisiones realizadas en los últimos años señalan la participación de las integrinas  $\beta_2$  en esta fase, en particular se ha descrito que “lymphocyte-function-associated-1” (LFA-1) y “Macrophage 1 antigen” (Mac-1) poseen un papel fundamental en el rodamiento lento de los leucocitos <sup>81, 83</sup>.

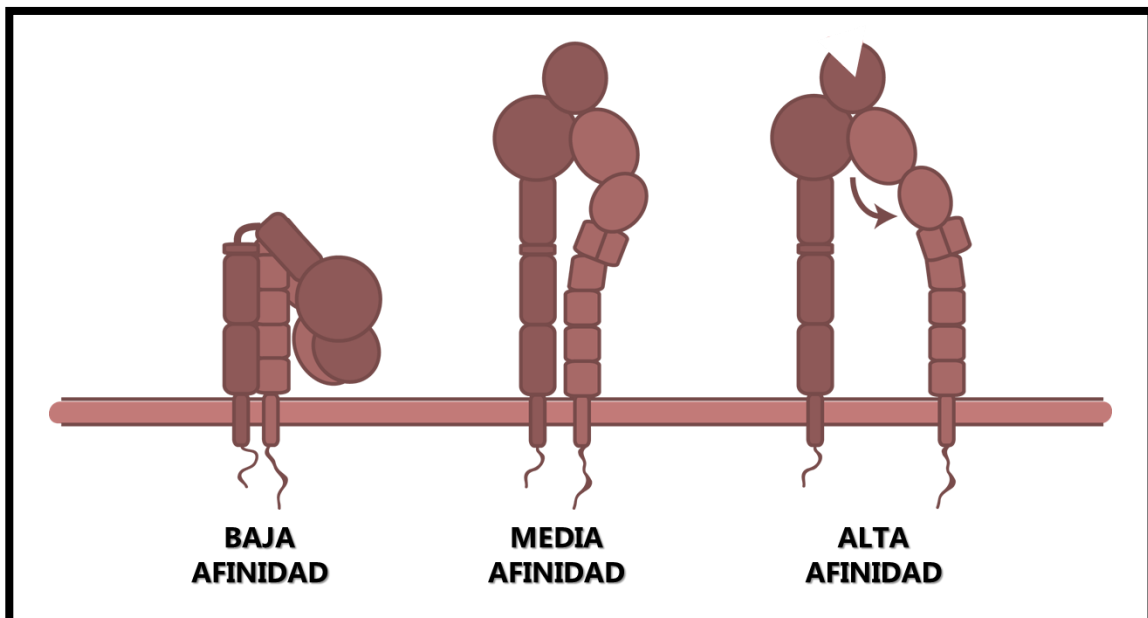
- **Adhesión:** Si el estímulo persiste, los leucocitos en fase de rodamiento se activan y se adhieren firmemente al endotelio (Figura 7).

Este proceso está mediado por la unión entre las integrinas leucocitarias y las inmunoglobulinas endoteliales <sup>83, 86</sup> y para que esta fase tenga lugar las integrinas deben estar activadas.

Las integrinas leucocitarias pueden existir en tres estados conformacionales que condicionan su afinidad por diferentes ligandos <sup>81, 83</sup> (Figura 8).



- Baja afinidad: Constitutivamente las integrinas poseen una conformación curvada o doblada “bent” y con el casco “headpiece” cerrado. En células circulantes inactivadas, las integrinas tienen baja afinidad y no median la adhesión aunque su ligando esté expresado en el endotelio.
- Media afinidad: Tras una activación por selectinas o por diferentes factores quimiotácticos, las integrinas pasan a una conformación extendida pero siguen teniendo el casco cerrado.
- Alta afinidad: Si el estímulo anteriormente iniciado persiste y amplifica, las integrinas mantienen su conformación extendida y adicionalmente se produce la apertura del casco y su afinidad por sus ligandos aumenta.



**Figura 8.** Estados conformacionales de las integrinas leucocitarias.

## II.INTRODUCCIÓN

---

A nivel endotelial, las inmunoglobulinas ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 se expresan constitutivamente, pero a su vez este endotelio puede ser activado e incrementar la expresión de ICAM-1 y de VCAM-1.

Una vez activadas, se produce la unión entre las integrinas leucocitarias en estado de alta afinidad con las inmunoglobulinas expresadas en el endotelio vascular dando lugar a una adhesión célula-célula próxima y estable <sup>82</sup>.

En este proceso participan las integrinas  $\alpha_4$  (VLA-4 y  $\alpha_4\beta_7$ ) que interaccionan con VCAM-1 principalmente y las integrinas  $\beta_2$  (CD11/CD18), Mac-1 y LFA-1 fundamentalmente, las cuales interaccionan mayoritariamente con ICAM-1 <sup>83</sup>.

Tras esta unión, las integrinas generan señales intracelulares que regulan diferentes funciones endoteliales como son la motilidad celular, la proliferación y la apoptosis. Debido a la gran cantidad de señales intracelulares, se genera un signalosoma que induce un reclutamiento eficiente de proteínas tirosin quinasa, las cuales inician un gran repertorio de rutas de señalización que conllevan a una fase de post-adhesión y estabilización, que se conoce actualmente como fortalecimiento de la adhesión <sup>83</sup>.

- **Migración:** Aunque este último paso se produce a través de las uniones existentes entre las células endoteliales y a través de la membrana basal perivascular, supone una

mínima alteración de la estructura de la pared vascular <sup>83, 87</sup> (Figura 7).

El proceso de transición de adhesión firme a extravasación también requiere que se produzca una activación leucocitaria. Las integrinas actúan como moléculas que emiten una señal que hace que los leucocitos, especialmente monocitos y neutrófilos, se aplanen y se movilen por los vasos sanguíneos, buscando los lugares idóneos para migrar a través de las células endoteliales al foco inflamatorio. Este proceso se conoce como rastreo intravascular <sup>83, 88</sup>.

Entre las moléculas de adhesión implicadas en la extravasación leucocitaria tiene importancia el complejo formado por las integrinas  $\beta_2$ /ICAM-1 y en especial Mac-1/ICAM-1 <sup>83, 89-92</sup>.

Otra molécula relevante es "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1" [PECAM-1 (CD31)] cuyos niveles elevados en las uniones entre células hacen que esté en una posición ideal para participar en el proceso de extravasación leucocitaria. Además, también actúa como receptor capaz de producir la activación de integrinas leucocitarias. Los leucocitos activados, una vez han migrado a través de la barrera endotelial, deben atravesar la matriz extracelular y dirigirse hacia el lugar de la infección o inflamación extravascular <sup>80, 83</sup>.

Los leucocitos expresan en bajos niveles las integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  y éstas se unen a un gran número de proteínas de la matriz extracelular como

## **II.INTRODUCCIÓN**

---

lamilina, fibronectina, y vitronectina. Los mecanismos moleculares que median el paso de leucocitos a través de las uniones entre células endoteliales activarían las rutas que regulan su paso a través de la membrana basal. Estos mecanismos incluirían la activación y el aumento de la expresión de los receptores leucocitarios para las proteínas de la matriz extracelular <sup>82, 83</sup>.

### **2.3 PAPEL DEL ATP EN EL PROCESO INFLAMATORIO:**

El ATP así como otros nucleótidos y nucleósidos están presentes de forma natural en todos los órganos y sistemas animales donde ejercen sus efectos. A nivel intracelular, el ATP es utilizado principalmente para regular los procesos que requieren energía como el transporte activo, biosíntesis y motilidad celular, mientras que a nivel extracelular se considera una molécula fundamental en la señalización celular <sup>93, 94</sup>.

#### **2.3.1 Liberación extracelular de nucleótidos bajo condiciones fisiológicas/patológicas:**

Existen varios tejidos de excitación o de secreción que liberan diferentes nucleótidos en condiciones basales. Así, ATP, ADP y otros neurotransmisores se almacenan en vesículas o gránulos especializados de células de las terminaciones nerviosas, células cromafines, células pancreáticas acinares y plaquetas circulantes. La liberación de los nucleótidos almacenados en los gránulos de estas células se realiza de una manera  $Ca^{2+}$  dependiente a través de una exocitosis regulada <sup>93, 95-97</sup>.

Por otra parte, la liberación de nucleótidos también se produce a partir de tejidos no excitatorios como células epiteliales

y endoteliales, astrocitos, fibroblastos, hepatocitos, células óseas y articulares, queratinocitos, cardiomiocitos, eritrocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos y otras células hematopoyéticas <sup>93, 94, 98-101</sup>. Estas células han demostrado que liberan ATP de forma transitoria bajo estímulos mecánicos, “shear stress”, hipoxia, estiramiento, presión hidrostática, así como en respuesta a bradicinina, serotonina y a otros agonistas farmacológicos de la movilización de  $Ca^{2+}$  <sup>93</sup>.

Pérdidas masivas de nucleótidos pueden ocurrir en la lisis celular, sin embargo, este mecanismo no específico está restringido a lesión de órganos, shock traumático o a ciertas condiciones inflamatorias <sup>93, 94</sup>.

En condiciones basales, las células liberan bajas concentraciones ( $10^{-9}$  M) de ATP mientras que en la escena de inflamación, de shock traumático o de isquemia, los niveles extracelulares de nucleótidos aumentan drásticamente ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  M) <sup>93, 94</sup>. Por lo que mecanismos distintivos marcan la diferencia entre la liberación de nucleótidos constitutiva *versus* la liberación estimulada.

### **2.3.2 Señalización purinérgica:**

El concepto de señalización purinérgica se propuso hace cuatro décadas <sup>93, 95</sup>. Desde ese momento, se han establecido claros papeles de señalización del ATP y otros nucleótidos/nucleósidos (ADP, UTP, UDP) en varios tejidos, incluyendo la neurotransmisión del sistema nervioso central, la contractilidad no-adrenérgica no-colinérgica del músculo liso, efectos inotrópicos, cronotrópicos y arritmogénicos en el miocardio, la función gastrointestinal y hepática, la regulación de

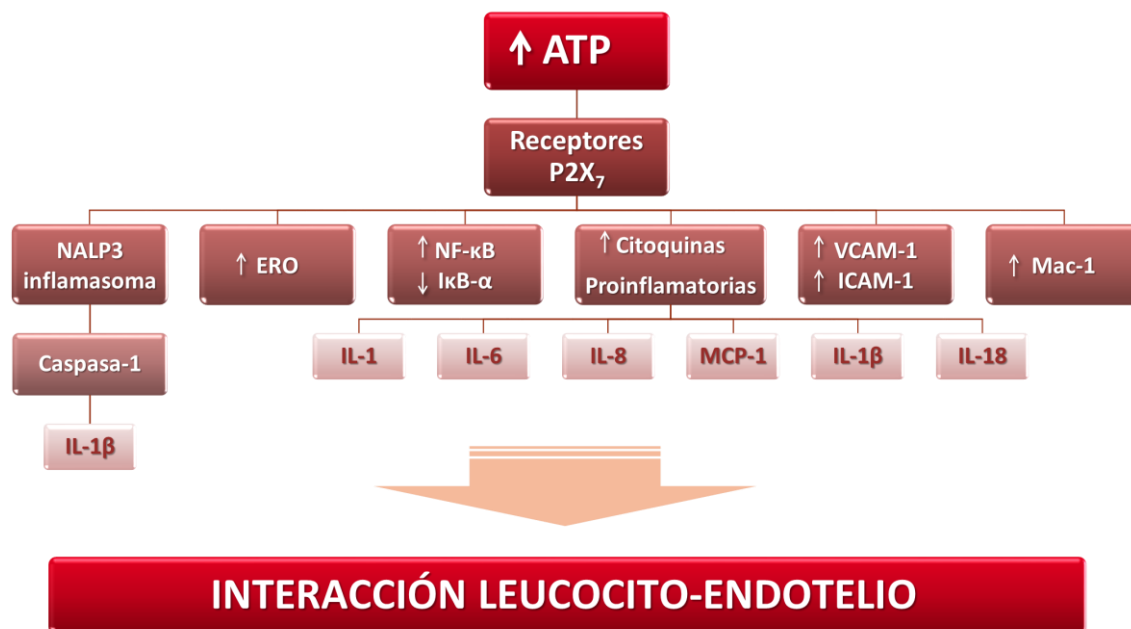
## II.INTRODUCCIÓN

---

la respuesta de las células epiteliales, la distribución del flujo sanguíneo y del aporte de oxígeno, la respuesta inmune y el control del tráfico de leucocitos entre la sangre y los tejidos así como en la activación y agregación plaquetaria en los sitios de daño vascular. Además de los eventos de señalización aguda, hay una evidencia creciente de que las purinas y pirimidinas también poseen potentes funciones a largo plazo ya que intervienen en el crecimiento y la proliferación celular, en la inducción de la apoptosis, en la cicatrización de heridas, en la formación y resorción ósea así como en la formación de la placa aterosclerótica <sup>93-95, 102</sup>.

Todos estos efectos son mediados a través de una serie de receptores selectivos de nucleótidos, los cuales se subdividen en dos familias: P2X y P2Y. Los receptores P2X comprenden siete subtipos de receptores (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>), siendo todos ellos son canales activados por ligando. La unión del ATP a estos receptores induce un cambio conformacional del canal, su apertura y la entrada de cationes al interior celular. Estos cationes (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> principalmente) producen una despolarización que conlleva al inicio de la señalización purinérgica. Sin embargo, los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G. La unión del ATP a este tipo de receptores induce su cambio conformacional y la activación de proteínas G que inician la ruta de señalización de las purinas. Los receptores P2Y a su vez se dividen en dos subfamilias, acoplados a Gq y por tanto activan la enzima fosfolipasa C-β (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>) y acoplados a proteínas Gi que inhiben la enzima adenilato ciclasa y regulan canales iónicos (P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>) <sup>93</sup>.

Numerosos estudios señalan a los receptores P2X<sub>7</sub> como los principales responsables de promover el proceso inflamatorio. Concretamente la unión ATP-P2X<sub>7</sub> induce una activación del NALP3 inflammasoma que activa a la enzima caspasa-1 que finalmente promueve la maduración de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  <sup>103-105</sup>. Estos receptores también favorecen la liberación de ERO y la transcripción del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) al núcleo <sup>94, 103, 105</sup>, así como la producción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-18, IL-6, IL-8, “Monocyte chemotactic protein-1” (MCP-1) y TNF- $\alpha$  <sup>94, 103-106</sup>, la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina <sup>94, 106</sup> y leucocitarias como Mac-1 <sup>94</sup>. Todos estos factores promueven en última instancia el reclutamiento de leucocitos <sup>103</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Efectos proinflamatorios derivados de la unión del ATP a su receptor P2X<sub>7</sub>.

## II.INTRODUCCIÓN

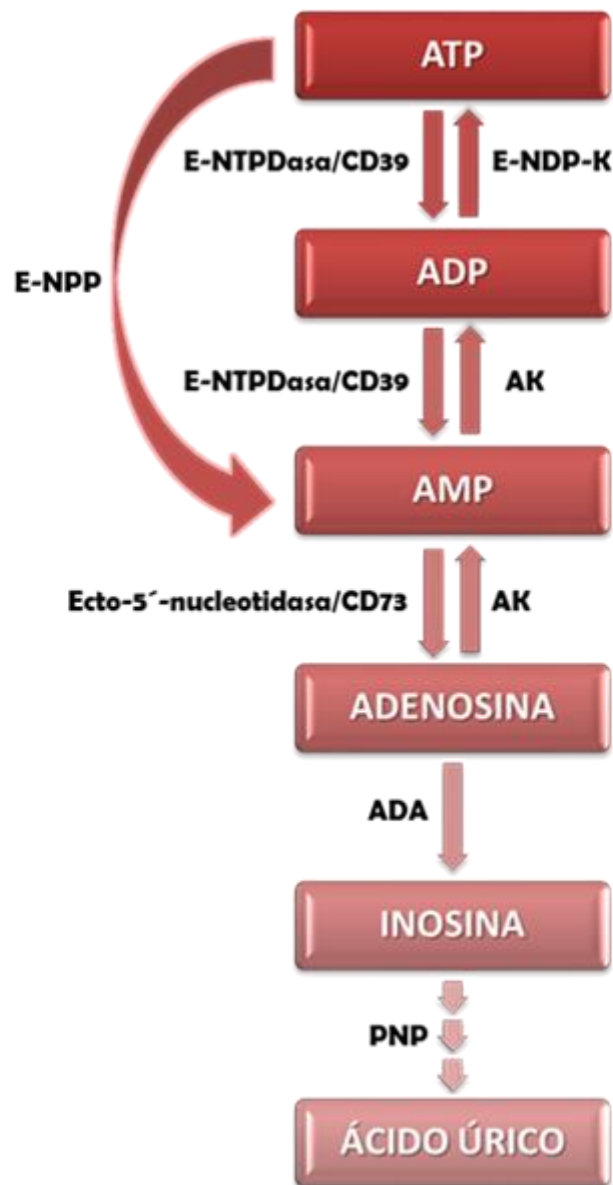
---

Entre los receptores del grupo P2Y, se ha apuntado a los subtipos P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> como promotores del proceso inflamatorio. Así, estos receptores activan el NALP3 inflamasoma<sup>103</sup>, incrementan la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1<sup>94, 106</sup>, la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y MCP-1<sup>106</sup> y el reclutamiento y migración leucocitario<sup>94, 100</sup>.

### **2.3.3 Ruta de degradación/formación del ATP:**

Posteriormente a la transducción de señales, los nucleótidos extracelulares deben ser rápidamente inactivados a adenosina a través de la ruta de degradación del ATP. Los hallazgos actuales apoyan la presencia de una extensa red de ecto-enzimas que son co-expresadas en un grado variable en los tejidos de mamíferos y comparten similitudes en la especificidad de sustrato. La duración y magnitud de la señalización purinérgica puede estar coordinada a través de dos rutas opuestas: la de degradación y la de generación de ATP. Así, la ruptura secuencial de nucleótidos a adenosina y posteriormente a inosina/hipoxantina/ácido úrico se contrarresta mediante la re-síntesis de fosforilos de alta energía a través de reacciones fosfotransfer en sentido opuesto<sup>93</sup>. Las enzimas participantes en estas dos rutas son: ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39), ecto-nucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), ecto-5'-nucleotidasa (CD73), adenosina deaminasa (ADA), purino nucleósido fosforilasa (PNP), adenilato quinasa (AK) y ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K) (Figura 10).





**Figura 10.** Esquema representativo de la ruta de degradación/formación del ATP. La figura muestra la conversión del ATP a adenosina y viceversa así como finalmente la transformación de adenosina a ácido úrico. También señala las enzimas implicadas en dicha ruta: Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39), ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), ecto-5'-nucleotidasa (CD73), adenosina deaminasa (ADA), purino nucleósido fosforilasa (PNP), adenilato quinasa (AK) y ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K).

La adenosina resultante posee un papel importante en la atenuación de la inflamación y del daño tisular mediando diversas repuestas cardioprotectoras, neuroprotectoras, vasodilatadoras y

## II.INTRODUCCIÓN

---

angiogénicas <sup>93, 94, 96, 107</sup>. Estos efectos están mediados a través de receptores de adenosina acoplados a proteínas G (A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub>) que funcionan activando la enzima adenilato ciclasa. Por otra parte la adenosina también puede continuar la ruta de degradación de las purinas e inactivarse en la superficie celular transformándose en inosina, hipoxantina y finalmente en ácido úrico a través de la actividad secuencial de las enzimas ADA y PNP <sup>93, 94, 96</sup> (Figura 10).

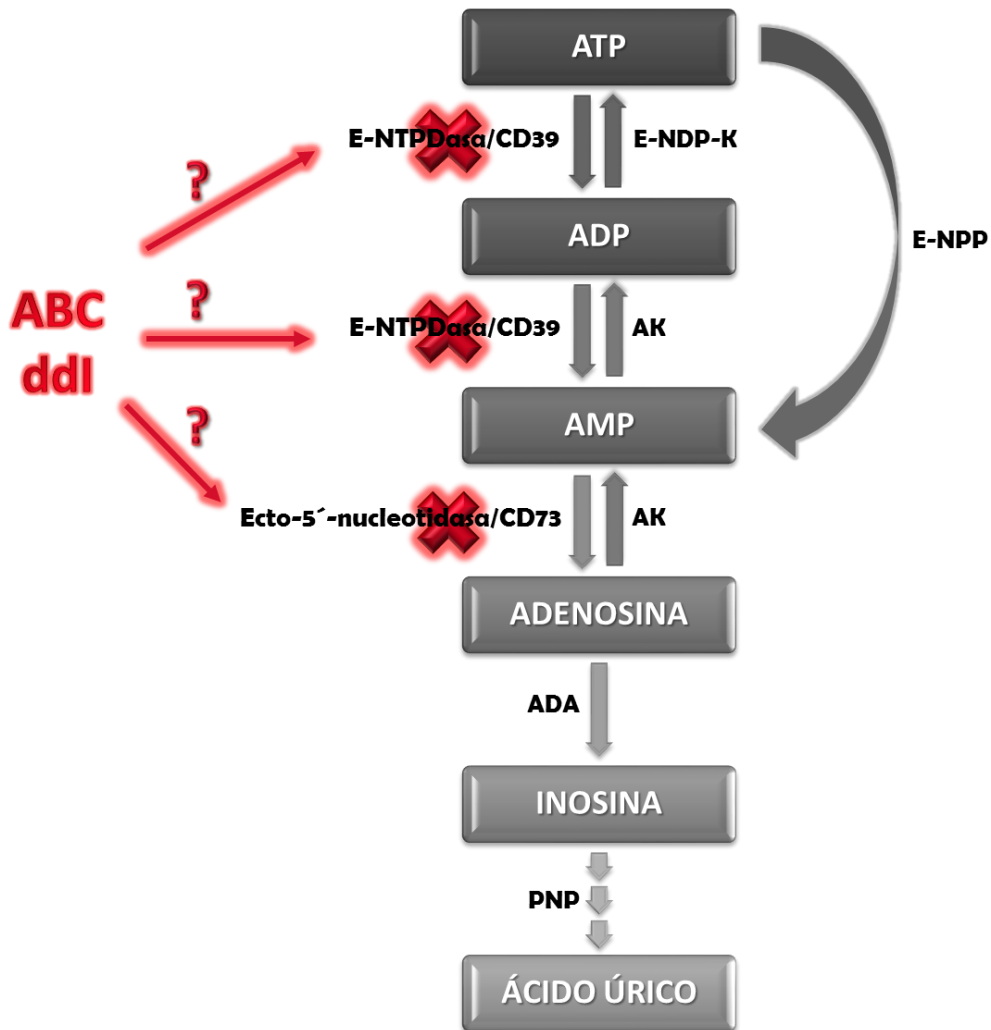
Distintas condiciones patológicas (inflamación, shock traumático o isquemia) pueden inducir cambios agudos en las proporciones específicas de nucleósidos mono, di y trifosfato <sup>84, 94, 108, 109</sup>, invirtiendo la dirección de la ruta de inactivación de nucleótidos hacia la regeneración de ATP, favoreciendo por tanto el escenario inflamatorio, la acumulación leucocitaria, la activación y agregación plaquetaria que conllevarían al desarrollo de distintas patologías cardiovasculares con componente inflamatorio como infarto agudo de miocardio, trombosis y aterosclerosis <sup>93, 94, 103</sup>.

### **2.3.4 Implicación de los fármacos ITIAN análogos de purina en la señalización purinérgica y en la toxicidad cardiovascular:**

Debido a que los estudios clínicos realizados hasta la fecha únicamente señalan a los ITIAN análogos de purina como responsables de la toxicidad cardiovascular, cabría pensar que estos fármacos pudieran estar afectando a la vía de señalización de las purinas.

El endotelio vascular contiene vías que degradan y que generan ATP con el fin de mantener estas concentraciones bajo condiciones homeostáticas. El tratamiento con los ITIAN análogos de purina, ABC y ddi, podría estar afectando a las diferentes

enzimas de la ruta de degradación del ATP, como a la NTPDasa (CD39) o a la ecto-5'-nucleotidasa (CD73), debido a su analogía estructural con los sustratos de dichas enzimas (Figura 11). Esta interferencia a nivel enzimático conllevaría una ruptura del equilibrio homeostático, es decir, a un aumento de los niveles de ATP y ADP, así como a una reducción del nivel de adenosina.



**Figura 11.** Esquema representativo de la ruta de degradación/formación del ATP, así como las enzimas diana que pudieran estar afectadas por los ITIAN análogos de purina. La figura muestra la conversión del ATP a adenosina y viceversa así como finalmente la transformación de adenosina a ácido úrico. También señala las enzimas implicadas en dicha ruta: Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39), ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), ecto-5'-nucleotidasa (CD73), adenosina deaminasa (ADA), purino nucleósido fosforilasa (PNP), adenilato quinasa (AK) y ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K), así como las enzimas a las cuales pudieran estar afectando los ITIAN análogos de nucleósido abacavir (ABC) y didanosina (ddI).

## II.INTRODUCCIÓN

---

Como hemos mencionado anteriormente, la adenosina posee efectos protectores sobre la inflamación vascular (prevención de la formación de coágulos y la oclusión del vaso) mientras que el ATP y ADP son moléculas proinflamatorias que promueven vías protrombóticas <sup>93, 94</sup>. Por tanto, la administración de estos fármacos podría promover un escenario inflamatorio, que en última instancia conllevaría a la aparición de distintas patologías cardiovasculares como la aterosclerosis o el infarto de miocardio.

### **III.OBJETIVOS**



El objetivo general del presente trabajo fue caracterizar los efectos y los mecanismos proinflamatorios de los fármacos ITIAN. Es decir, estudiar la acción de estos fármacos sobre la acumulación leucocitaria como primer paso en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio tanto *in vitro* e *in vivo*.

En particular, abordamos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de los distintos fármacos del grupo ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio *in vitro* (células humanas).
2. Estudiar, para aquellos ITIAN que promuevan la acumulación leucocitaria, el tipo celular afectado y las moléculas de adhesión participantes en dicha interacción.
3. Analizar el efecto de estos ITIAN sobre la producción de ERO, la expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$  citosólica y la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo como marcadores proinflamatorios a nivel endotelial.
4. Caracterizar el papel del ATP en esta respuesta. Concretamente evaluar la posible interferencia de los ITIAN en la cascada de señalización purinérgica (ATP, enzimas CD39 y CD73, receptores de ATP, etc.).
5. Dilucidar las acciones de los distintos fármacos del grupo ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio *in vivo*, así como estudiar la participación de las moléculas de adhesión implicadas en dicha interacción con el fin de dar una mayor relevancia fisiológica a los resultados *in vitro*.





## **IV.METODOLOGÍA**



## **MÉTODOS**

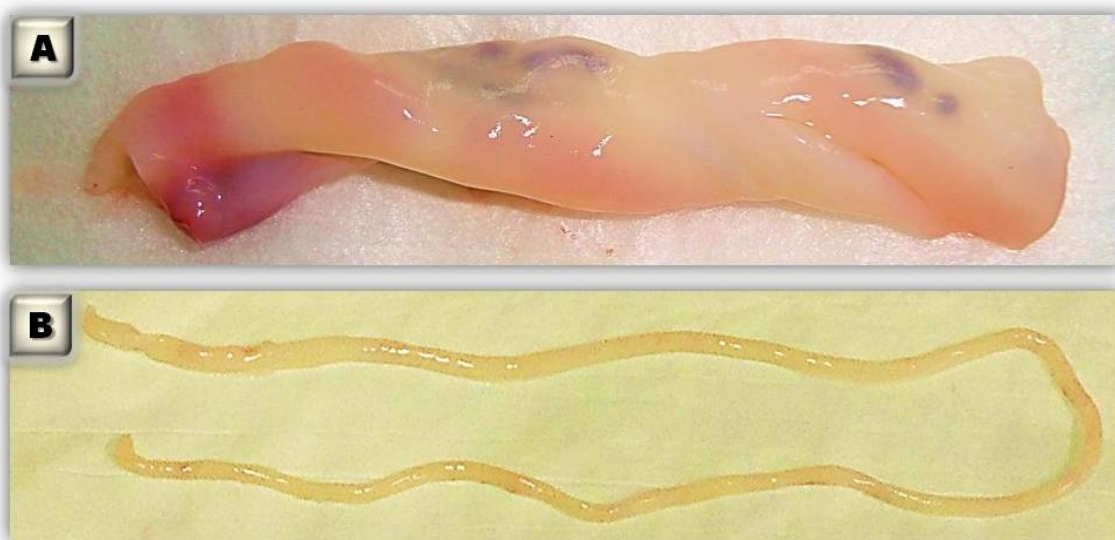
### **BLOQUE I: ESTUDIOS IN VITRO**

#### **1. CULTIVO Y AISLAMIENTO CELULAR:**

##### **1.1 CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES:**

Se emplearon células de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) y células de arterias de cordón umbilical humano (HUAEC) para la realización de la metodología que se detalla a continuación.

Estas HUVEC o HUAEC se extrajeron de venas o arterias de cordones umbilicales humanos frescos procedentes de donantes sanos del Hospital Clínico Universitario de Valencia (Figura 12).



**Figura 12.** (A) Cordón umbilical humano. (B) Arteria disecada de cordón umbilical humano.

Para la extracción de HUVEC se trabajó con el cordón umbilical completo, mientras que para la obtención de las HUAEC

#### IV.METODOLOGÍA

---

se diseccionaron las arterias del mismo (Figura 12). Ambos tipos de vasos se lavaron con “Phosphate buffered saline” (PBS) a 37°C, posteriormente se les introdujo colagenasa (1 mg/mL) y se mantuvieron en el incubador a 37°C durante 17 min <sup>110</sup>. Transcurrido este periodo de tiempo, se masajearon suavemente para garantizar la separación de las células endoteliales de la pared del vaso, y el contenido se recogió y centrifugó a 259 xg. El precipitado obtenido se resuspendió en “endothelial cell basal medium-2” (EBM-2) [suplementado con suero fetal bovino (2 % v/v), hidrocortisona (0.04 % v/v), “human fibroblast growth factor-basic” (hFGF-B, 0.4 % v/v), “vascular endothelial growth factor” (VEGF, 0.1 % v/v), “recombinant long R<sup>3</sup> insulin-like growth factor-1” (R3-IGF-1, 0.1 % v/v), ácido ascórbico (0.1 % v/v), “Human recombinant epidermal growth factor” (rhEGF, 0.1 % v/v), “gentamicine sulfate amphotericine B” (GA-1000, 0.1 % v/v), heparina (0.1 % v/v), penicilina (50 unidades/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y fungizona (2.5 µg/mL)] y se depositó en un frasco de cultivo T25 donde las células se adhirieron y crecieron hasta alcanzar el 100 % de confluencia.

Una vez alcanzada la misma, los cultivos primarios se despegaron con tripsina y se transfirieron a las placas de cultivo apropiadas. En todos los experimentos realizados utilizamos células del primer pase de los cultivos primarios de HUVEC o HUAEC.

Las células se mantuvieron en el incubador de cultivo celular a 37°C, en atmósfera húmeda de 95 % aire/5 % CO<sub>2</sub>.

### **1.2 AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS:**

Se empleó sangre de donantes sanos procedente del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana recogida en tubos que contienen citrato sódico como anticoagulante <sup>110</sup>.

#### **1.2.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN):**

Todo el proceso se realizó a una temperatura de 4°C. La sangre (20 mL) se incubó con 10 mL de dextrano al 3 % (en suero fisiológico) durante 45 min consiguiendo con ello el depósito en la fase inferior de gran parte de los eritrocitos. Por centrifugación a 259 xg y gradiente de densidad con Ficoll-Paque de la fase superior anteriormente recogida se obtuvieron los PMN en el precipitado. Después de la lisis, los PMN se centrifugaron de nuevo a 259 xg durante 5 min, se lavaron con “Hank´s balanced salt solution” (HBSS, sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>) y se resuspendieron en medio RPMI completo [medio RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado (10 % v/v), penicilina/estreptomicina (1 % v/v), glutamina (1 % v/v) y piruvato sódico (1 % v/v)].

#### **1.2.2 Leucocitos mononucleares (PBMC):**

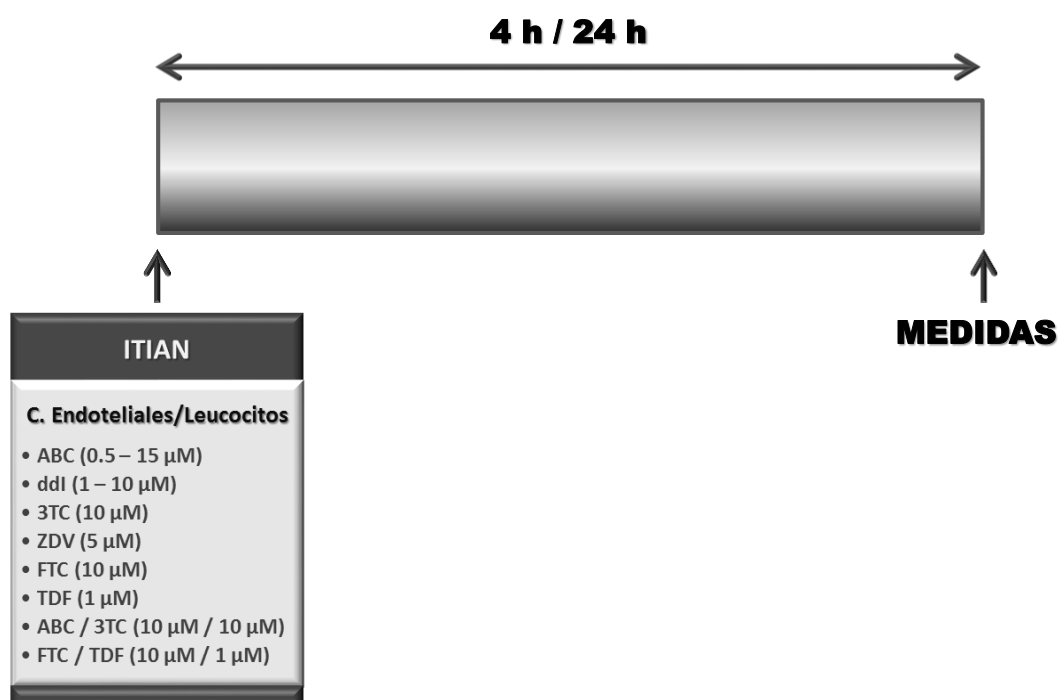
Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. La sangre (20 mL) se incubó con 10 mL de dextrano al 3 % (en suero fisiológico) durante 45 min consiguiendo con ello el depósito en la fase inferior de gran parte de los eritrocitos. Por centrifugación a 583 xg sin aceleración ni freno y gradiente de densidad de la fase superior con Ficoll-Paque se obtuvieron los PBMC en el anillo blanquecino. Se centrifugó esta fase a 583 xg durante 10 min, el precipitado obtenido se lavó con HBSS (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>) y se

## IV.METODOLOGÍA

resuspendieron los PBMC en medio RPMI completo [ver apartado 1.2.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN)].

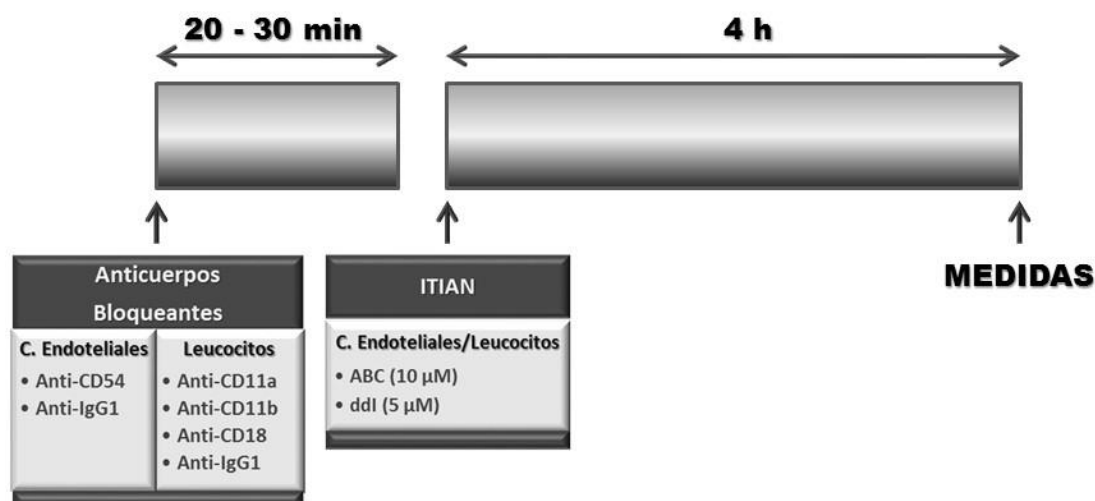
### 2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO:

Tanto las células endoteliales (HUVEC o HUAEC) como los leucocitos (PMN o PBMC) se trataron independientemente con concentraciones clínicamente relevantes de los fármacos ITIAN<sup>111-113</sup> o con sus combinaciones terapéuticas preferentes: ABC (0.1–15  $\mu$ M), ddi (1-10  $\mu$ M), 3TC (10  $\mu$ M), ZDV (5  $\mu$ M), FTC (10  $\mu$ M), TDF (1  $\mu$ M), ABC/3TC (10  $\mu$ M/10  $\mu$ M), FTC/TDF (10  $\mu$ M/1  $\mu$ M) o con el vehículo control (agua estéril) durante 4 ó 24 h a 37°C. TNF- $\alpha$  (25 ng/mL, 4 h) y PAF (10  $\mu$ M, 1 h) se emplearon como control positivo de células endoteliales y leucocitos respectivamente (Figura 13).



**Figura 13. Protocolo experimental de tratamiento con diferentes fármacos del grupo ITIAN o sus combinaciones.** La figura muestra el protocolo experimental de tratamiento de células endoteliales (HUVEC o HUAEC) y leucocitos (PMN o PBMC) con los ITIAN: Abacavir (ABC), didanosina (ddi), lamivudina (3TC), zidovudina (ZDV), emtricitabina (FTC), tenofovir (TDF) o las combinaciones terapéuticas ABC/3TC o FTC/TDF.

Para analizar la implicación de las moléculas de adhesión en la interacción leucocito-endorotelio inducida por ABC o ddi, se pretrató la monocapa de células endoteliales con el anticuerpo bloqueante frente a ICAM-1 (CD54, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con el anticuerpo control (IgG1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (30 min, oscuridad, 37°C) o se pretrataron los leucocitos con anticuerpos frente a LFA-1 (CD11a, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), frente a Mac-1 (CD11b, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), frente a integrinas  $\beta_2$  (CD18, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con el anticuerpo control (IgG1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (20 min, oscuridad, 4°C) antes de la administración de ABC (10  $\mu\text{M}$ ) o ddi (5  $\mu\text{M}$ ) <sup>114, 115</sup> (Figura 14).

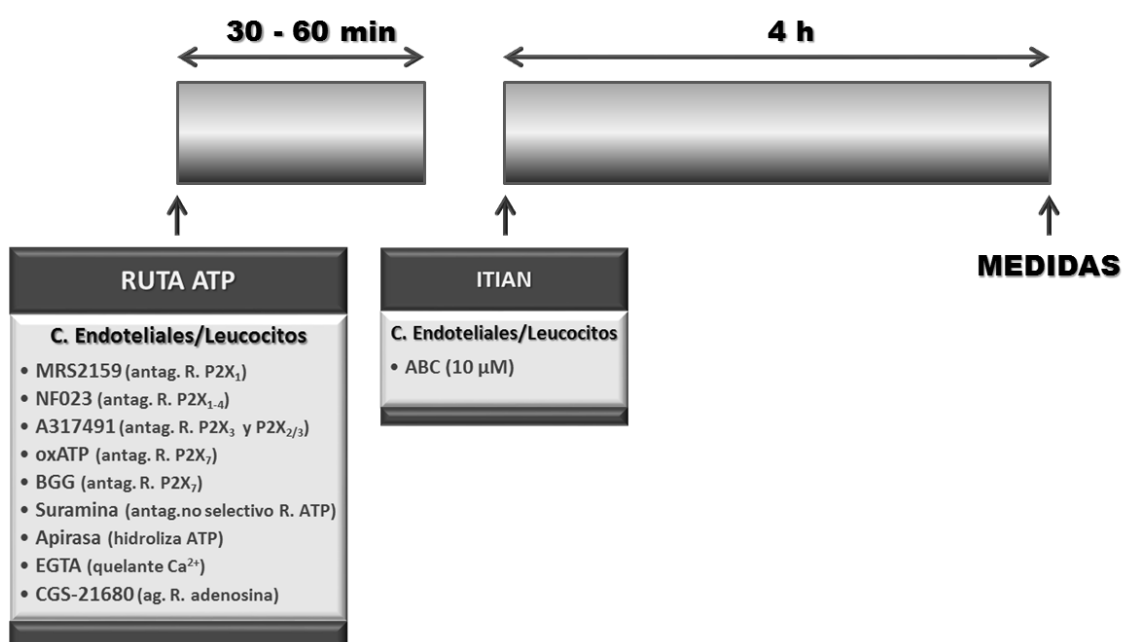


**Figura 14.** Protocolo experimental de pre-tratamiento con anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias previo al tratamiento con ITIAN. La figura muestra el pre-tratamiento de HUVEC o HUAEC con anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión endoteliales (anti-CD54) y de PMN o PBMC con anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión leucocitarias (anti-CD11a, anti-CD11b o anti-CD18), así como el posterior tratamiento de ambos tipos celulares con abacavir (ABC) o didanosina (ddi).

Asimismo, para analizar el papel del ATP en la acumulación leucocitaria inducida por ABC empleamos distintos compuestos que actúan en diferentes puntos de la ruta de degradación del ATP y su consecuente conversión a adenosina. En este sentido, pre-tratamos tanto las células endoteliales como los leucocitos

## IV.METODOLOGÍA

con: MRS2159 (antagonista del receptor de ATP P2X<sub>1</sub>, 10 μM), NF023 (antagonista de los receptores de ATP P2X<sub>1-4</sub>, 10 μM), A317491 (antagonista del receptor de ATP P2X<sub>3</sub> y P2X<sub>2/3</sub>, 25 nM), oxATP (antagonista del receptor de ATP P2X<sub>7</sub>, 600 μM), “Brilliant Blue G pure” (BGG) (antagonista del receptor de ATP P2X<sub>7</sub>, 5 μM), apirasa (hidroliza ATP, 1 UI/mL) y EGTA (Quelante de Ca<sup>2+</sup>, 2 mM) (30 min, 37°C) y con suramina (antagonista no selectivo de los receptores de ATP, 100 μM) y CGS-21680 (agonista de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, 10 μM) (1 h, 37°C) previo al tratamiento con ABC (10 μM) <sup>116, 117</sup> (Figura 15).



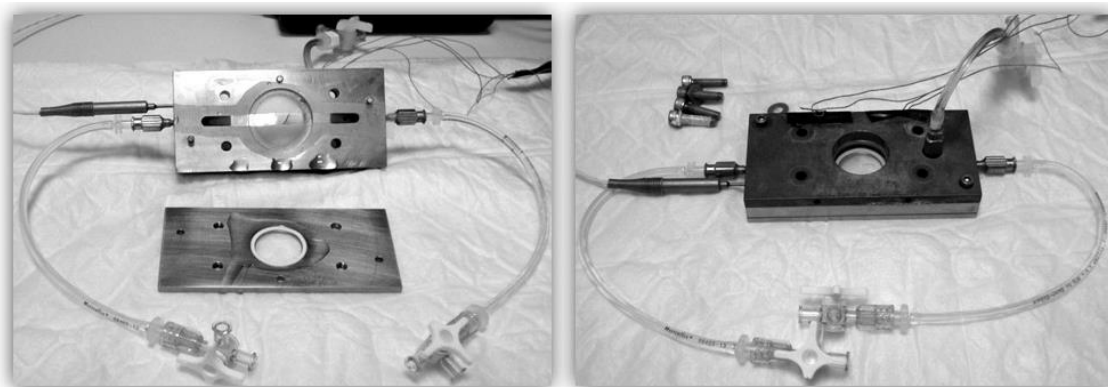
**Figura 15.** Protocolo experimental de pre-tratamiento con distintos compuestos que interfieren en la ruta de degradación/generación de ATP previo al tratamiento con ABC. La figura muestra el pre-tratamiento de las células endoteliales y de los leucocitos con distintos compuestos que interfieren en la ruta de degradación/generación de ATP (MRS22159, NF023, A317491, oxATP, BGG, suramina, apirasa, EGTA o CGS-21680) (30-60 min), así como el posterior tratamiento de ambos tipos celulares con abacavir (ABC) (4 h).



### **3. ADHESIÓN DINÁMICA EN CÁMARA PARALELA DE FLUJO:**

Para analizar el efecto de los diferentes fármacos antirretrovirales ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio se emplearon por un lado células endoteliales HUVEC o HUAEC sembradas en cubre-objetos de plástico circulares de 25 mm de diámetro pre-tratados con fibronectina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y por otro, leucocitos (PMN o PBMC) procedentes de sangre de donantes sanos obtenidos como se ha descrito previamente (ver apartado 1.2 Aislamiento de leucocitos).

La adhesión dinámica *in vitro* en cámara paralela de flujo (“Flow chamber”) ha sido descrita en detalle previamente <sup>118</sup>. La cámara de flujo empleada para la realización de estos experimentos posee un hueco en el que insertamos el cubre-objetos circular el cual contiene una monocapa de HUVEC o HUAEC confluentes. Estos ensayos se realizaron a 37°C debido a que una de las placas que conforman la cámara de flujo es calefactora. Una vez montada la cámara una porción de 5 x 25 mm fue expuesta al flujo (Figura 16).



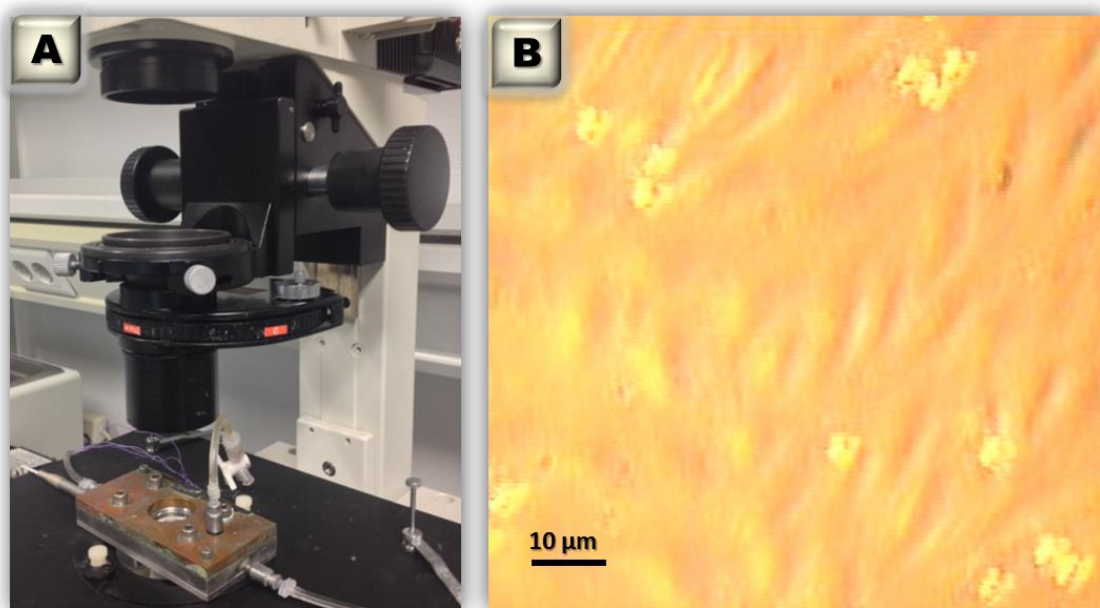
**Figura 16.** Montaje de la cámara paralela de flujo (“Flow chamber”).

## IV.METODOLOGÍA

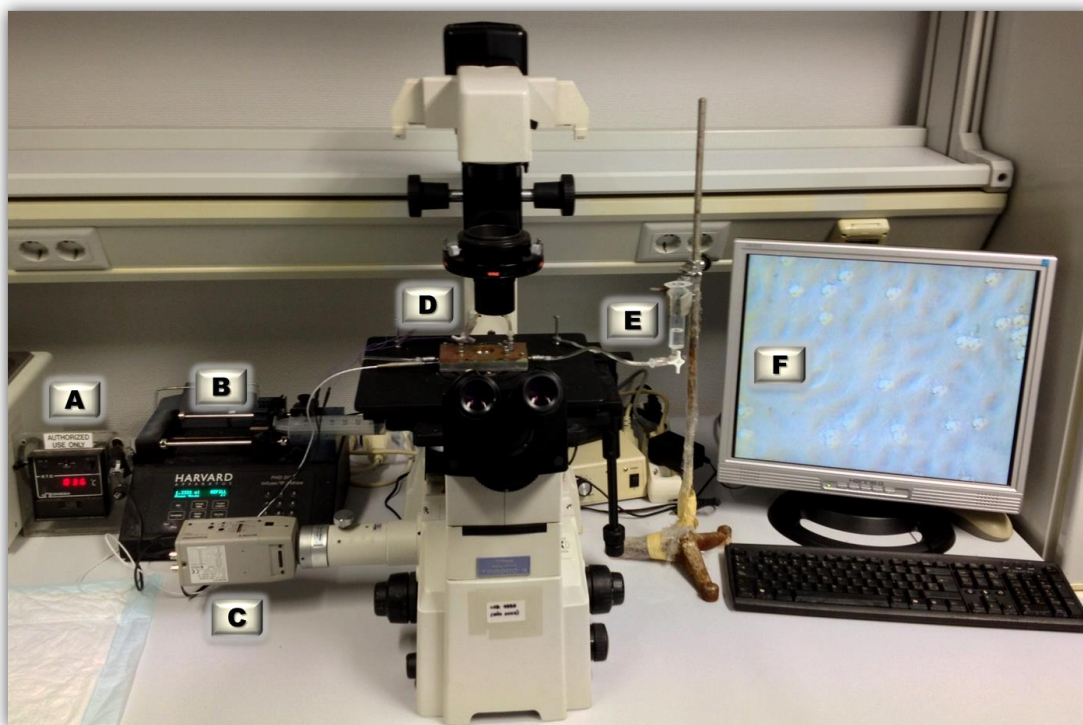
---

Las poblaciones leucocitarias (PMN o PBMC) se resuspendieron en el tampón [“Dulbecco’s phosphate buffered saline” (DPBS<sup>+</sup>, con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) + 0.1 % Albúmina sérica humana (HSA)] y fueron perfundidas a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL ó 0.5 x 10<sup>6</sup> células/mL respectivamente sobre la monocapa de HUVEC o HUAEC a un flujo controlado de 0.36 mL/min (0.7 dinas/cm<sup>2</sup>) gracias a una bomba de infusión.

La cámara paralela de flujo se colocó sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) (Figura 17A) conectado a una cámara de vídeo (Sony Exware HAD) que a su vez está conectada a un ordenador donde se visualizaron los eventos en tiempo real y se grabaron las imágenes (Figura 18).



**Figura 17.** (A) Cámara de flujo sobre microscopio invertido. (B) Ejemplo representativo de la visualización de leucocitos PMN interaccionando con una monocapa endotelial venular (HUVEC).

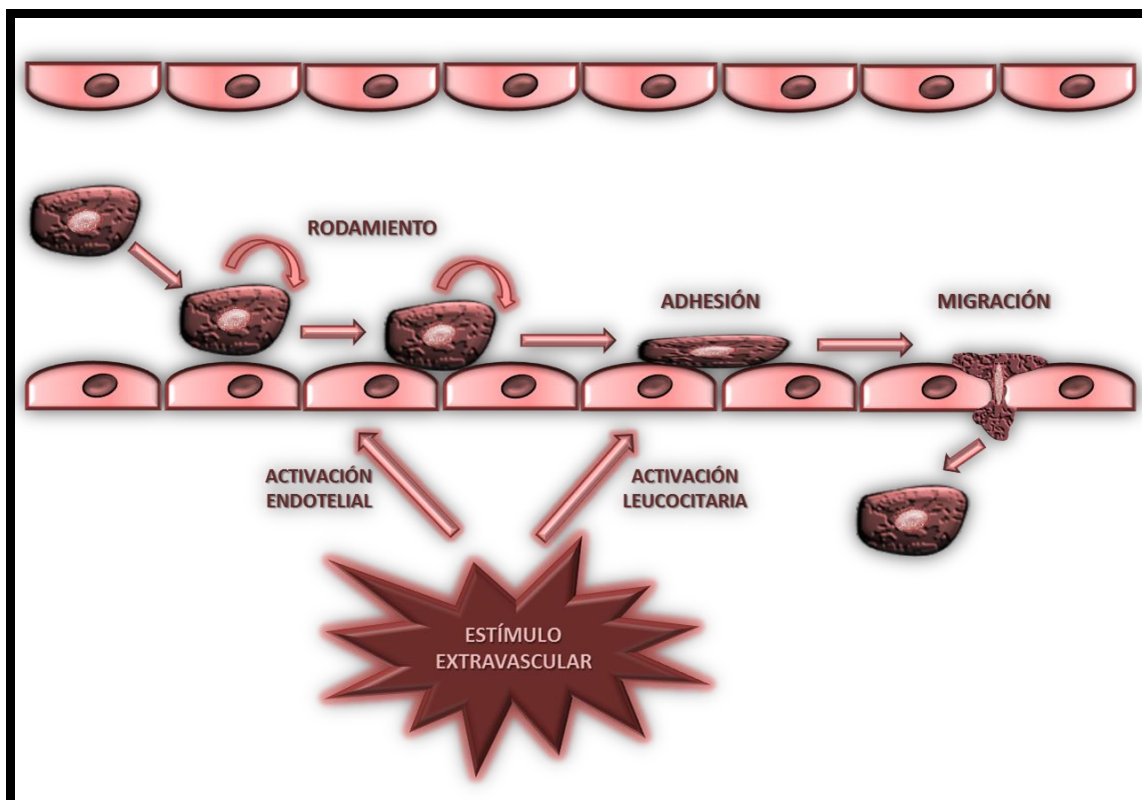


**Figura 18.** Montaje del sistema de cámara paralela de flujo en microscopio. A: Regulador de temperatura de la cámara de flujo, B: Bomba de infusión, C: Videocámara, D: Cámara de flujo, E: Jeringa con suspensión de leucocitos (PMN o PBMC), F: Monitor de ordenador conectado a la videocámara.

Se empleó el objetivo 40x, pudiéndose observar así el flujo de leucocitos y su interacción con la monocapa endotelial (Figura 17B). El programa informático utilizado para observar y grabar las imágenes fue “Pinnacle Studio”. La grabación de los eventos se inició cuando se comenzó a visualizar el paso de leucocitos sobre la monocapa de HUVEC o HUAEC. Grabamos el mismo campo durante 5 min durante los cuales analizamos los parámetros leucocitarios de rodamiento y velocidad de rodamiento. Tras estos 5 min se grabaron 5-6 campos adicionales durante 10 s cada uno, en los cuales se determinó la adhesión leucocitaria al endotelio venular o arterial.

### 3.1 PARÁMETROS LEUCOCITARIOS A DETERMINAR:

- **Rodamiento o “rolling” leucocitario:** Un leucocito en fase de rodamiento es aquel que por interaccionar con el endotelio vascular, disminuye su velocidad. Se determina contando el número de leucocitos que enlentecen su velocidad sobre  $100 \mu\text{m}^2$  de monocapa endotelial durante 1 min (Figura 19). Se expresa como *células/min.*
- **Velocidad de rodamiento leucocitario:** Tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer  $100 \mu\text{m}$  de monocapa endotelial. Se calcula haciendo la media de la velocidad de 20 leucocitos consecutivos y se expresa en  *$\mu\text{m/s}$*  (Figura 19).
- **Adhesión leucocitaria:** Un leucocito se considera adherido al endotelio vascular si permanece estacionado o tiene un contacto estable con la monocapa endotelial durante un periodo igual o superior a 30 s (Figura 19). La adhesión leucocitaria se expresa como el *número de células adheridas/ $\text{mm}^2$* .



**Figura 19. Parámetros leucocitarios.** La figura muestra los parámetros leucocitarios a determinar en los experimentos de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo (“Flow chamber”) y de microscopía intravital (ver Bloque II Estudios *in vivo*, apartado 1. Microscopía intravital).

### 3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

Tanto las células endoteliales (HUVEC o HUAEC), cultivadas en los cubre-objetos circulares, como los leucocitos (PMN o PBMC), se trataron independientemente con concentraciones clínicamente relevantes de los fármacos ITIAN (ABC, ddI, 3TC, ZDV, FTC, TDF), sus combinaciones (ABC/3TC, FTC/TDF) o con el vehículo control (agua estéril) (4 h, 37°C). Empleamos TNF- $\alpha$  (25 ng/mL, 4 h) y PAF (10  $\mu$ M, 1 h) como controles positivos de células endoteliales y leucocitos respectivamente (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Para analizar la implicación de las moléculas de adhesión en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC o ddI,

## **IV.METODOLOGÍA**

---

pre-tratamos las células endoteliales y los leucocitos con anticuerpos frente a diferentes moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias respectivamente previo al tratamiento con ABC o ddI (Figura 14) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

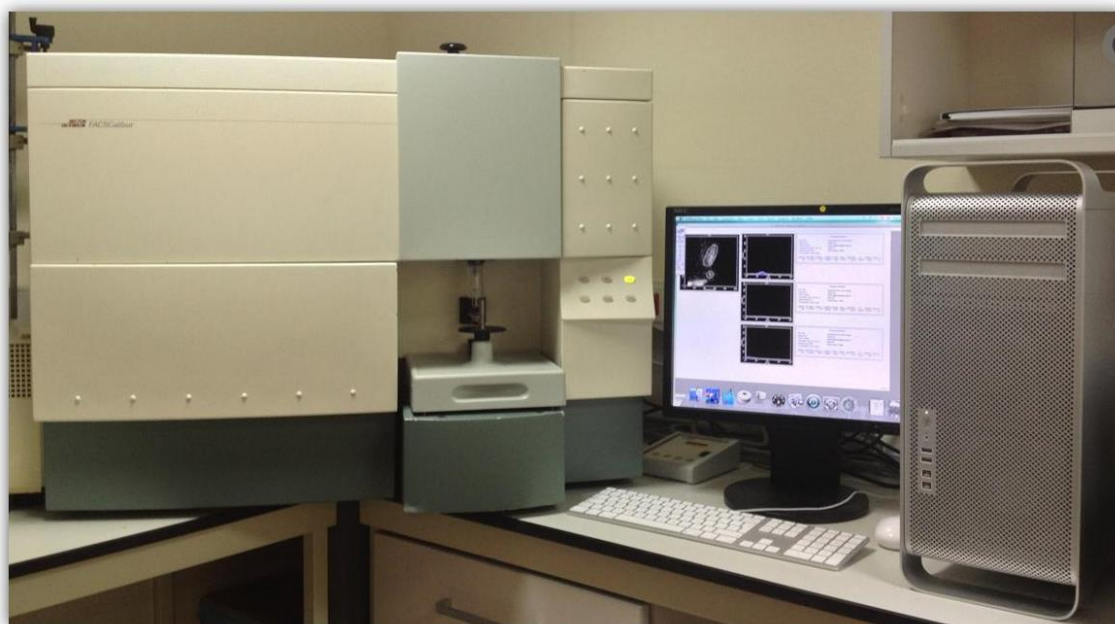
Asimismo, para analizar el papel del ATP en la acumulación leucocitaria inducida por ABC pre-tratamos tanto las células endoteliales como los leucocitos con distintos compuestos que actúan en diferentes puntos de la ruta de degradación del ATP y su consecuente conversión a adenosina previo al tratamiento con ABC (Figura 15) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido el período de incubación con los diferentes tratamientos se procedió a realizar la técnica de adhesión dinámica en cámara de flujo descrita anteriormente.

### **4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO:**

La expresión de moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias se determinó mediante citometría de flujo <sup>110</sup> (FACS calibur, BD) (Figura 20).

Este sistema identifica y clasifica las células de acuerdo a sus características de tamaño y granulosidad (“forward and side scatter”). La media de la intensidad de fluorescencia se empleó como marcador para determinar la expresión de las diferentes moléculas de adhesión analizándose diez mil eventos por muestra.



**Figura 20.** Citómetro de flujo FACS calibur.

### **4.1 CÉLULAS ENDOTELIALES:**

Las HUVEC o HUAEC utilizadas en esta técnica se cultivaron en placas de 6 pocillos.

#### **4.1.1 Protocolo experimental:**

Las células endoteliales confluentes se trataron con concentraciones clínicamente relevantes de distintos ITIAN (4 ó 24 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido el período de incubación, las HUVEC o HUAEC se despegaron con tripsina, neutralizándose su acción con medio EBM-2 completo. Esta suspensión se incubó con los correspondientes anticuerpos marcados con fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) a saturación: VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54), E-selectina (CD62E) o con el anticuerpo control IgG1 (20 min, oscuridad, 4°C).

## **IV.METODOLOGÍA**

---

Las células se fijaron con formalina al 10 % y se analizó la expresión de las diferentes moléculas de adhesión por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

### **4.2 LEUCOCITOS:**

La sangre empleada se extrajo de donantes sanos o de rata [tras finalizar los experimentos de microscopía intravital (ver Bloque II Estudios *in vivo* apartado 1. Microscopía intravital)] utilizándose citrato sódico como anticoagulante.

#### **4.2.1 Protocolo experimental:**

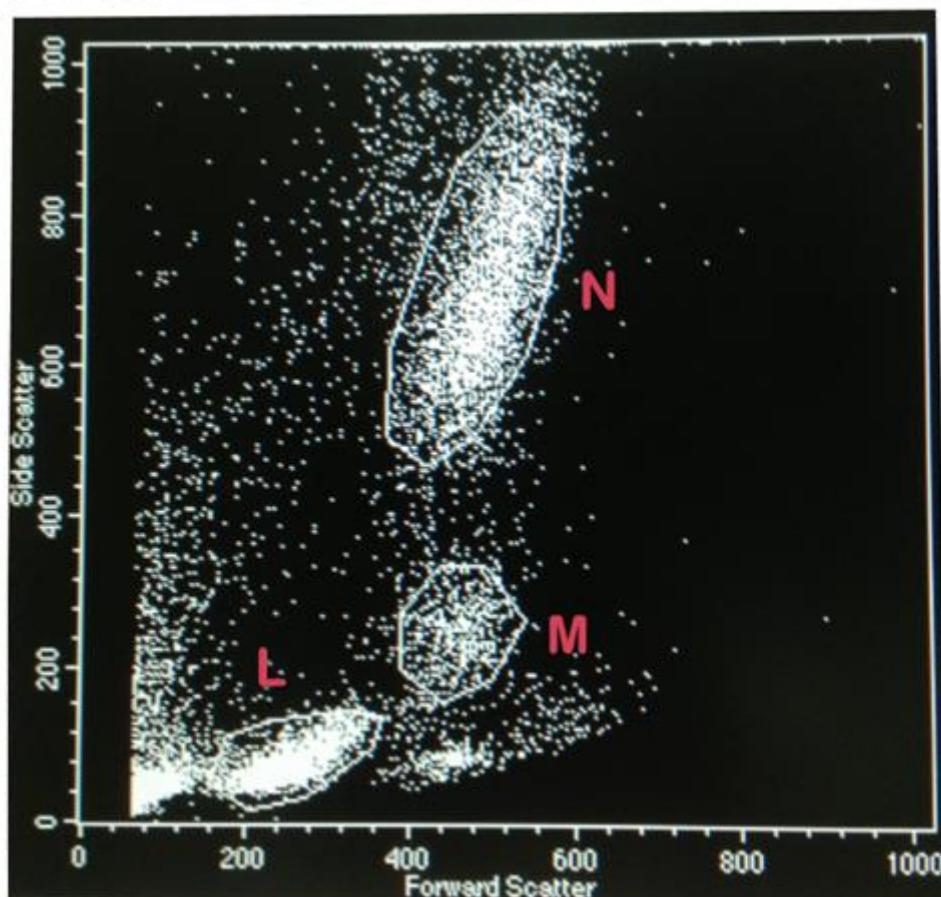
La sangre (40  $\mu$ L) se trató con concentraciones clínicamente relevantes de diferentes fármacos ITIAN (ABC, ddi, 3TC, FTC o TDF) (4 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Tras este período, la sangre se incubó con diferentes anticuerpos marcados con FITC o PE a saturación: LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), integrinas  $\beta_2$  (CD18), VLA-4 (CD49d), L-selectina (CD62L) o anticuerpo control (IgG1) (20 min, oscuridad, 4°C).

Una vez finalizado el tiempo de incubación las muestras sanguíneas se lisaron, lavaron y fijaron.

Las muestras obtenidas se procesaron en el citómetro de flujo (Figura 20) donde neutrófilos, monocitos y linfocitos se identifican como se ha descrito anteriormente (características de tamaño y granulosidad) (Figura 21).





**Figura 21. Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias.** La figura muestra un histograma representativo de las diferentes poblaciones leucocitarias separadas en función de sus características de tamaño (“forward scatter”) y granulosidad (“side scatter”) por el citómetro de flujo Facs calibur. L (linfocitos), M (monocitos) y N (neutrófilos).

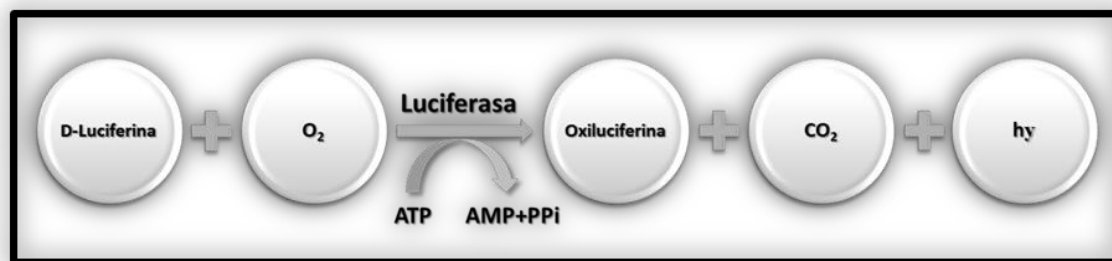
## **5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ATP INTRACELULAR:**

Para cuantificar la concentración de ATP intracelular, se utilizó el “ATP Bioluminescence Kit”. Este es un ensayo de bioluminiscencia basado en la reacción de oxidación de D-luciferina a oxiluciferina mediada por la enzima luciferasa (Figura 22). La concentración de ATP de las muestras es directamente proporcional a la luz emitida ( $h\nu$ ) en la reacción de oxidación.

## IV.METODOLOGÍA

---

Se determinaron los niveles de ATP tanto en células endoteliales (HUVEC o HUAEC) como en células leucocitarias (PMN o PBMC).



**Figura 22. Fundamento de la reacción de cuantificación de ATP intracelular.** Reacción oxidativa que tiene lugar en el ensayo de bioluminiscencia por el que la D-luciferina es oxidada por la enzima luciferasa a oxiluciferina.

### 5.1 CÉLULAS ENDOTELIALES:

Las HUVEC o HUAEC cultivadas en placas redondas de 100 mm de diámetro, se trataron con los ITIAN ABC y ddi (4 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido este periodo, las células endoteliales se recogieron por disgregación mecánica de la monocapa utilizando el siguiente procedimiento: el medio de cultivo EBM-2 fue retirado, las células fueron lavadas con PBS frío y a continuación se despegaron en 6 mL de PBS frío de forma mecánica utilizando rascadores (“scrappers”).

El precipitado de HUVEC o HUAEC se obtuvo tras centrifugar esta suspensión celular durante 5 min a 259 xg y a 4°C.

### **5.2 LEUCOCITOS:**

Los PMN o PBMC se extrajeron de sangre procedente de donantes sanos según se ha descrito anteriormente (ver apartado 1.2 Aislamiento leucocitos).

Las células se trataron con los ITIAN, ABC y ddi (4 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido este periodo de tiempo, se obtuvieron los precipitados de PMNs o de PBMC tras centrifugar las muestras de PMNs a 4°C durante 5 min a 259 xg o las muestras de PBMCs a 4°C durante 8 min a 583 xg.

### **5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL:**

Se procesaron los precipitados de los cuatro tipos celulares (HUVEC, HUAEC, PMNs o PBMCs) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante: se resuspendió el precipitado celular en el tampón de dilución del kit de bioluminiscencia (tampón tris-acetato). La curva estándar de ATP se preparó ( $10^{-11}$ - $10^{-2}$  M) diluyendo la solución madre de ATP (10 mg/mL) suministrada por el kit en el tampón de dilución para minimizar el ruido de fondo de la luminiscencia. Tanto los puntos de la curva estándar de ATP, como las muestras se depositaron por triplicado en una placa negra de 96 pocillos. A continuación, se adicionó el tampón de lisis del kit a todos los pocillos y la placa se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y agitación suave.

La luminiscencia se cuantificó con el lector de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems) inmediatamente tras

## **IV.METODOLOGÍA**

---

añadir 30  $\mu$ L por pocillo del reactivo de luciferasa a través del dispensador interno del aparato.

Para normalizar los valores de ATP con respecto a la concentración de proteína de cada muestra, tras la lisis celular se recogieron 10  $\mu$ L por pocillo del lisado y la concentración proteica se determinó usando el kit de cuantificación proteica “BCA Protein Assay Kit” (ver apartado 6.3. Cuantificación proteica).

### **6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS:**

#### **6.1 CÉLULAS ENDOTELIALES:**

HUVEC o HUAEC cultivadas en placas redondas de 100 mm de diámetro, se trataron con ABC (4 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido este periodo de incubación, los precipitados de células endoteliales se obtuvieron por disgregación mecánica de la monocapa (ver apartado 5.1 Células endoteliales).

#### **6.2 LEUCOCITOS:**

Los leucocitos (PMN o PBMC) aislados como se ha indicado anteriormente (ver apartado 1.2 Aislamiento de leucocitos), se trataron con ABC (4 h, 37°C) (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento).

Transcurrido este periodo de tiempo, se obtuvieron los precipitados de PMN o de PBMC por centrifugación de las muestras (ver apartado 5.2 Células leucocitarias).

### **6.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CITOSÓLICOS Y NUCLEARES:**

Los precipitados de células obtenidos anteriormente (HUVEC, HUAEC, PMNs o PBMCs), se resuspendieron en 70  $\mu$ L de tampón de lisis frío (HEPES 10 mM pH 7.5,  $MgCl_2$  2 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 10 mM,  $Na_3VO_4$  0.1 mM, DTT 1 mM, el inhibidor de proteasas Complete Mini 1 X y Pefabloc 5 mM) y se incubaron en hielo durante 15 min. A continuación se adicionó NP-40 (0.05 % v/v) y se incubaron durante 5 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 16000 xg durante 10 min a 4°C en una microcentrífuga y se recogió el sobrenadante que es el extracto proteico citosólico.

Los precipitados obtenidos, que contienen los núcleos, se resuspendieron en 70  $\mu$ L de tampón de extracción nuclear frío (HEPES 25 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, NaF 10 mM, glicerol 10 %,  $MgCl_2$  5 mM, DTT 1 mM, el inhibidor de proteasas Complete Mini 1X, Pefabloc 5 mM, y NP-40 0.05 % v/v), se mezclaron y se sonicaron durante 10 min. Posteriormente, se hicieron pasar los extractos a través de agujas de 25 G y se sonicaron de nuevo durante 5 min. Finalmente, se centrifugaron a 16000 xg durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante que es el extracto nuclear.

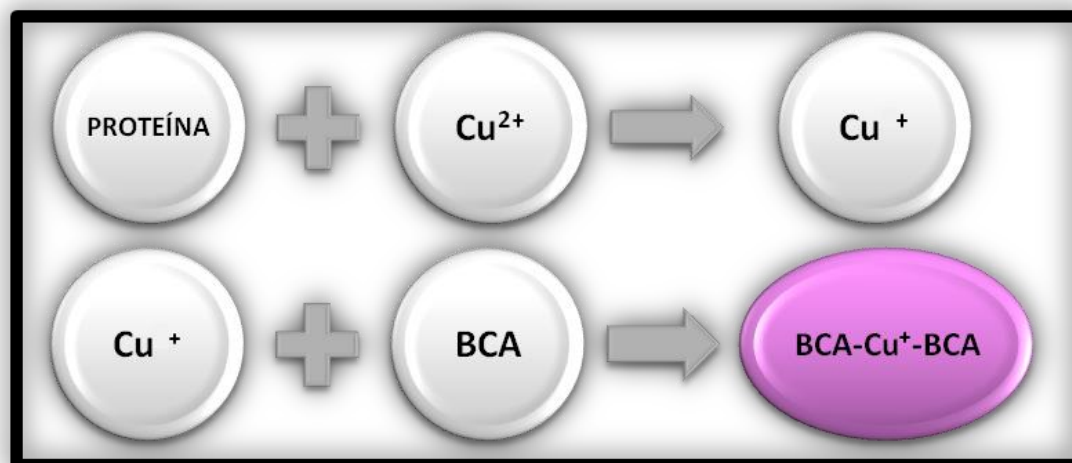
### **6.4 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA: ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA):**

Este ensayo se basa en la reacción de reducción de iones cúpricos ( $Cu^{2+}$ ) a iones cuproso ( $Cu^+$ ) producida por las proteínas en condiciones alcalinas. Estos iones cuprosos formados

## IV.METODOLOGÍA

reaccionan con el BCA observándose una coloración morada en los pocillos <sup>119</sup> (Figura 23).

El contenido proteico de las muestras es proporcional a la absorbancia detectada en las mismas (cuyo valor máximo se detecta a 562 nm).



**Figura 23. Fundamento del Ensayo del ácido bicinconónico (BCA).** Reacciones que tienen lugar en el ensayo del BCA.

Para realizar esta técnica, se siguieron las instrucciones del “BCA Protein Assay Kit”, realizando el mismo en placas de 96 pocillos.

Este ensayo es un método espectrofotométrico, cuyo rango de detección es 0.02-2 mg proteína/mL, que cuantifica la concentración proteica de los extractos. Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA, proteína patrón), realizando diluciones seriadas a partir de una solución madre de BSA (2 mg/mL). Las muestras se diluyeron (1:10) y posteriormente se mezclaron 25  $\mu$ L de las muestras diluidas o de la curva estándar de BSA con 200  $\mu$ L del reactivo de cuantificación proteica por pocillo (el ensayo se realizó por

duplicado). A continuación, la placa se incubó en agitación suave (30 min, 37°C). La medición de la absorbancia a 570 nm se realizó con un lector espectrofotométrico de placas Multiskan (Thermo Labsystems).

### **6.5 WESTERN BLOT:**

#### **6.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE):**

Esta electroforesis se realizó utilizando el sistema “Mini-PROTEAN 3 Cell” (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los extractos citosólicos y nucleares se mezclaron con tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8, glicerol 25 % v/v, SDS 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5 % v/v y azul de bromofenol 0.5 % p/v) y se desnaturalizaron las proteínas hirviendo las muestras a 100°C durante 5 min. En el gel se cargaron 50–100  $\mu$ g de proteínas por pocillo.

Se utilizó un marcador de peso molecular “Precision Plus Protein Standard-Kaleidoscope” como referencia con el fin de localizar las proteínas de interés.

La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis “running buffer” (25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1 % v/v), a voltaje inicial de 80-100 V mientras las muestras difunden por la fase de concentración del gel y posteriormente a 120–140 V en la fase de resolución.

## **IV.METODOLOGÍA**

---

### **6.5.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa:**

La transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  se realizó utilizando “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad).

Para la transferencia, se empleó el tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol 20 % v/v) y se mantuvo durante 1 h a 4°C a una potencia de 350 mA.

Transcurrido este periodo de tiempo, la membrana de nitrocelulosa se incubó con la solución de Ponceau, que tiñe reversiblemente todas las proteínas y se utiliza como control de la cantidad de proteínas cargadas en cada pocillo y de la calidad de la transferencia. A continuación, se lavó la membrana con el tampón TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 150 mM y Tween 20 0.1 % v/v).

La membrana se incubó con la solución de bloqueo (leche en polvo 5 % p/v o BSA 5 % p/v en tampón TBS-T) durante 1 h en agitación suave y a temperatura ambiente.

### **6.5.3 Incubación con Anticuerpos:**

La membrana de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo primario, preparado en solución de bloqueo (BSA 5 % p/v o leche 5 % p/v) suplementada con azida sódica 0.02 % v/v (conservante), durante 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 3 veces durante 10 min cada lavado, a temperatura ambiente con TBS-T y en agitación fuerte. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario, también preparado en la correspondiente solución de bloqueo, durante 1 h



a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

Los anticuerpos empleados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los experimentos de análisis de proteínas.

<b>ANTICUERPO PRIMARIO</b>				
PROTEÍNA	Pm de la proteína (kDa)	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Actina	42	Conejo	1:1000 (leche)	Sigma
Nucleolina	105	Conejo	1:2500 (BSA)	Sigma
NF-κB (p65)	65	Ratón	1:250 (BSA)	Invitrogen
IκB-α	37	Conejo	1:100 (leche)	Santa Cruz
CD73	63	Ratón	1:1000 (BSA)	Abcam
CD39	58	Ratón	1:5000 (BSA)	Abcam

<b>ANTICUERPO SECUNDARIO</b>		
ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-IgG1 (frente a conejo) conjugado con HRP	1:5000 (leche/BSA)	Vector Laboratories
Anti-IgG1 (frente a ratón) conjugado con HRP	1:2000 (BSA)	Dako

Los anticuerpos primarios tienen reactividad frente a humano, mientras que los anticuerpos secundarios poseen reactividad frente a conejo o ratón.

### 6.5.4 **Revelado: Detección por quimioluminiscencia:**

Para el revelado utilizamos el “kit Enhanced luminol-based chemiluminescent” (ECL) o el “kit SuperSignal West Femto”.

La detección de las bandas de proteínas se basa en la reacción de quimioluminiscencia del luminol. Los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo tienen acoplada la enzima peroxidasa de rábano (HRP, “horseradish peroxidase”), que al adicionar los reactivos de revelado (peróxido de hidrógeno y condiciones alcalinas), produce la oxidación del luminol, pasando a estado excitado y emitiendo luminiscencia <sup>120</sup>.

El visualizado de las bandas de proteínas se realizó con “Luminescent Image Analyzer LAS-3000” (Fujifilm) y los análisis densitométricos de estos resultados se realizaron usando el software “ImageQuant”.

### 6.5.5 **Reutilización de membranas de nitrocelulosa “Stripping”:**

Para evaluar otras proteínas en la misma membrana eliminamos los anticuerpos empleados anteriormente. Este proceso consiste en romper la unión de los anticuerpos a sus correspondientes proteínas fijadas a la membrana de nitrocelulosa. La ruptura puede realizarse incubando la membrana de dos maneras:

- **Glicina:** Incubamos la membrana con una solución de glicina 0.5 M pH 2.5 durante 10 min a temperatura ambiente y bajo agitación fuerte.
- **β-mercaptoetanol:** Incubamos la membrana con un tampón de eliminación (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.7,

$\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y SDS 2 %) durante 30 min a 56°C y agitación fuerte.

Posteriormente se realizaron dos lavados de 10 min con TBS-T a temperatura ambiente y se comenzó de nuevo con el bloqueo y la incubación con anticuerpos (ver apartados 6.4.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa y 6.4.3 Incubación con anticuerpos).

### **7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: CITOMETRÍA ESTÁTICA:**

Esta técnica permite analizar y cuantificar de manera automática numerosos parámetros celulares, mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia (IX81, Olympus) acoplado a un ordenador que dispone del software de análisis de imágenes “ScanR versión 2.03.2” (Olympus).

Este método se basa en la utilización de la sonda fluorescente Hoechst 33342 para marcar los núcleos celulares y así, al adicionar una segunda sonda fluorescente (para la detección del parámetro que queremos estudiar), poder cuantificar y relativizar esta segunda fluorescencia asociada a la fluorescencia de los núcleos celulares.

Al contrario que en citometría de flujo, el requisito indispensable de esta técnica es que debe realizarse con células adheridas en placas, lo cual supone una ventaja ya que de este modo evitamos los posibles artefactos que se pueden encontrar al analizar una suspensión de células adherentes (formación de agregados, daño celular producido por el agente enzimático o mecánico utilizado para levantar las células de la superficie en que han crecido, etc.). Por tanto, para realizar estos experimentos

## **IV.METODOLOGÍA**

---

sembramos las células endoteliales (HUVEC o HUAEC) en placas de 24 pocillos.

### **7.1 PRODUCCIÓN DE ERO:**

La medida de la producción de ERO en células endoteliales (HUVEC o HUAEC) se determinó por citometría estática utilizando como sonda fluorescente DCFH-DA (Diclorofluoresceína diacetato).

Esta sonda se rompe intracelularmente debido a la actividad de esterasas no específicas, formando la DCFH, que es oxidada por las ERO dando lugar al compuesto fluorescente DCF<sup>121</sup>. Empleamos rotenona como control positivo de la producción de ERO.

#### **7.1.1 Protocolo experimental:**

Al alcanzar la confluencia, se trataron las células endoteliales (HUVEC o HUAEC) con ABC o ddI (Figura 13) (ver apartado 2. Protocolo experimental de tratamiento) o con rotenona (10  $\mu$ M, estímulo positivo) (4 h, 37°C). 30 min antes de finalizar las 4 h de tratamiento, se adicionaron los fluorocromos, Hoechst 33342 (2  $\mu$ M) para marcar núcleos y DCFH-DA (5  $\mu$ M) para detectar las ERO. La placa se incubó durante estos 30 min a 37°C y oscuridad.

Los filtros de detección de fluorescencia utilizados fueron para Hoechst 350/50 nm y para DCFH-DA 492/18 nm.

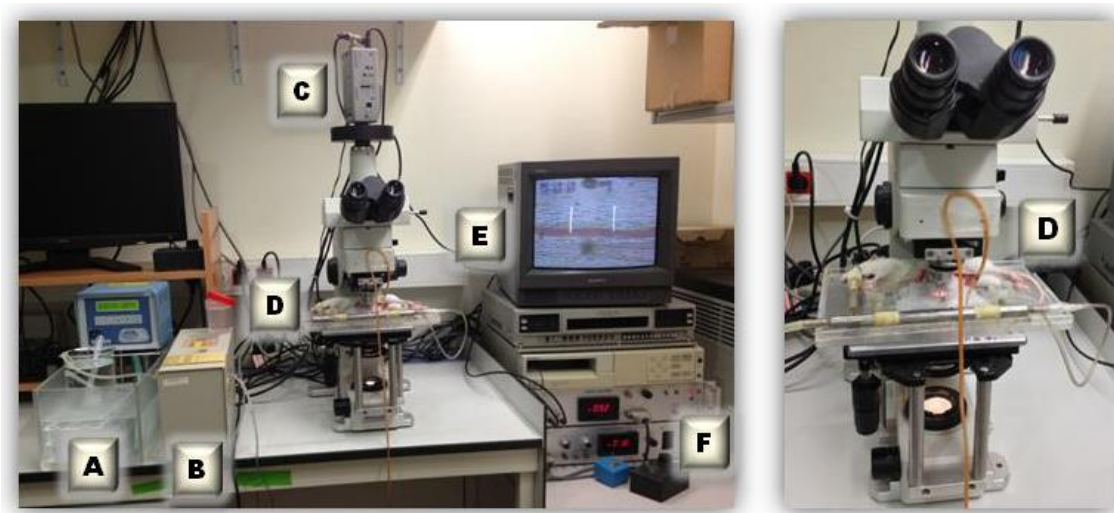
## **BLOQUE II: ESTUDIOS IN VIVO**

### **1. MICROSCOPIA INTRAVITAL:**

Se emplearon ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g) sometidas a ayuno durante 8 h. Estos animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (65 mg/kg). Se procedió a realizar una traqueotomía para mantener una adecuada ventilación pulmonar, una canulación de la vena yugular izquierda para la administración intravenosa de distintas sustancias (anestesia o fármacos) y de la arteria carótida derecha para monitorizar la presión arterial media (PAM) mediante un transductor de presión (Spectramed Stathan P-23XL) conectado a un polígrafo (GRASS RPS7C8B, Quincy).

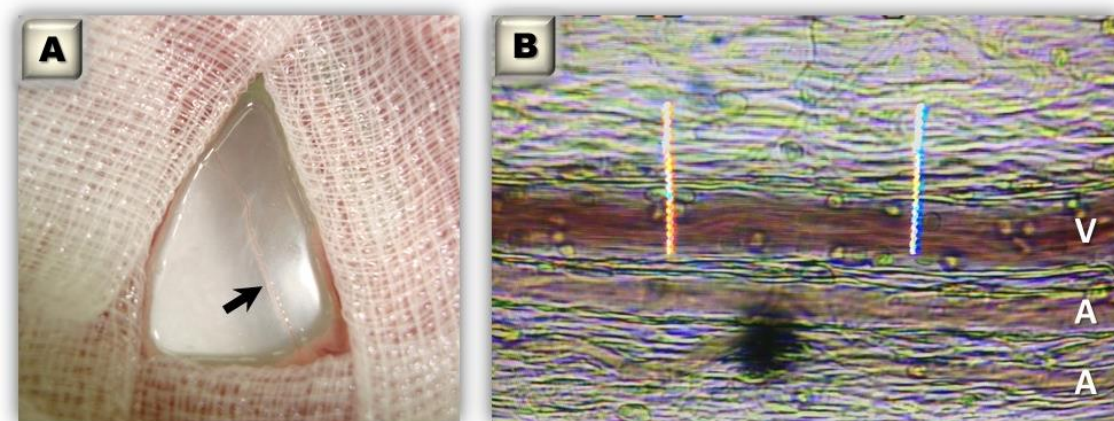
A continuación, se realizó una incisión abdominal empleando un cauterio, el animal se colocó en posición supina y se extendió un segmento del yeyuno medio sobre un pedestal translúcido el cual permite la transiluminación de un área del mesenterio de 2 cm<sup>2</sup>. El área seleccionada del mesenterio fue superfundida continuamente a una velocidad de flujo de 2 mL/min con una solución tampón bicarbonatada de pH 7.4 a una temperatura de 37°C. La preparación mesentérica se observó a través de un Microscopio Intravital Ortostático (Nikkon Optiphot-2, SMZ1) equipado con un objetivo 20x y un ocular 10x, que proyecta las imágenes a un monitor en color, grabándose estas para su posterior análisis <sup>77, 122</sup> (Figura 24).

## IV.METODOLOGÍA



**Figura 24.** Montaje del sistema de microscopía intravital. Las imágenes muestran los diferentes componentes del sistema de microscopía intravital (A: Baño termostático B: Bomba de infusión, C: Videocámara, D: Pedestal translúcido con el animal, E: Monitor de ordenador conectado a la videocámara y a vídeo, F: “Video Caliper” y “Optical doppler Velocimeter”).

Para realizar el estudio se seleccionaron vénulas mesentéricas de 25-40  $\mu\text{m}$  de diámetro y arteriolas de 15-30  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 25).



**Figura 25.** (A) Aislamiento de una vénula mesentérica de rata. (↑) Microvaso a observar en el microscopio (B) Imagen representativa de una vénula mesentérica activada. En la imagen también podemos observar dos arteriolas. V (vénula) y A (arteriola).

### 1.1 PARÁMETROS LEUCOCITARIOS A DETERMINAR:

- **Rodamiento o “rolling” leucocitario:** Un leucocito en fase de rodamiento es aquel que circula a una velocidad inferior a la de los eritrocitos por interactuar con el endotelio venular. Se determina contando el número de leucocitos que enlentecen su velocidad, es decir, que pueden ser visualizados en un punto de referencia de una vénula durante un periodo de 1 min. Se expresa en *células/min* (Figura 19).
- **Velocidad de rodamiento leucocitario:** Tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100  $\mu\text{m}$  de vaso. Se calcula haciendo la media de la velocidad de 10 leucocitos consecutivos. Se expresa en  *$\mu\text{m/s}$*  (Figura 19).
- **Adhesión leucocitaria:** Un leucocito se considera adherido al endotelio venular o arteriolar si permanece estacionado o tiene un contacto estable con él durante un periodo igual o superior a 30 s en 100  $\mu\text{m}$  de vaso. Se expresa como *número de células adheridas/100  $\mu\text{m}$*  de vénula o de arteriola (Figura 19).
- **Migración leucocitaria:** Número de leucocitos que se extravasan de la vénula al tejido circundante. Se expresa como *número de células/campo* (Figura 19).

## IV.METODOLOGÍA

---

### 1.2 PARÁMETROS HEMODINÁMICOS A DETERMINAR:

- **Diámetro venular y arteriolar (Dv y Da):** Dicho parámetro se determina con un “Vídeo Caliper” (Microcirculation Research Institute). Se expresa en  $\mu m$ .
- **“Shear rate” ( $\gamma$ ):** Es la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes venulares. Se expresa en  $s^{-1}$  y se calcula según la definición newtoniana:

$$\gamma = 8 (V_{mean} Dv^{-1}) S^{-1}$$

Donde:

Dv: Diámetro de la vênula.

$V_{mean}$ : Flujo de los eritrocitos. Se calcula como el producto de la velocidad de los eritrocitos y el área seccional, asumiendo que el vaso es un cilindro geométrico ( $V_{mean} = V_{rbc} 1.6^{-1}$ ). La velocidad de los eritrocitos en el torrente sanguíneo ( $V_{rbc}$ ) se determina con la ayuda de un “Optical Doppler Velocimeter” (Microcirculation Research Institute).

- **Presión arterial media (PAM):** Es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias. Se mide con un transductor de presión. Se expresa en  $mm Hg$ .

### 1.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

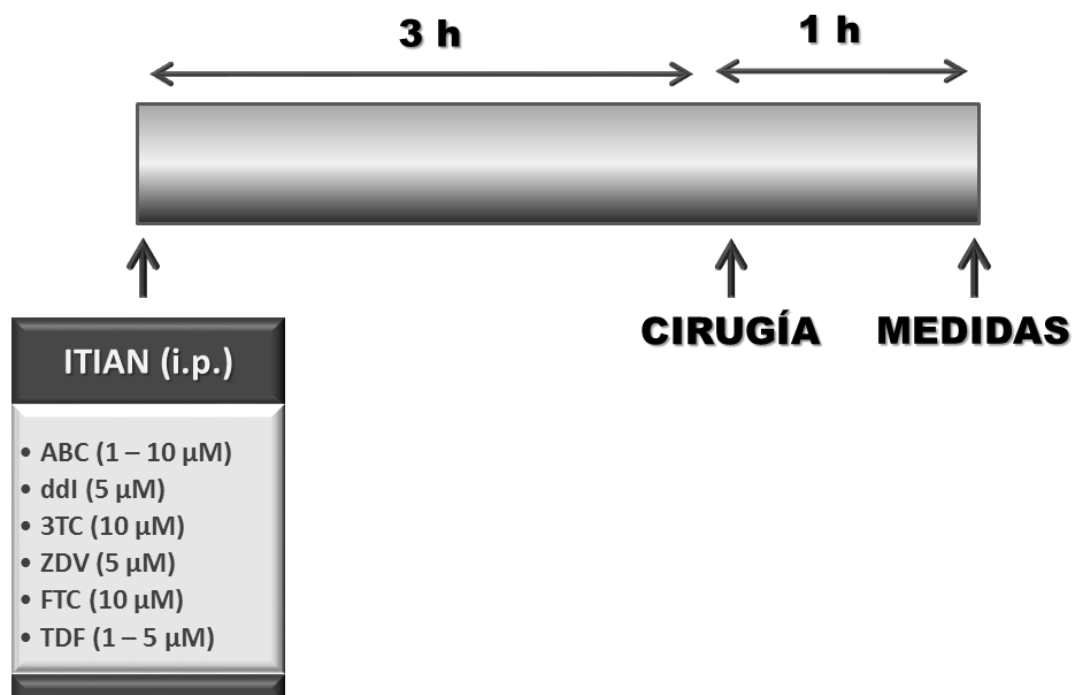
A los animales se les administró por vía intraperitoneal diferentes fármacos ITIAN: ABC (1–10  $\mu M$ ), ddI (5  $\mu M$ ), 3TC (10  $\mu M$ ), ZDV (5  $\mu M$ ), FTC (10  $\mu M$ ), TDF (1–5  $\mu M$ ) o vehículo control (suero fisiológico). Las dosis del fármaco se seleccionaron de



acuerdo con la literatura, intentando mimetizar las concentraciones plasmáticas obtenidas en humanos <sup>75</sup>, 111-113 (Figura 26).

Transcurridas 3 h se anestesiaron los animales, comenzamos la cirugía y tras un periodo de estabilización, a las 4 h se determinaron los parámetros (leucocitarios y hemodinámicos) anteriormente mencionados.

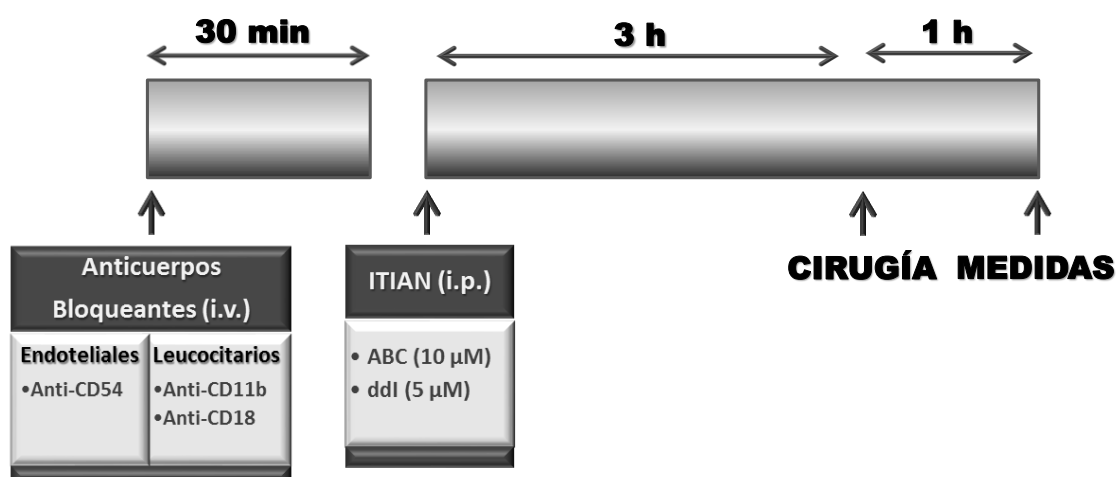
Tras finalizar los experimentos de microscopía intravital extrajimos sangre de los animales a través de su vena mesentérica para la realización de los experimentos de citometría de flujo en sangre de rata (ver apartado 4. Estudio de la expresión de moléculas de adhesión por citometría de flujo).



**Figura 26.** Protocolo experimental de microscopía intravital para la evaluación del efecto de los ITIAN sobre la interacción leucocito-endothelio *in vivo*. A los animales se les administró intraperitonealmente (i.p.) distintos fármacos del grupo ITIAN: Abacavir (ABC), didanosina (ddi), lamivudina (3TC), zidovudina (ZDV), emtricitabina (FTC) y tenofovir (TDF). Transcurridas 3 h se realizó la cirugía de los animales y tras un periodo de estabilización se determinaron los parámetros leucocitarios y hemodinámicos (4 h).

## IV.METODOLOGÍA

Para analizar el papel de las moléculas de adhesión en la interacción leucocito- endotelio inducida por ABC y ddi se pre-trataron los animales por vía intravenosa (cola) con anticuerpos frente a Mac-1 (CD11b, 2 mg/Kg), a integrinas  $\beta_2$  (CD18, 1 mg/Kg), a ICAM-1 (CD54, 1 mg/Kg) o con los anticuerpos control IgG1 (1 mg/Kg) e IgA (2 mg/Kg) (30 min) <sup>122, 123</sup>. Posteriormente se procedió a la administración intraperitoneal de ABC o ddi (4 h, 37°C). Transcurrido el período de incubación con el tratamiento antirretroviral se procedió a realizar la técnica de microscopía intravital descrita anteriormente (Figura 27).



**Figura 27.** Protocolo experimental de microscopía intravital para evaluar la implicación de las moléculas de adhesión en la interacción leucocito- endotelio inducida por ABC o ddi. Pre-tratamiento (30 min) de los animales por vía intravenosa (i.v.) con anticuerpos bloqueantes de moléculas de adhesión endoteliales (anti-CD54) o leucocitarias (anti-CD11b y anti-CD18) y posterior tratamiento por vía intraperitoneal (i.p.) con abacavir (ABC) o didanosina (ddi). Transcurridas 3h se realizó la cirugía de los animales y tras un periodo de se determinaron los parámetros leucocitarios y hemodinámicos (4 h).

**MATERIAL**

Los siguientes fármacos antirretrovirales, anticuerpos, animales y reactivos fueron obtenidos de las casas comerciales que se indican en las tablas 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente.

**Tabla 6. Fármacos antirretrovirales.**

<b>FÁRMACO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Abacavir	Sequoia Research Products
Didanosina	Sequoia Research Products
Emtricitabina	Sequoia Research Products
Lamivudina	Sequoia Research Products
Tenofovir	Sequoia Research Products
Zidovudina	Sequoia Research Products

**Tabla 7. Anticuerpos frente a rata.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Anticuerpo bloqueante Mouse Anti-Rat CD11b (WT.5)	BD Biosciences
Anticuerpo bloqueante Mouse Anti-Rat CD18 (WT.3)	BD Biosciences
Anticuerpo bloqueante Mouse Anti-Rat CD54 (1A29)	BD Biosciences
Anticuerpo bloqueante Mouse IgG1κ Isotipo Control	BD Biosciences
Anticuerpo bloqueante IgA κ Isotipo Control	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD11a conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD11b conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD18 conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD62L conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD49d conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a IgG1 Isotipo Control conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a IgGA Isotipo Control conjugado con FITC	BD Biosciences

## IV.METODOLOGÍA

**Tabla 8. Anticuerpos frente a humano.**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Anticuerpo bloqueante frente a CD11a (clon m38)	Calbiochem
Anticuerpo bloqueante frente a CD11b (clon ICRF44)	Calbiochem
Anticuerpo bloqueante frente a CD18 (clon IB4)	Calbiochem
Anticuerpo bloqueante frente a CD54	BD Biosciences
Anticuerpo frente a IgG1 Isotipo Control	eBioscience
Anticuerpo frente a CD62E conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD54 conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD106 conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD11a conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD18 conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD62L conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD11b/Mac-1 conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD49d conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente a IgG1 Isotipo $\kappa$ conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo Mouse monoclonal anti NF- $\kappa$ B (p65)	Invitrogen
Anticuerpo Rabbit policlonal anti I $\kappa$ B- $\alpha$ (C-21): sc-371	Santa Cruz
Anticuerpo Mouse monoclonal anti CD73 (2B6)	Abcam
Anticuerpo Mouse monoclonal anti CD39 (AC2)	Abcam
Anticuerpo Rabbit anti Nucleolina	Sigma
Anticuerpo Rabbit anti Actina	Sigma

**Tabla 9. Animales.**

<b>ANIMALES</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Ratas Sprague-Dawley macho 200 – 250 g	Charles River Laboratorios

**Tabla 10. Reactivos y material.**

<b>REACTIVO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
A317491	Sigma
Acrilamida/bisacrilamida 0.8%	Sigma
Agua para cultivos	Sigma
Albúmina sérica bovina	Sigma
Albumina sérica humana (HSA, Albuminate 25 %)	Sigma
Apirasa	Sigma
ATP Bioluminescence Kit	Roche Diagnostics
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Brilliant Blue G pure (BBG)	Sigma
CGS-21680	Sigma
Colagenasa	Gibco Invitrogen
Cubre de plástico de 25 mm de diámetro	Nunc
Dextrano	Sigma
Diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA)	Invitrogen
Dulbecco's PBS con Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup> (DPBS <sup>+</sup> )	Lonza
Dulbecco's PBS sin Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup> (DPBS <sup>-</sup> )	Lonza
EBM-2 medio de cultivo	Lonza
EGTA	Sigma
Fibronectina	Sigma
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare
Formalina 10 %	Sigma
Gases	AirLiquide
HBSS	Lonza
Hoechst 33342	Sigma
Hybond ECL membrane de nitrocelulosa	Amersham Pharm. Biotech
Kit ECL	GE Healthcare
Kit Supersignal West Femto	Pierce
MRS2159	Sigma
NF023	Sigma
oxATP	Sigma
PAF	Sigma
PBS	Gibco Invitrogen
Pentobarbital sódico	Guinama
Precision Plus Protein Standar-Kaleidoscope	Bio-Rad
Rotenona	Sigma
RPMI 1640 suplementado con 20 mM HEPES	Sigma
Scrappers	Corning
Solución de lisis citometria	BD
Solución de Ponceau	Sigma
Suero fetal bovino	Lonza
Suero fisiológico (NaCl 0.9 %)	Braun
Suramina	Sigma
TNF- $\alpha$ recombinante	Sigma
Tripsina	Gibco Invitrogen
Tubos con citrato sódico	BD Vacutainer

### **COMITÉS ÉTICOS**

El Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia aprobó el proyecto al cual está adscrito este estudio con muestras de cordón umbilical o sangre humana y la totalidad de los pacientes firmaron el consentimiento informado. No existen diferencias significativas basadas en el sexo, raza o etnia entre los grupos.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia aprobó los estudios con animales de experimentación realizados. Estos estudios están en concordancia con las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados han sido expresado como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.) para un número de experimentos  $\geq 4$ . Los resultados han sido analizados mediante un análisis de varianza One-way ANOVA con la corrección posterior Newman-Keuls. En todos los casos, se considera que la diferencia entre grupos es significativa cuando  $p < 0.05$ .

En algunos casos, los datos se representan como porcentaje del control, siendo considerado el control negativo (el valor obtenido en las células sin tratamiento) como 100 %.

## **V.RESULTADOS**





## **BLOQUE I: ESTUDIOS IN VITRO**

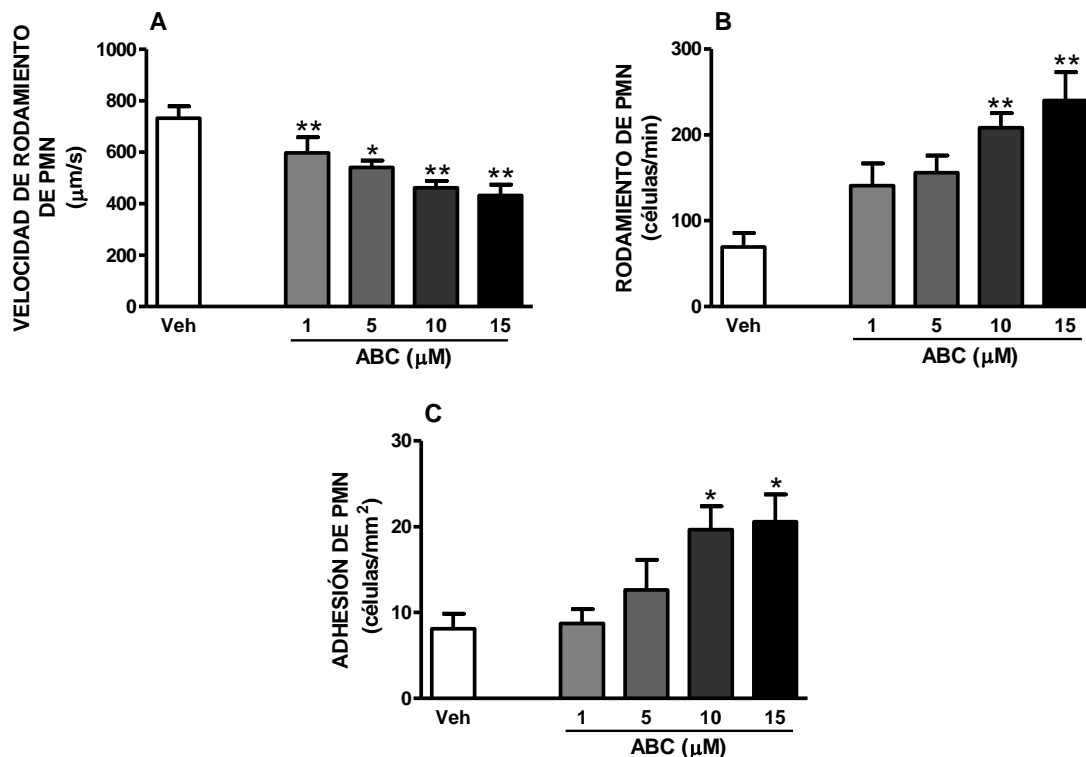
### **1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

#### **1.1 EFECTO DE ABC SOBRE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

Analizamos el efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio como primer paso en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo. Para ello, incubamos las células endoteliales (HUVEC o HUAEC) y los leucocitos (PMN o PBMC) por separado con concentraciones crecientes del fármaco (4 h, 37°C).

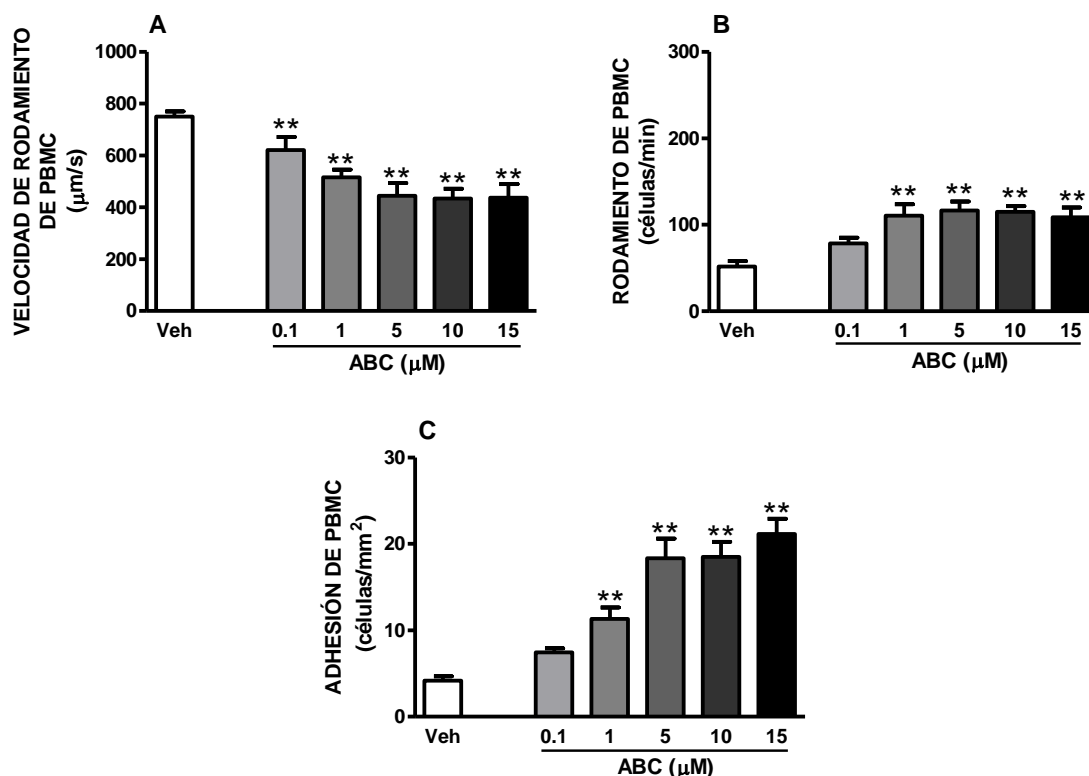
En primer lugar, evaluamos su efecto sobre la interacción PMN/HUVEC. Tras el tratamiento de ambos tipos celulares con dicho fármaco se produjo un incremento significativo y dosis dependiente en los parámetros de rodamiento (Figura 28B) y adhesión (Figura 28C) de PMN sobre HUVEC, así como una reducción significativa y dosis dependiente de la velocidad de rodamiento de estos leucocitos sobre el endotelio venular (Figura 28A).

**PMN/HUVEC**



**Figura 28.** Efecto dosis-respuesta de ABC sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PMN sobre endotelio venular. HUVEC y PMN fueron tratados independientemente con abacavir (ABC, 1-15 μM) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados están expresados como la media ± E.E.M. (n = 4-6). \*p<0.05 ó \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Cuando analizamos los efectos de este ITIAN sobre HUVEC y PBMC, observamos que los PBMC fueron más sensibles que los PMN a los efectos del fármaco. En este sentido dosis diez veces inferiores de ABC produjeron un incremento significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 29B) y adhesión (Figura 29C) de PBMC sobre HUVEC así como una reducción significativa en la velocidad de rodamiento de este tipo de leucocitos sobre el endotelio venular (Figura 29A).

**PBMC/HUVEC**

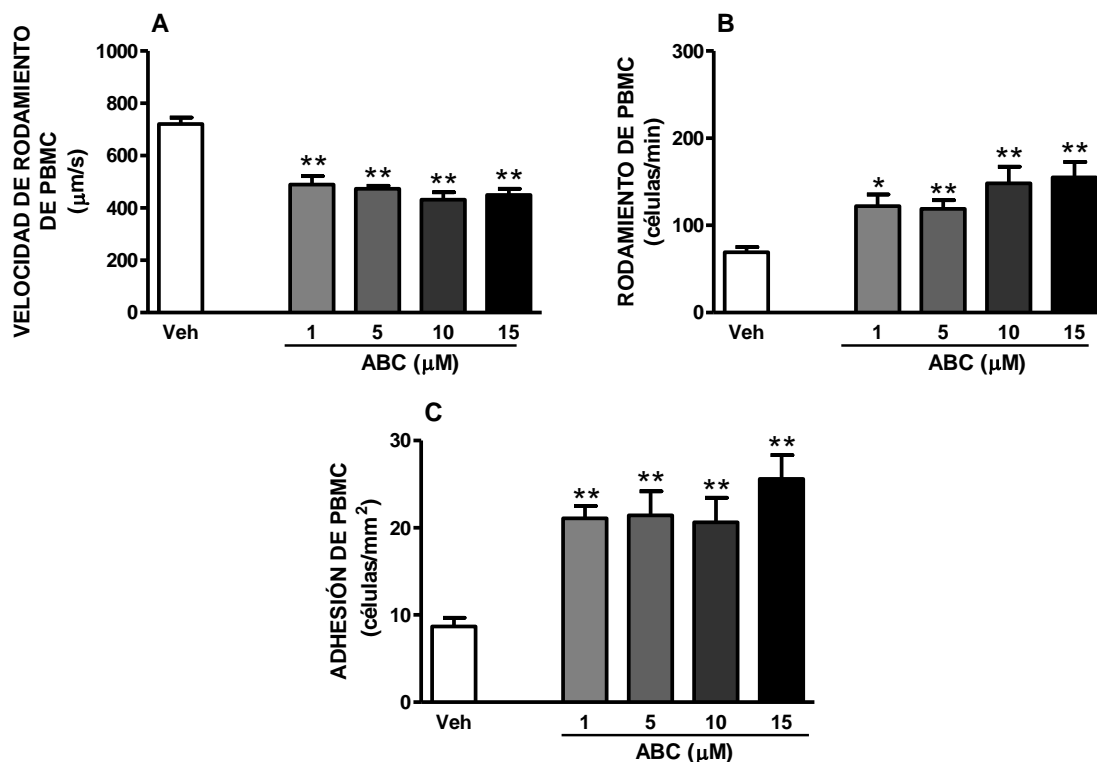
**Figura 29.** Efecto dosis-respuesta de ABC sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PBMC sobre endotelio venular. HUVEC y PBMC fueron tratados independientemente con abacavir (ABC, 0.1-15 μM) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Debido a la importancia de la acumulación de PBMC en el endotelio arteriolar como primer paso en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio y concretamente en la génesis del proceso aterosclerótico, quisimos evaluar el efecto de ABC sobre el endotelio arterial, en particular sobre la interacción PBMC/HUAEC. Al igual que en el endotelio venular, dosis diez veces inferiores del fármaco indujeron un incremento significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 30B) y adhesión (Figura 30C) de PBMC sobre HUAEC así como

## V.RESULTADOS

una reducción significativa en la velocidad de rodamiento de este tipo leucocitario sobre el endotelio arterial (Figura 30A).

### PBMC/HUAEC



**Figura 30.** Efecto dosis-respuesta de ABC sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PBMC sobre endotelio arterial. HUAEC y PBMC fueron tratados independientemente con abacavir (ABC, 1-15  $\mu\text{M}$ ) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \*p < 0.05 ó \*\*p < 0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

**1.2 EFECTO DE OTROS FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA INTERACCIÓN**

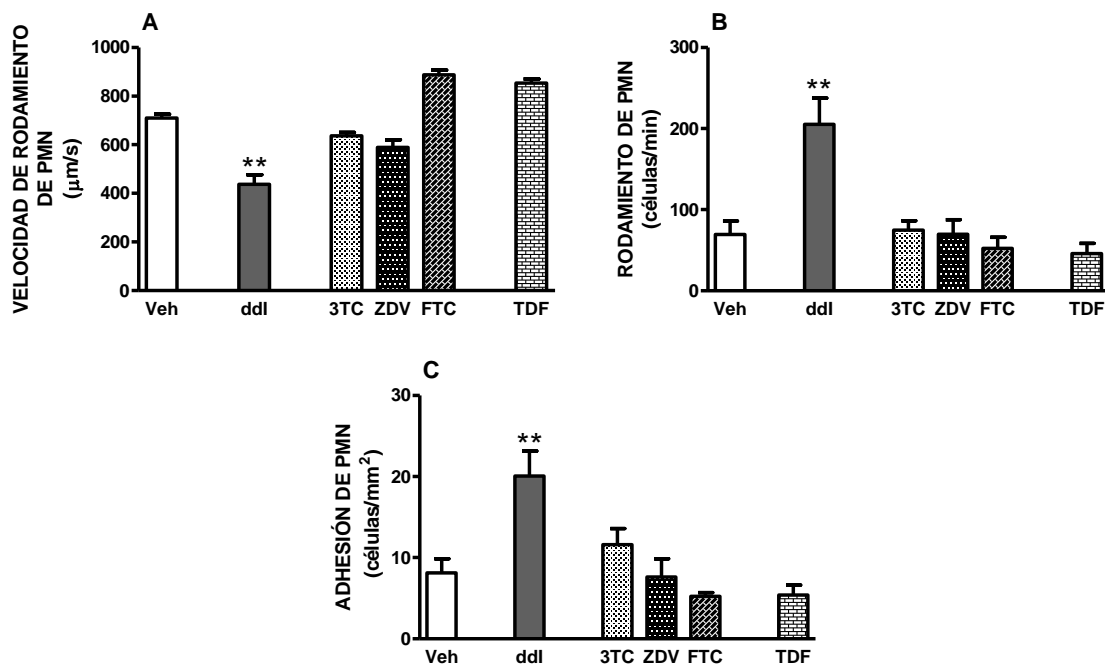
**LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

A continuación, evaluamos el efecto de otros fármacos antirretrovirales ITIAN sobre la interacción leucocito-endotelio empleando de nuevo la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

Incubamos las células endoteliales (HUVEC o HUAEC) y los leucocitos (PMN o PBMC) por separado con los distintos ITIAN a dosis clínicamente relevantes. Analizamos el efecto de un análogo de adenosina (ddI), dos análogos de citidina (3TC y FTC), un análogo de timidina (ZDV) y un análogo de nucleótido (TDF) (4 h, 37°C).

Únicamente ddI indujo un incremento significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 31B) y adhesión (Figura 31C) de PMN sobre HUVEC, así como una reducción significativa en la velocidad de rodamiento de este tipo de leucocitos sobre el endotelio venular (Figura 31A). Los tratamientos con 3TC, ZDV, FTC y TDF no produjeron modificaciones en dichos parámetros (Figura 31).

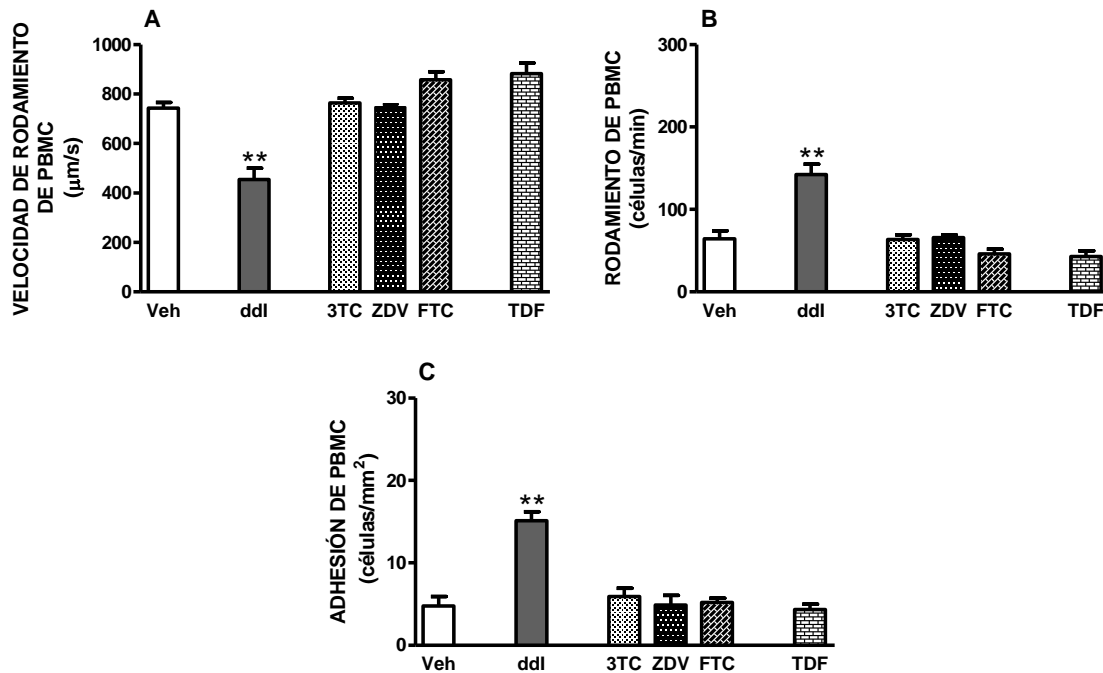
PMN/HUVEC



**Figura 31.** Efecto de diferentes fármacos ITIAN sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PMN sobre endotelio venular. HUVEC y PMN fueron tratados independientemente con didanosina (ddl, 5 µM), lamivudina (3TC, 10 µM), zidovudina (ZDV, 5 µM), emtricitabina (FTC, 10 µM), tenofovir (TDF, 1 µM) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Posteriormente, analizamos el efecto de estos ITIAN sobre la interacción PBMC/HUVEC. Al igual que en el caso de los PMN, únicamente ddl produjo un incremento tanto del rodamiento (Figura 32B) como de la adhesión (Figura 32C) de PBMC sobre HUVEC, así como una reducción de la velocidad de rodamiento de este tipo de leucocitos sobre el endotelio venular (Figura 32A). Los tratamientos con 3TC, ZDV, FTC y TDF no produjeron variaciones en ninguno de estos parámetros (Figura 32).

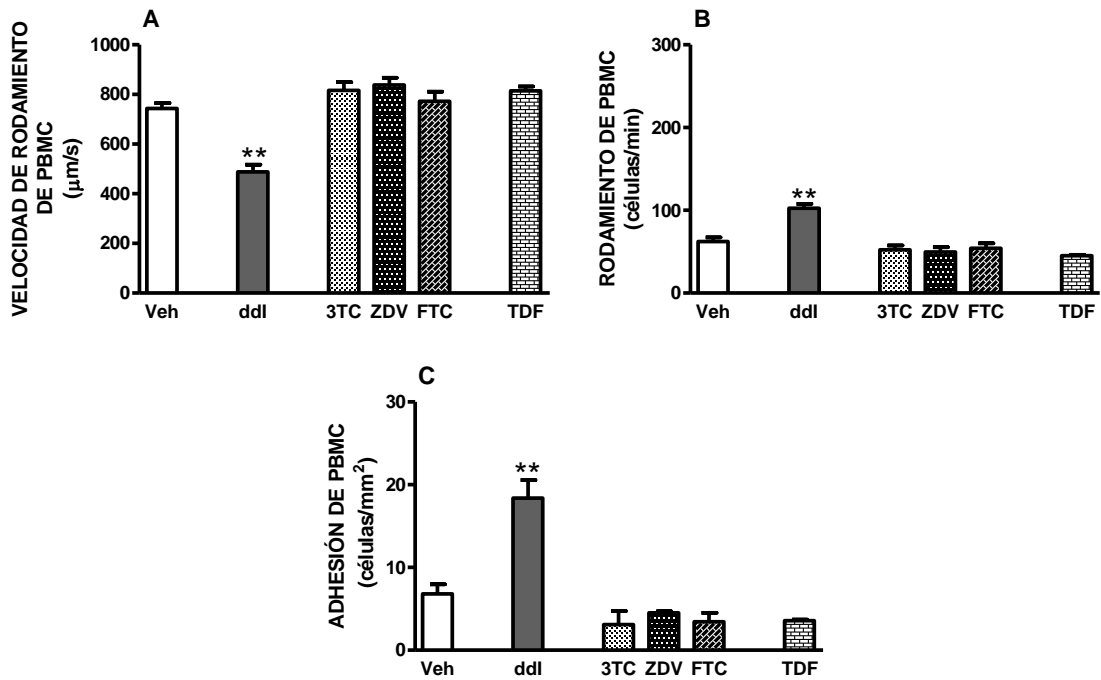
## PBMC/HUVEC



**Figura 32.** Efecto de diferentes fármacos ITIAN sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PBMC sobre endotelio venular. HUVEC y PBMC fueron tratados independientemente con didanosina (ddl, 5 µM), lamivudina (3TC, 10 µM), zidovudina (ZDV, 5 µM), emtricitabina (FTC, 10 µM), tenofovir (TDF, 1 µM) o con el vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Finalmente quisimos evaluar el efecto de los distintos ITIAN sobre el endotelio arteriolar, concretamente sobre la interacción PBMC/HUAEC. Observamos que únicamente ddl indujo un incremento significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 33B) y adhesión (Figura 33C) de PBMC sobre HUAEC, así como una reducción significativa en la velocidad de rodamiento de este tipo leucocitario sobre el endotelio arteriolar (Figura 33A). Los tratamientos con 3TC, ZDV, FTC y TDF no produjeron modificaciones en dichos parámetros (Figura 33).

PBMC/HUAEC



**Figura 33.** Efecto de diferentes fármacos ITIAN sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de PBMC sobre endotelio arteriolar. HUAEC y PBMC fueron tratados independientemente con didanosina (ddl, 5 µM), lamivudina (3TC, 10 µM), zidovudina (ZDV, 5 µM), emtricitabina (FTC, 10 µM), tenofovir (TDF, 1 µM) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

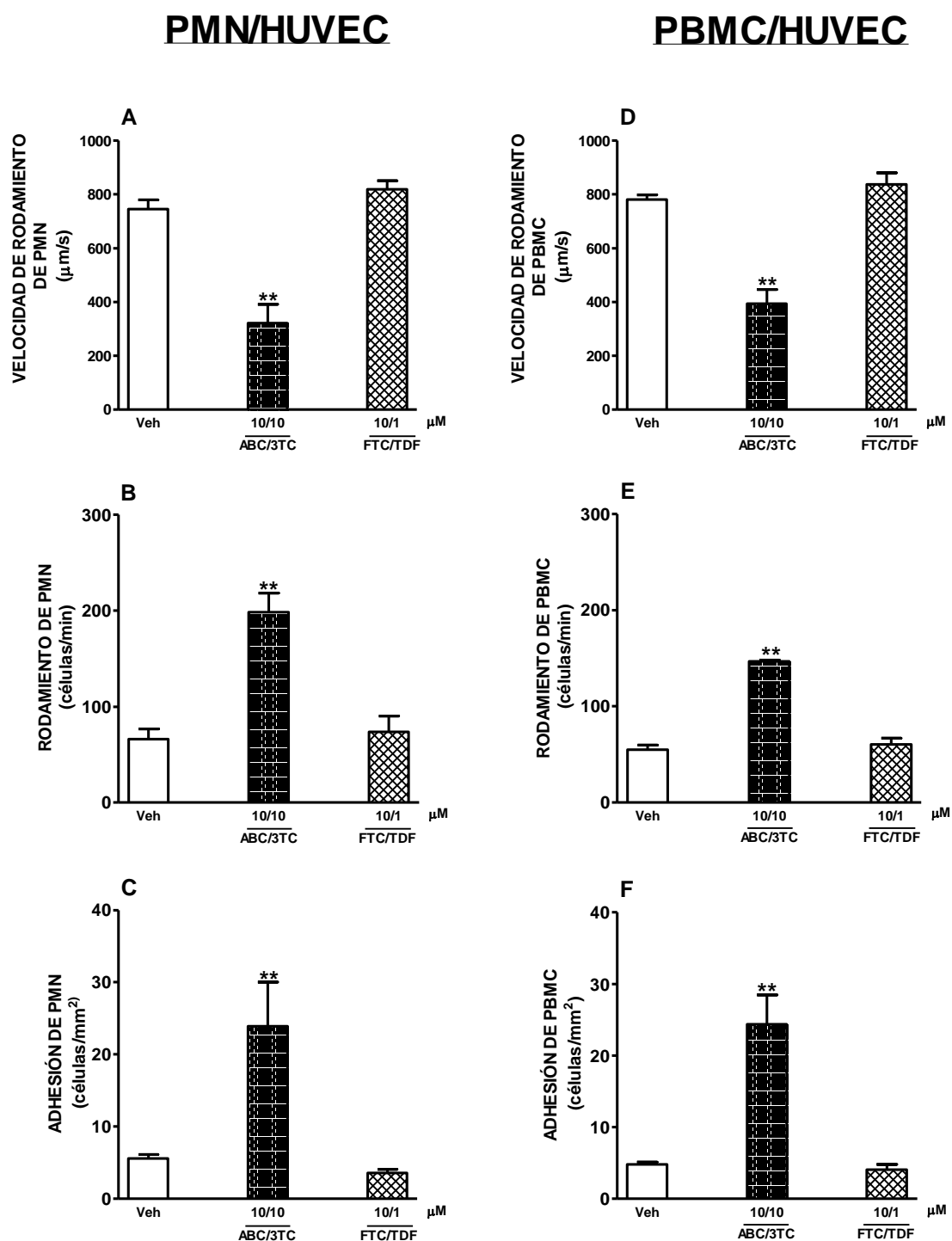


### **1.3 ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE ITIAN EMPLEADAS FRECUENTEMENTE EN LA TERAPÉUTICA ACTUAL SOBRE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

Para finalizar este grupo de experimentos, decidimos realizar un estudio comparativo del efecto de las dos combinaciones de ITIAN más empleadas en la terapéutica actual del VIH (ABC/3TC y FTC/TDF) sobre la interacción leucocito-endotelio empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

Tratamos las células endoteliales (HUVEC) y los leucocitos (PMN o PBMC) por separado con las combinaciones ABC/3TC o FTC/TDF (4 h, 37°C).

La combinación ABC/3TC produjo un incremento significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 34B, E) y adhesión (Figura 34C, F) de PMN y PBMC respectivamente sobre HUVEC, así como una reducción significativa en la velocidad de rodamiento de ambos tipos de leucocitos sobre el endotelio venular (Figura 34A, D). La combinación FTC/TDF no produjo variaciones en dichos parámetros (Figura 34).



**Figura 34.** Efecto de las combinaciones de ITIAN más empleadas sobre la velocidad de rodamiento (A, D), el rodamiento (B, E) y la adhesión (C, F) de PMN y PBMC respectivamente sobre endotelio venular. HUVEC, PMN y PBMC fueron tratados independientemente con las combinaciones abacavir/lamivudina (ABC/3TC, 10  $\mu\text{M}$ /10  $\mu\text{M}$ ), emtricitabina/tenofovir (FTC/TDF, 10  $\mu\text{M}$ /1  $\mu\text{M}$ ) o con su vehículo (4 h) y los parámetros fueron determinados tras el ensamblaje de la cámara de flujo. Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## **2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:**

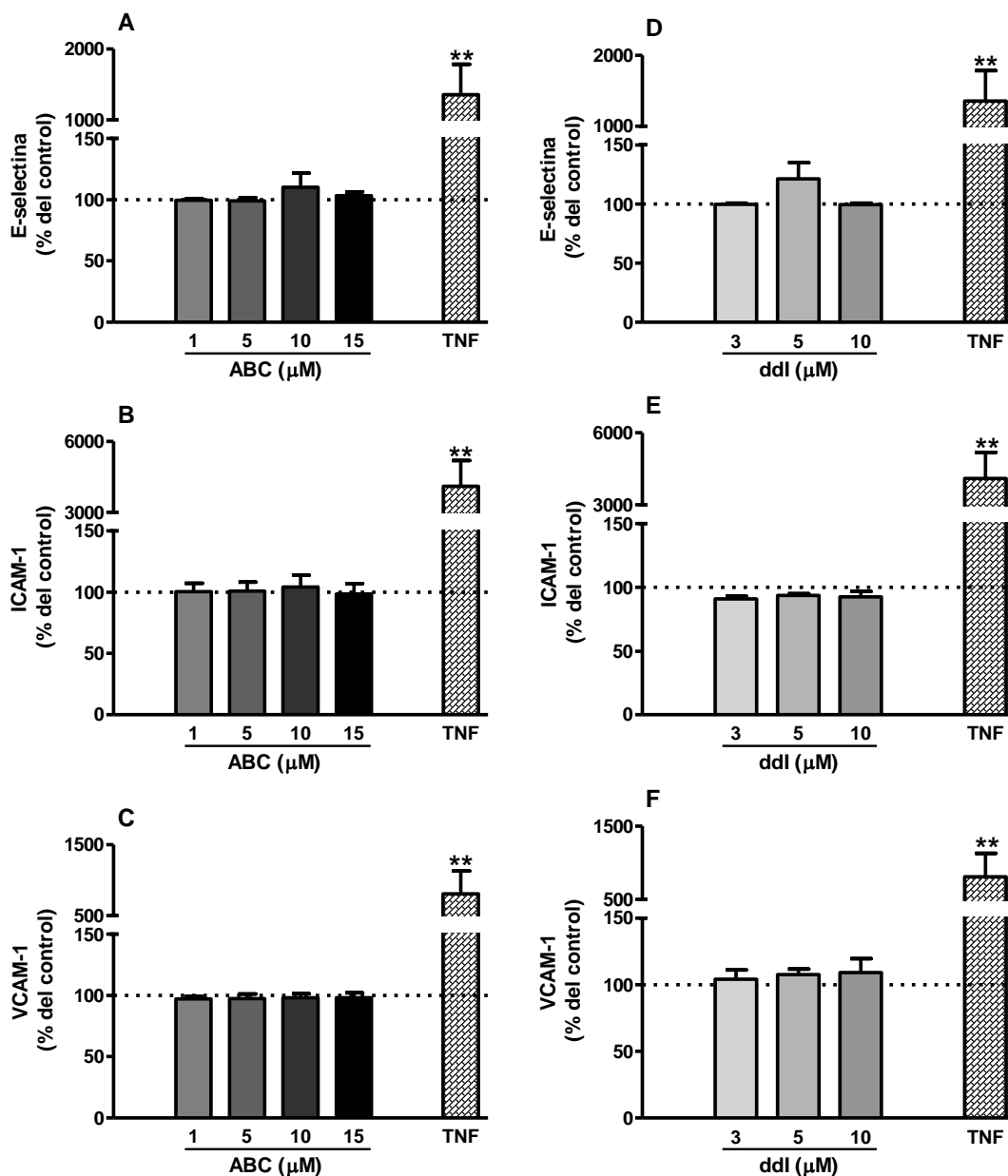
### **2.1 ESTUDIO DEL EFECTO DE ABC Y ddI SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:**

#### **2.1.1 Células endoteliales:**

Para determinar si ABC y ddI producen una activación endotelial, analizamos el efecto de ambos ITIAN (4 h, 37°C) sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión endoteliales: E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 mediante citometría de flujo.

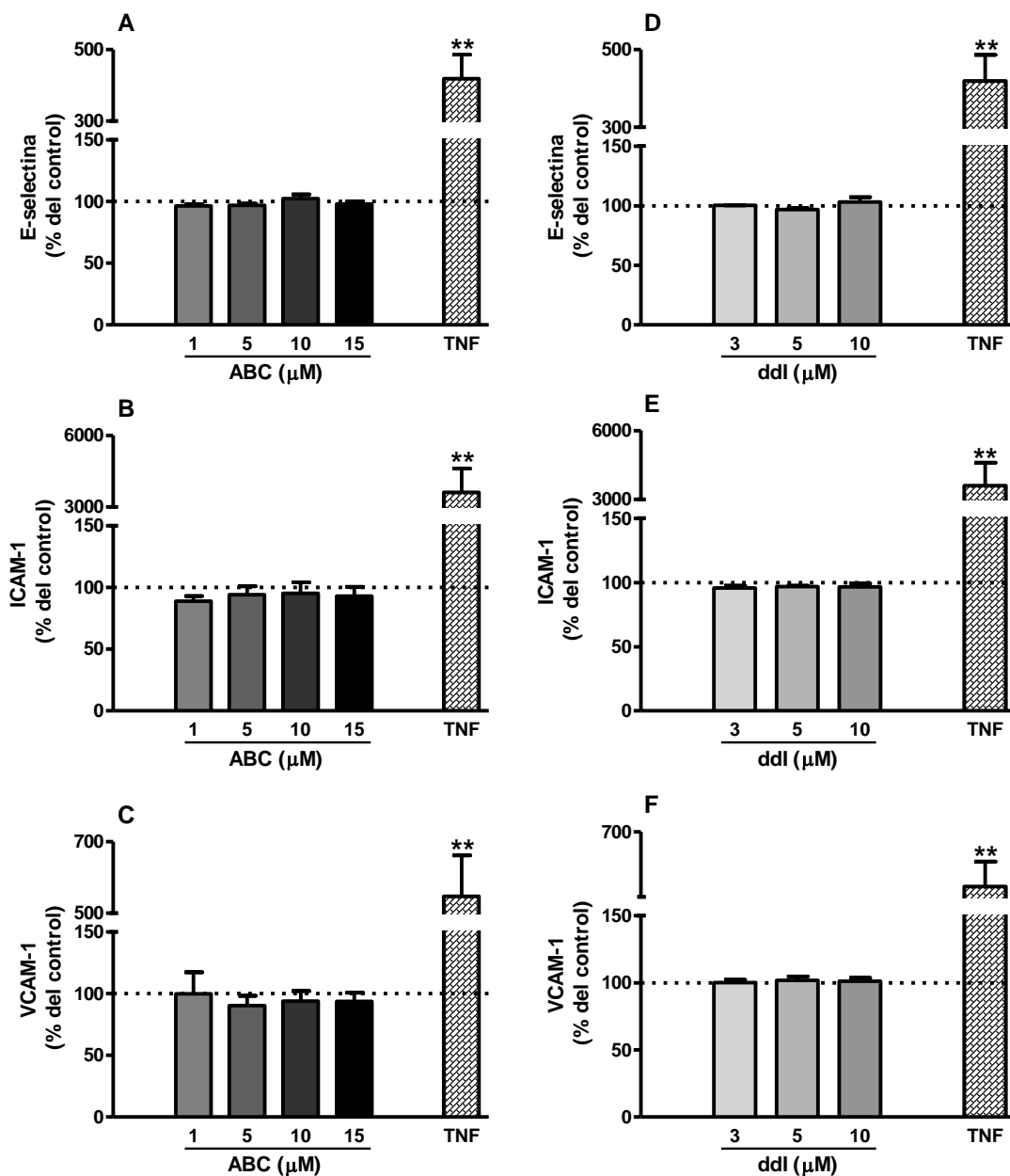
Las concentraciones de ABC y ddI evaluadas no modificaron la expresión de dichas moléculas de adhesión ni en HUVEC (Figura 35) ni en HUAEC (Figura 36).

## HUVEC



**Figura 35.** Efecto de ABC y ddi sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina (A, D), ICAM-1 (B, E) y VCAM-1 (C, F) en células endoteliales procedentes de venas (HUVEC). HUVEC fueron tratadas con dosis crecientes de abacavir (ABC, 1-15 μM), didanosina (ddi, 3-10 μM), TNF-α (25 ng/mL) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## HUAEC



**Figura 36.** Efecto de ABC y ddi sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina (A, D), ICAM-1 (B, E) y VCAM-1 (C, F) en células endoteliales procedentes de arterias (HUAEC). HUAEC fueron tratadas con dosis crecientes de abacavir (ABC, 1-15  $\mu$ M), didanosina (ddi, 3-10  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (25ng/mL) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## V.RESULTADOS

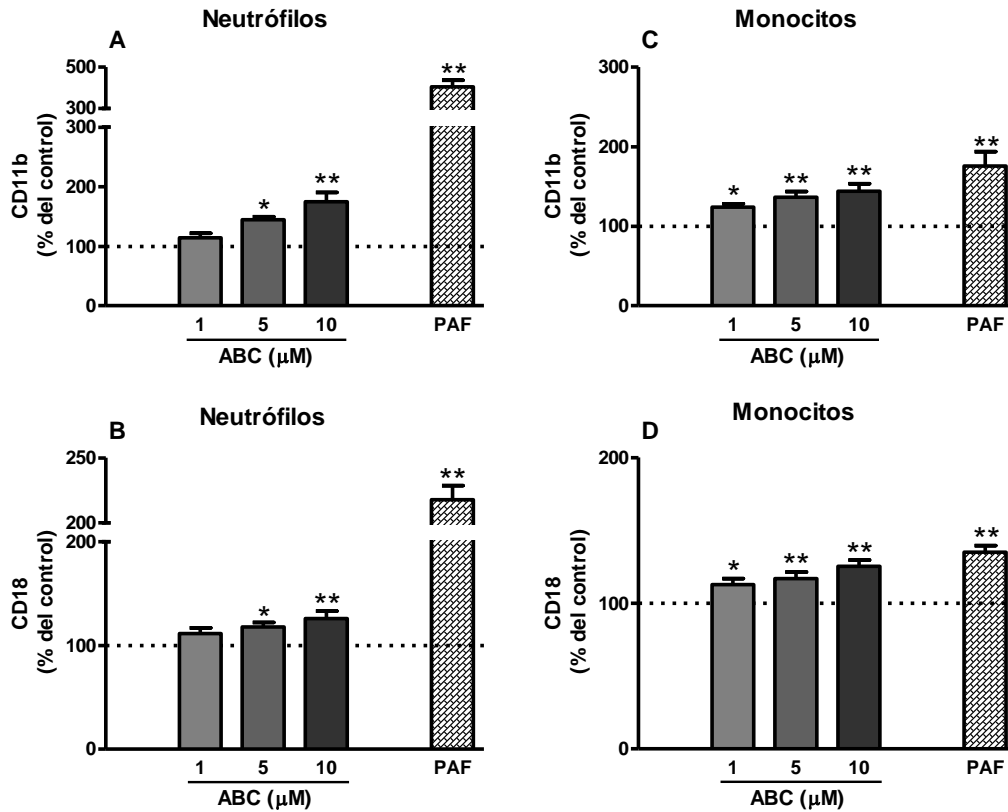
---

### 2.1.2 Leucocitos humanos:

Paralelamente, para determinar si estos fármacos inducen una activación leucocitaria, analizamos en sangre procedente de donantes sanos, el efecto de ABC y ddI (4 h, 37°C) sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión leucocitarias: LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), integrinas  $\beta_2$  (CD18), VLA-4 (CD49d) y L-selectina (CD62L) mediante citometría de flujo.

LFA-1 y Mac-1 son moléculas de adhesión tipo integrina  $\beta_2$ , formadas por una subunidad específica  $\alpha$  (CD11a y CD11b respectivamente) y una subunidad común de las integrinas tipo  $\beta_2$  (CD18). VLA-4 (CD49d) es una integrina  $\alpha_4\beta_1$  y L-selectina (CD62L) pertenece a la familia de las selectinas.

Tras el tratamiento con ABC observamos un incremento significativo y dosis dependiente de la expresión de la subunidad específica CD11b en neutrófilos (Figura 37A) y en monocitos (Figura 37C), así como de la subunidad común CD18 en neutrófilos (Figura 37B) y en monocitos (Figura 37D).



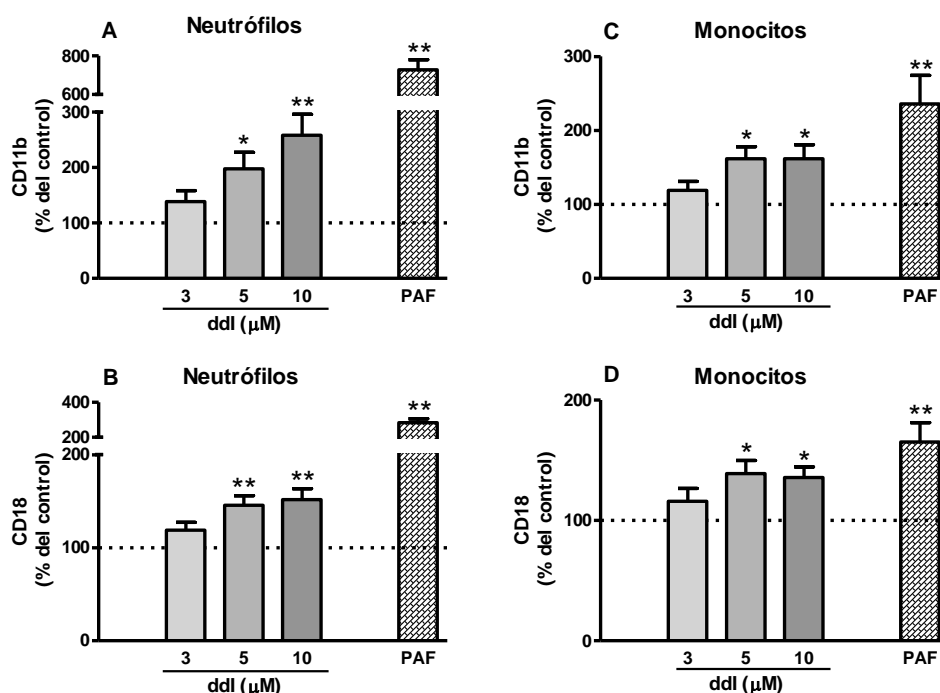
**Figura 37. Efecto dosis-respuesta de ABC sobre la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias CD11b (A, C) y CD18 (B, D) en neutrófilos y monocitos respectivamente.** La sangre fue tratada con concentraciones crecientes de abacavir (ABC, 1-10  $\mu\text{M}$ ), con su vehículo (4 h) o con PAF (10  $\mu\text{M}$ , 1 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \* $p < 0.05$  ó \*\* $p < 0.01$  respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Sin embargo, las dosis evaluadas de ABC no tuvieron efectos sobre las siguientes subunidades: CD11a en neutrófilos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $102.9 \pm 2.6$  %) y en monocitos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $106.9 \pm 6.6$  %), CD49d en neutrófilos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $99.5 \pm 0.5$  %) y en monocitos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $100.1 \pm 5.1$  %), CD62L en neutrófilos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $105.2 \pm 7.4$  %) y en monocitos (ABC 10  $\mu\text{M}$ :  $103.4 \pm 7.3$  %). Estos porcentajes indican la media de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %).

## V.RESULTADOS

Tampoco se observaron cambios en la expresión de ninguna de las moléculas de adhesión a nivel de la población linfocitaria: CD11a (ABC 10  $\mu$ M:  $98.2 \pm 0.7$  %), CD11b (ABC 10  $\mu$ M:  $101.3 \pm 0.8$  %), CD18 (ABC 10  $\mu$ M:  $102.2 \pm 2.8$  %), CD49d (ABC 10  $\mu$ M:  $96.2 \pm 1.9$  %) y CD62L (ABC 10  $\mu$ M:  $101.4 \pm 1.1$  %). Estos porcentajes indican la media de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %).

Resultados similares se obtuvieron tras el tratamiento de las muestras sanguíneas con ddi. Este ITIAN indujo un incremento significativo y dosis dependiente de la expresión de la subunidad específica CD11b en neutrófilos (Figura 38A) y en monocitos (Figura 38C), así como de la subunidad común CD18 en neutrófilos (Figura 38B) y en monocitos (Figura 38D).



**Figura 38.** Efecto dosis-respuesta de ddi sobre la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias CD11b (A, C) y CD18 (B, D) en neutrófilos y monocitos respectivamente. La sangre fue tratada con dosis crecientes de didanosina (ddi, 3–10  $\mu$ M), con su vehículo (4 h) o con PAF (10  $\mu$ M, 1 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \*p<0.05 ó \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).



Las dosis evaluadas de ddI no tuvieron efectos sobre las siguientes subunidades: CD11a en neutrófilos (ddI 5  $\mu$ M:  $98.1 \pm 2.9$  %) y en monocitos (ddI 5  $\mu$ M:  $107.4 \pm 5.1$  %), CD49d en neutrófilos (ddI 5  $\mu$ M:  $100.2 \pm 0.5$  %) y en monocitos (ddI 5  $\mu$ M:  $97.6 \pm 2.8$  %), CD62L en neutrófilos (ddI 5  $\mu$ M:  $109.8 \pm 2.7$  %) y en monocitos (ddI 5  $\mu$ M:  $105.9 \pm 3.2$  %). Estos porcentajes indican la media de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %).

Tampoco se observaron cambios en la expresión de ninguna de las moléculas de adhesión a nivel de la población linfocitaria: CD11a (ddI 5  $\mu$ M:  $97.9 \pm 3.1$  %), CD11b (ddI 5  $\mu$ M:  $96.3 \pm 9.1$  %), CD18 (ddI 5  $\mu$ M:  $92.2 \pm 9.2$  %), CD49d (ddI 5  $\mu$ M:  $94.9 \pm 5.5$  %) y CD62L (ddI 5  $\mu$ M:  $97.6 \pm 3.3$  %). Estos porcentajes indican la media de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %).

Estos resultados sugieren que ABC y ddI inducen un aumento de la expresión de la integrina leucocitaria Mac-1 (CD11b/CD18).

## **2.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE OTROS ITIAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:**

### **2.2.1 Células endoteliales:**

Evaluamos el efecto de otros ITIAN empleados frecuentemente en la terapéutica antirretroviral actual: 3TC, FTC y TDF (4 h, 37°C) sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC mediante citometría de flujo.

## V.RESULTADOS

La expresión de dichas moléculas no se vio modificada por las concentraciones evaluadas de ninguno de los ITIAN mencionados (Tabla 11).

**Tabla 11.** Efecto de diferentes fármacos ITIAN sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales procedentes de venas (HUVEC).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN HUVEC, % vs. control (4 h)			
	3TC (10 $\mu$ M)	FTC (10 $\mu$ M)	TDF (1 $\mu$ M)
E-selectina	111.4 $\pm$ 18.8	103.9 $\pm$ 3.0	102.2 $\pm$ 2.3
ICAM-1	89.3 $\pm$ 9.7	102.9 $\pm$ 5.7	105.7 $\pm$ 7.4
VCAM-1	103.8 $\pm$ 6.1	109.1 $\pm$ 5.6	109.0 $\pm$ 5.6

HUVEC fueron tratadas con concentraciones clínicas de los distintos ITIAN; lamivudina (3TC, 10  $\mu$ M), emtricitabina (FTC, 10  $\mu$ M) y tenofovir (TDF, 1  $\mu$ M) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4). (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

### 2.2.2 Leucocitos humanos:

Paralelamente, determinamos si dichos fármacos ITIAN afectan a la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias, concretamente a: LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), integrinas  $\beta_2$  (CD18), VLA-4 (CD49d) y L-selectina (CD62L).

Tratamos sangre procedente de donantes sanos con concentraciones clínicas de 3TC, FTC y TDF (4 h, 37°C).

La expresión de dichas moléculas de adhesión no se vio modificada por las concentraciones evaluadas de estos ITIAN en ninguna de las poblaciones leucocitarias (Tabla 12).

**Tabla 12.** Efecto de diferentes fármacos ITIAN sobre la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias (CD11a, CD11b, CD18, CD49d y CD62L) en neutrófilos (A), monocitos (B) y linfocitos (C).

**A**

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN NEUTROFILOS, % vs. control (4 h)			
	3TC (10 µM)	FTC (10 µM)	TDF (1 µM)
CD11a	97.9 ± 3.1	96.8 ± 2.4	96.2 ± 2.6
CD11b	96.3 ± 9.1	96.3 ± 10.3	103.3 ± 13.4
CD18	92.18 ± 9.2	96.8 ± 4.1	96.3 ± 5.7
CD49d	94.9 ± 5.5	99.7 ± 0.3	99.8 ± 0.3
CD62L	94.9 ± 6.6	94.7 ± 6.1	93.6 ± 5.0

**B**

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN MONOCITOS, % vs. control (4 h)			
	3TC (10 µM)	FTC (10 µM)	TDF (1 µM)
CD11a	102.8 ± 8.0	99.1 ± 4.2	105.6 ± 4.6
CD11b	87.5 ± 17.7	98.9 ± 19.0	85.0 ± 18.9
CD18	92.0 ± 5.3	99.2 ± 6.1	92.5 ± 5.2
CD49d	102.6 ± 0.4	102.4 ± 3.2	97.8 ± 3.5
CD62L	93.8 ± 10.0	97.4 ± 10.4	96.4 ± 8.6

**C**

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LINFOCITOS, % vs. control (4 h)			
	3TC (10 µM)	FTC (10 µM)	TDF (1 µM)
CD11a	97.4 ± 3.2	92.2 ± 2.4	92.7 ± 2.7
CD11b	99.8 ± 3.0	100.3 ± 0.5	99.9 ± 0.3
CD18	93.3 ± 6.4	109.6 ± 10.8	96.1 ± 3.8
CD49d	100.6 ± 4.2	113.2 ± 8.8	112.0 ± 8.7
CD62L	111.9 ± 4.6	94.7 ± 6.1	93.6 ± 4.9

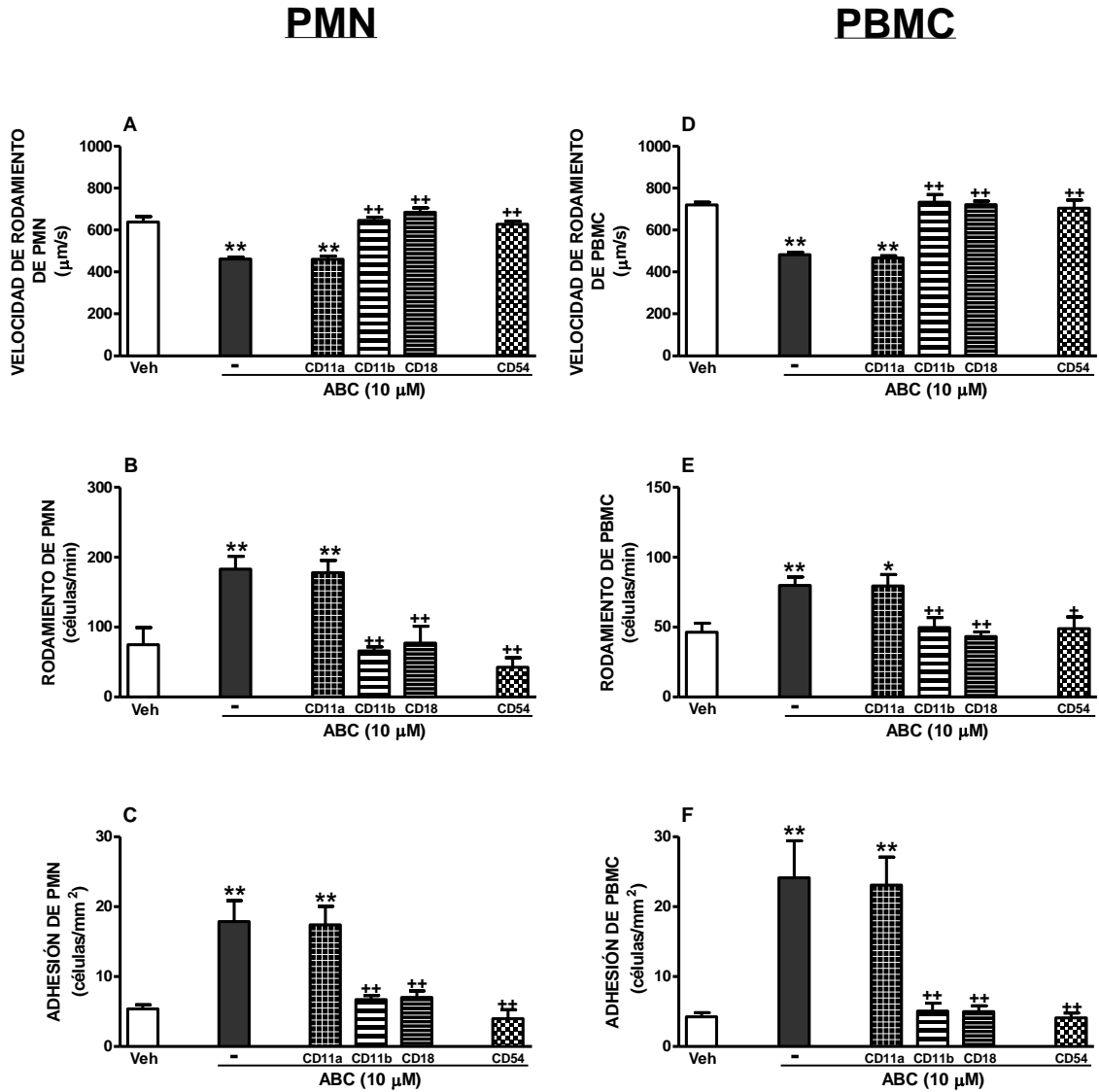
La sangre fue tratada con concentraciones clínicas de lamivudina (3TC, 10 µM), emtricitabina (FTC, 10 µM), tenofovir (TDF, 1 µM) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

### **3. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC Y ddI:**

Mac-1, molécula de adhesión tipo integrina  $\beta_2$ , se caracteriza por poseer una subunidad específica  $\alpha$  (CD11b) y una subunidad común a las integrinas  $\beta_2$  (CD18). Aunque tiene más ligandos, su receptor principal en el endotelio es ICAM-1 (CD54), el cual es expresado de forma constitutiva.

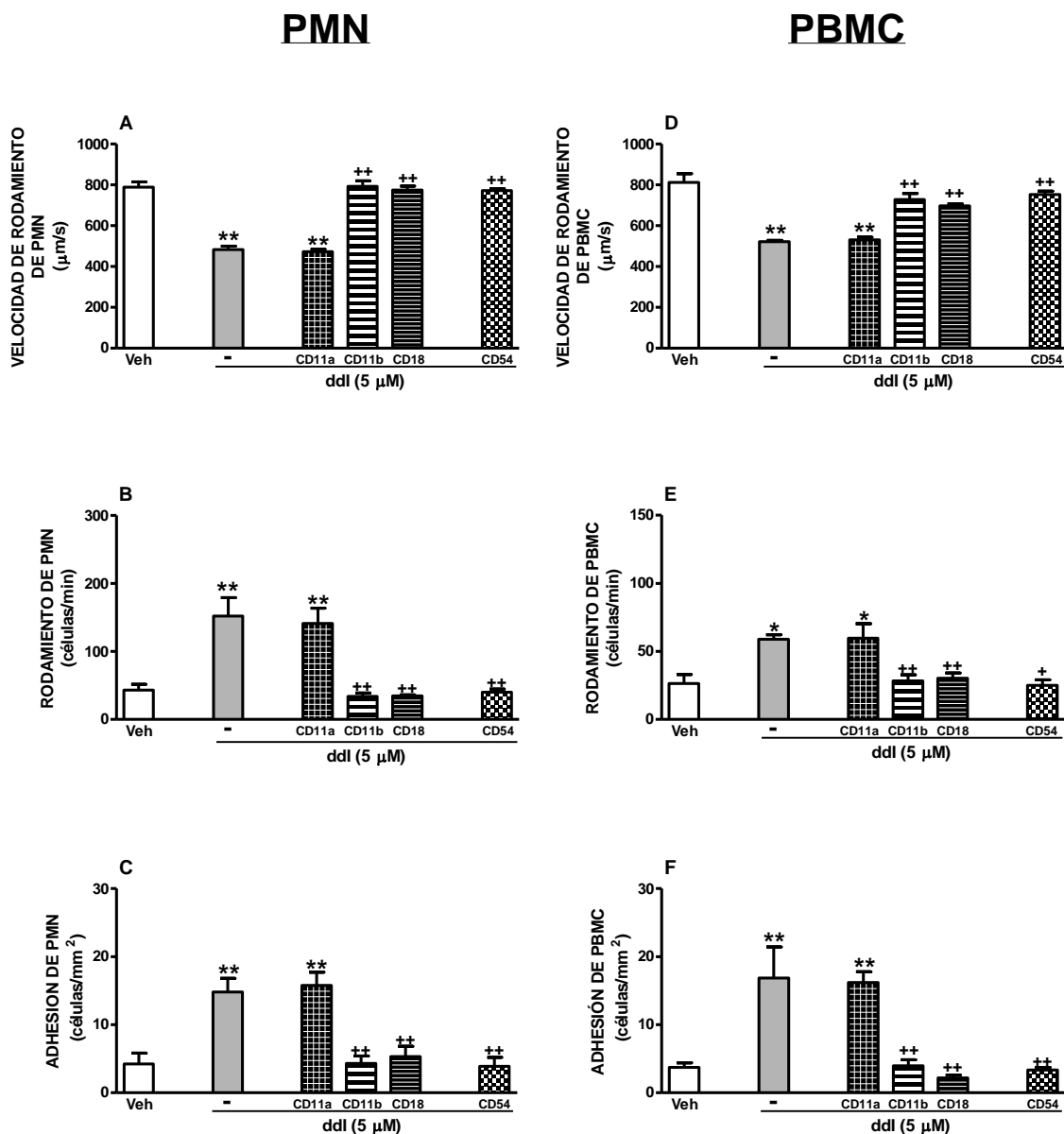
Debido a que se produce un aumento en la expresión de la integrina leucocitaria Mac-1 (CD11b/CD18) inducida tanto por ABC como por ddI y con el fin de determinar su implicación en la interacción leucocito-endotelio inducida por estos fármacos, empleamos la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo, pero en esta ocasión utilizando anticuerpos bloqueantes frente a las moléculas de adhesión leucocitarias LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), integrinas  $\beta_2$  (CD18), así como frente a la molécula de adhesión endotelial ICAM-1 (CD54) por ser el principal ligando de Mac-1.

La interacción leucocito (PMN y PBMC)-endotelio inducida tanto por ABC (Figura 39) como por ddI (Figura 40), fue completamente bloqueada con el pre-tratamiento con anticuerpos frente a CD11b, CD18 o ICAM-1, pero no por el anticuerpo frente a CD11a. Estos resultados indican que la interacción entre Mac-1 (CD11b/CD18) e ICAM-1 es la responsable de la acumulación leucocitaria inducida por estos ITIAN.



**Figura 39.** Efecto del bloqueo de las moléculas de adhesión LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) o ICAM-1 (CD54) sobre la velocidad de rodamiento (A, D), rodamiento (B, E) y adhesión (C, F) de PMN y PBMC respectivamente sobre el endotelio venular inducidos por ABC. PMN y PBMC (anti-CD11a, anti-CD11b o anti-CD18) o HUVEC (anti-CD54) fueron tratados independientemente con los anticuerpos bloqueantes (30 min) y posteriormente con abacavir (ABC, 10  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto al grupo tratado con el vehículo, + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  respecto al grupo tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## V.RESULTADOS



**Figura 40.** Efecto del bloqueo de las moléculas de adhesión LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) o ICAM-1 (CD54) sobre la velocidad de rodamiento (A, D), rodamiento (B, E) y adhesión (C, F) de PMNs y PBMCs respectivamente sobre el endotelio venular inducidos por ddi. PMN y PBMC (anti-CD11a, anti-CD11b o anti-CD18) o HUVEC (anti-CD54) fueron tratados independientemente con los anticuerpos bloqueantes (30 min) y posteriormente con didanosina (ddI, 5 μM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con ddi (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

#### **4. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL PAPEL DEL ENDOTELIO EN ESTA RESPUESTA:**

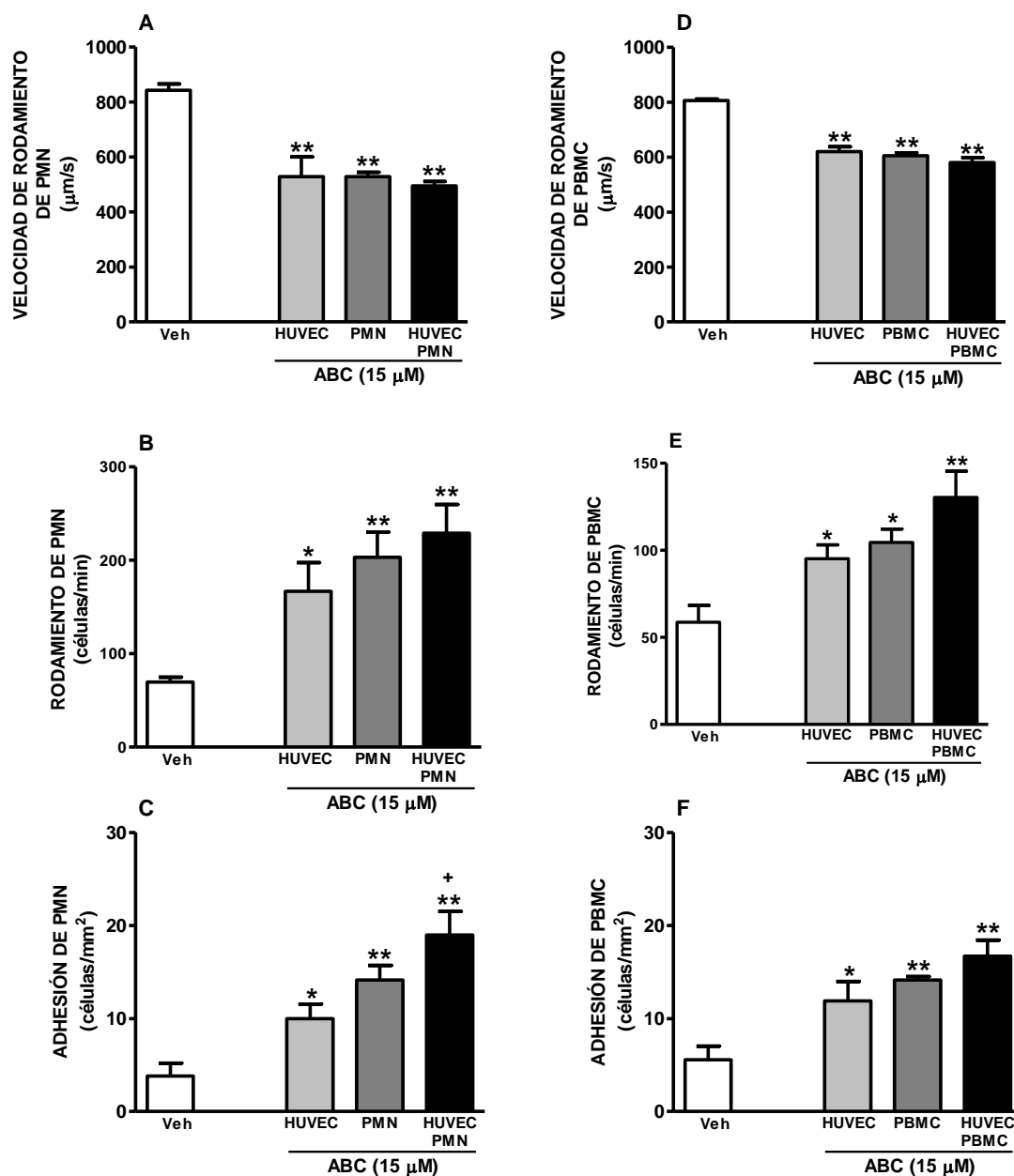
##### **4.1 ANÁLISIS DEL TIPO CELULAR IMPLICADO (ENDOTELIO O LEUCOCITO) EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC:**

Debido a que ABC induce activación leucocitaria pero no endotelial cabría pensar que únicamente los leucocitos están ejerciendo un papel activo en la acumulación leucocitaria inducida por este fármaco. Sin embargo, cuando analizamos el papel de las moléculas de adhesión en este proceso observamos que ICAM-1 constitutiva también está implicada, por lo que quisimos profundizar en el papel de la célula endotelial en esta respuesta. Para ello, incubamos con este fármaco un único tipo celular (o las células endoteliales o los leucocitos) o ambos evaluando así si este ITIAN afecta al endotelio, a los leucocitos o a ambos tipos celulares utilizando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

Tanto en la interacción PMN/HUVEC (Figura 41A, B, C) como PBMC/HUVEC (Figura 41D, E, F), observamos que ABC afecta al endotelio y a los leucocitos. Este ITIAN induce un incremento estadísticamente significativo en los parámetros de rodamiento (Figura 41B, E) y adhesión (Figura 41C, F), así como una reducción significativa en la velocidad de rodamiento (Figura 41A, D) de PMN y PBMC respectivamente, tras el tratamiento únicamente del endotelio, únicamente de los leucocitos o de ambos tipos celulares. Por tanto y aunque ABC parece afectar en mayor medida a los leucocitos, estos resultados

## V.RESULTADOS

indican que el endotelio también estaría implicado en las interacciones leucocito-endotelio inducidas por ABC.



**Figura 41.** Efecto de ABC sobre la velocidad de rodamiento (A, D), el rodamiento (B, E) y la adhesión (C, F) de PMN y PBMC respectivamente tras el tratamiento de un único tipo celular (endotelio o leucocito) o de ambos. HUVEC, PMN y PBMC fueron tratados independientemente con abacavir (ABC, 15 µM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. +p<0.05 respecto del grupo HUVEC tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).



### **4.2 PRODUCCIÓN DE ERO EN CÉLULAS ENDOTELIALES TRAS SU TRATAMIENTO CON ABC O ddI:**

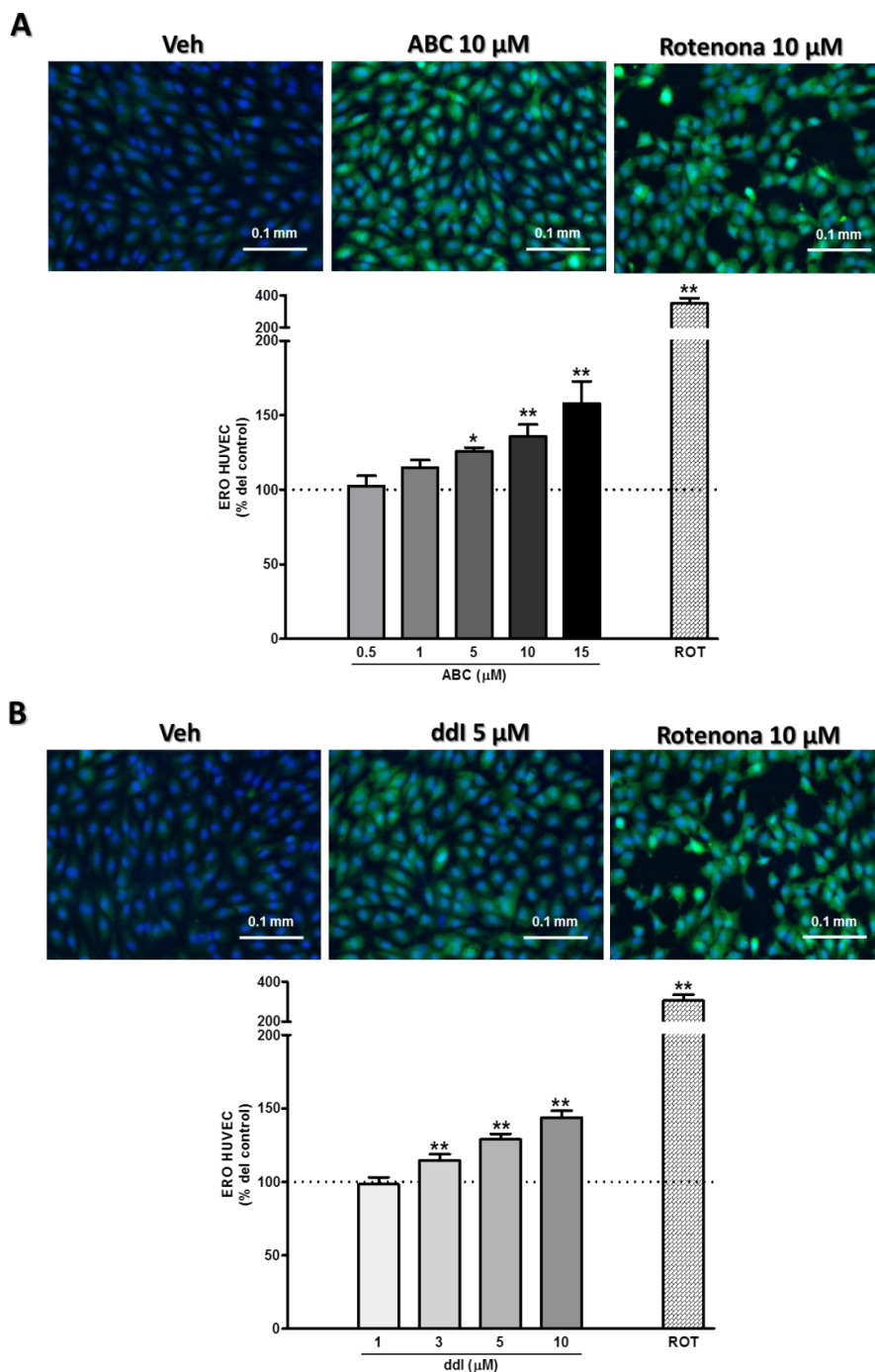
Cuando el endotelio vascular es dañado, se inicia una respuesta inflamatoria endotelial, la cual se caracteriza entre otras muchas reacciones por desencadenar la liberación de distintos mediadores proinflamatorios así como por la producción de ERO.

Como hemos descrito en el apartado anterior, ABC afecta tanto a los leucocitos como al endotelio, por lo que quisimos evaluar si este efecto a nivel endotelial es promovido por la liberación de ERO.

Así, evaluamos la producción de ERO en células endoteliales (HUVEC o HUAEC) tras su tratamiento con ABC y ddI (4 h, 37°C) por citometría estática mediante un microscopio de fluorescencia, utilizando como sonda DCFH-DA.

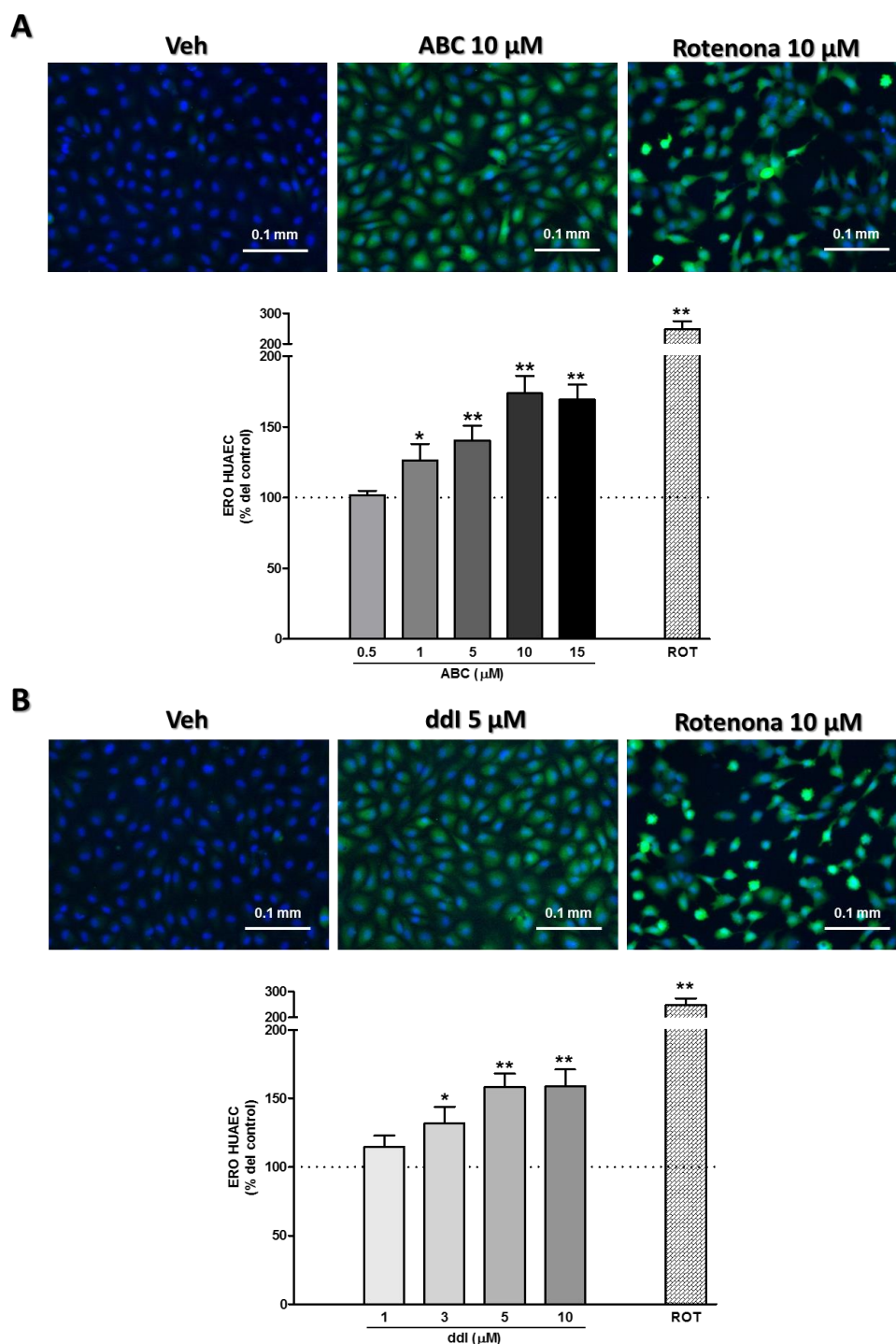
Observamos que la incubación de HUVEC con ABC o ddI produce un aumento significativo y dosis dependiente de la intensidad de fluorescencia, es decir, un aumento del producto resultante de la metabolización de la sonda DCFH-DA, el DCF. Por lo que el tratamiento con ABC (Figura 42A) o con ddI (Figura 42B) promueve la producción de ERO en células de endotelio venular. Resultados similares fueron observados al tratar células de endotelio arterial (HUAEC) con ABC (Figura 43A) o con ddI (Figura 43B).

## HUVEC



**Figura 42. Producción de ERO en HUVEC inducida por ITIAN.** HUVEC fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15  $\mu$ M), didanosina (ddi, 1-10  $\mu$ M), rotenona (ROT, 10  $\mu$ M) o su vehículo (4 h) e incubadas con la sonda DCFH-DA durante los últimos 30 min de tratamiento. La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de la producción de ERO en HUVEC inducida por ABC (A) o ddi (B). Los valores de fluorescencia representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-5). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## HUAEC



**Figura 43. Producción de ERO en HUAEC inducida por ITIAN.** HUAEC fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15  $\mu$ M), didanosina (ddi, 1-10  $\mu$ M), rotenona (ROT, 10  $\mu$ M) o su vehículo (4 h) e incubadas con la sonda DCFH-DA durante los últimos 30 min de tratamiento. La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de la producción de ERO en HUAEC inducida por ABC (A) o ddi (B). Los valores de fluorescencia representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-5). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

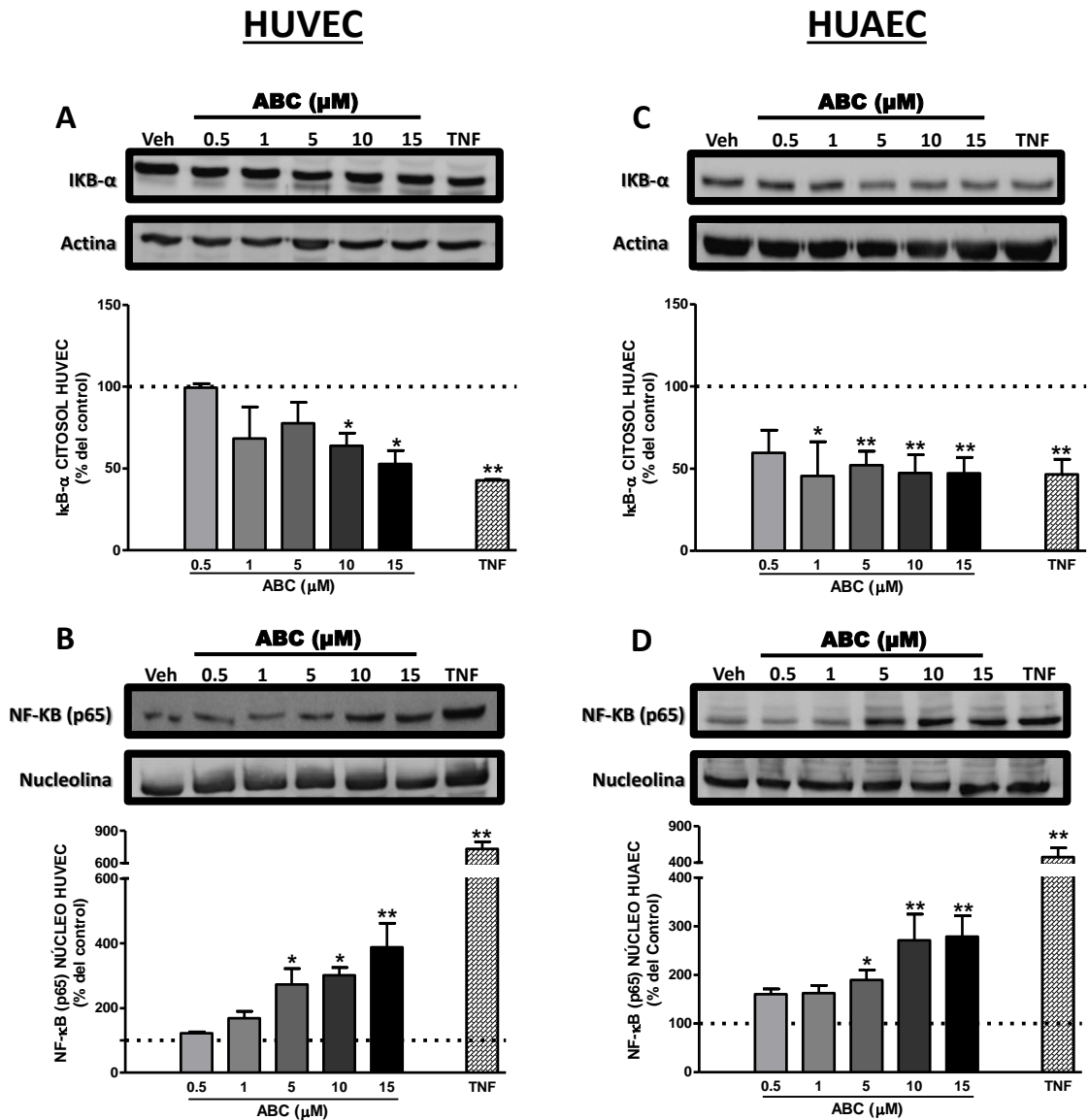
### **4.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ABC SOBRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN I $\kappa$ B- $\alpha$ Y NF- $\kappa$ B EN CÉLULAS ENDOTELIALES:**

En procesos inflamatorios, el aumento en la producción de ERO promueve la translocación de factores de transcripción proinflamatorios al núcleo donde se inicia la transcripción de genes y la subsecuente traducción del mRNA en distintas moléculas de adhesión y/o moléculas proinflamatorias.

NF- $\kappa$ B es uno de los factores de transcripción nuclear presentes en la mayoría de las patologías que cursan con inflamación vascular, por lo que es empleado frecuentemente como marcador o indicador del proceso inflamatorio. Por lo tanto, bajo condiciones proinflamatorias se produce la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, así como la desaparición en el citosol de su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ , el cual es fosforilado y degradado para permitir la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo.

Debido al hecho de que ABC promueve la producción de ERO en el endotelio vascular, evaluamos si este ITIAN favorece la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, así como la desaparición en el citosol de su inhibidor, I $\kappa$ B- $\alpha$  mediante western blot.

ABC produjo una reducción significativa y concentración dependiente de I $\kappa$ B- $\alpha$  en el citosol (Figura 44A, C), así como un incremento significativo de NF- $\kappa$ B en el núcleo (Figura 44B, D) en HUVEC y HUAEC respectivamente.



**Figura 44.** Efecto de ABC sobre los niveles de proteína IκB-α en el citosol (A, C) y NF-κB en el núcleo (B, D) en HUVEC y HUAEC respectivamente. HUVEC y HUAEC fueron tratados con abacavir (ABC, 0.5-15 μM), TNF-α (25 ng/mL) o con su vehículo (4 h). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de IκB-α citosólico y NF-κB nuclear en HUVEC y HUAEC tras su tratamiento con ABC. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

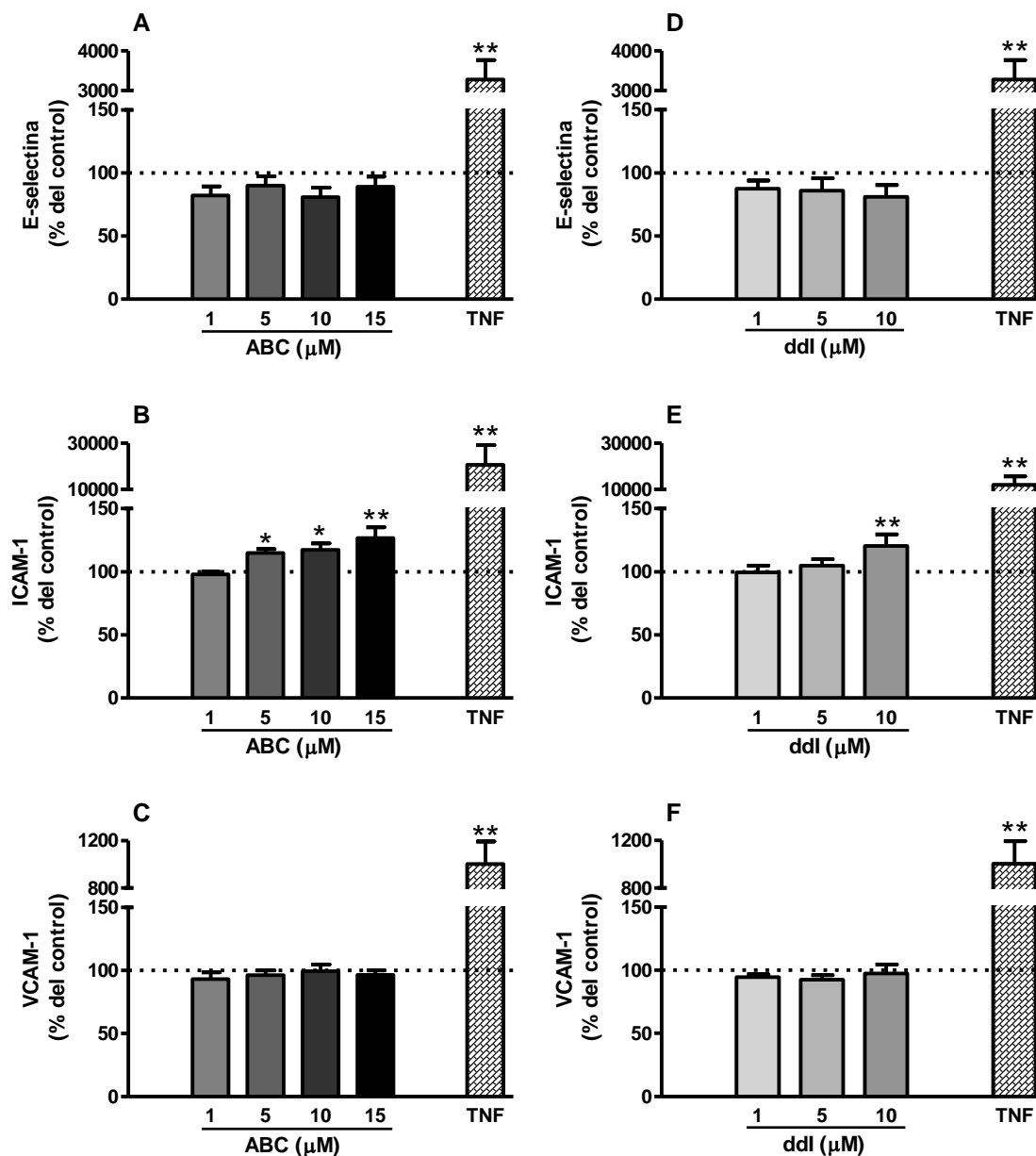
### **4.4 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES TRAS SU TRATAMIENTO CON ABC O ddI A TIEMPOS MÁS LARGOS:**

Tras observar que el endotelio participa de forma activa en la acumulación leucocitaria inducida por ABC y que tras su tratamiento con este ITIAN aumentó la liberación de ERO y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo tanto en HUVEC como en HUAEC, nos planteamos estudiar de nuevo la expresión de moléculas de adhesión endoteliales pero con tratamientos más prolongados (24 h, 37°C).

Para ello, analizamos el efecto de ABC o ddI sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión endoteliales: E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 a 24 h mediante citometría de flujo.

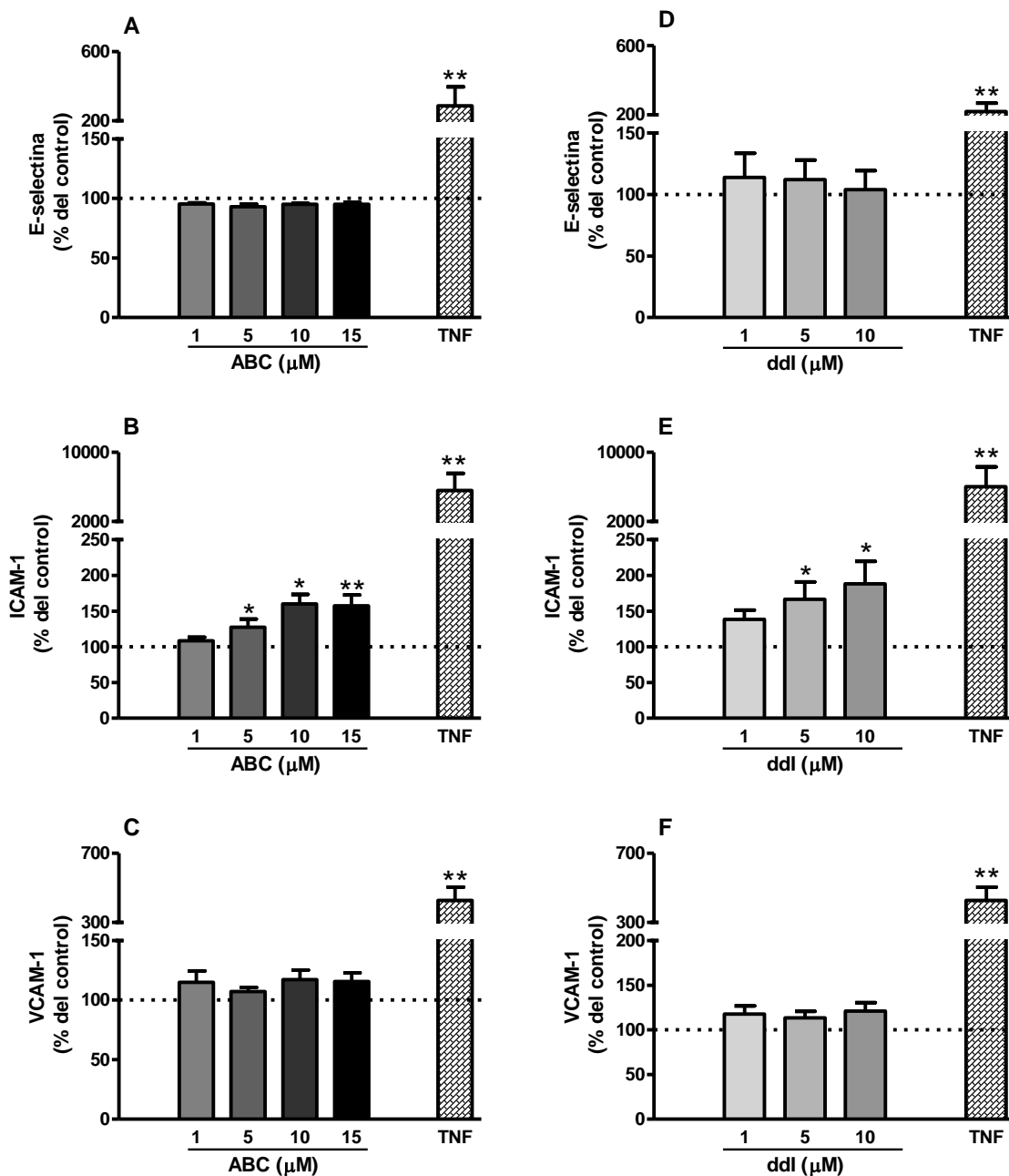
Con este tratamiento más prolongado, se observó un aumento de la expresión de ICAM-1 con ambos ITIAN en HUVEC (Figura 45) y en HUAEC (Figura 46).

## HUVEC



**Figura 45.** Efecto de ABC y ddi a 24 h sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina (A, D), ICAM-1 (B, E) y VCAM-1 (C, F) en células endoteliales procedentes de vena (HUVEC). HUVEC fueron tratadas con dosis crecientes de abacavir (ABC, 1-15 μM), didanosina (ddi, 3-10 μM), TNF-α (25 ng/mL) o con su vehículo (24 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## HUAEC



**Figura 46.** Efecto de ABC y ddi a 24 h sobre la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina (A, D), ICAM-1 (B, E) y VCAM-1 (C, F) en células endoteliales procedentes de arteria (HUAEC). HUAEC fueron tratadas con dosis crecientes de abacavir (ABC, 1-15 μM), didanosina (ddi, 3-10 μM), TNF-α (25 ng/mL) o con su vehículo (24 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).



**5. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA RUTA DEL ATP EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC Y ddi:**

ABC y ddi son los únicos ITIAN evaluados que promueven la interacción leucocito-endotelio. Ambos fármacos poseen una estructura química común: son análogos de bases púricas, ABC de guanina y ddi de adenina. Sin embargo, el resto de los ITIAN evaluados son análogos de bases pirimidínicas o análogos de nucleótidos y no inducen acumulación leucocitaria.

Debido a la analogía estructural de ABC y ddi pensamos que podría existir una relación entre la estructura de estos compuestos y su actividad y por ello consideramos que podrían estar afectando a la ruta de señalización de las purinas. Así ATP y ADP se transforman en adenosina mediante las enzimas E-NTPDasa (CD39) y ecto-5'-nucleotidasa (CD73). La adenosina tiene efectos protectores sobre inflamación vascular (prevención de la formación de coágulos y la oclusión del vaso) mientras que ATP y ADP son moléculas proinflamatorias que promueven vías protrombóticas. Por tanto, el tratamiento con ABC o ddi podría afectar a estas enzimas aumentando los niveles de ATP y ADP y disminuyendo los de adenosina.

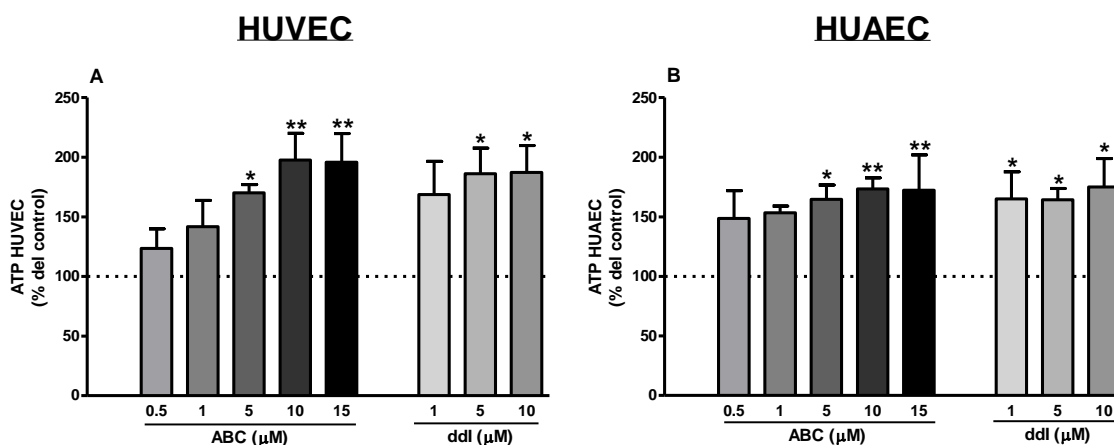
Por ello, cuantificamos los niveles de ATP intracelular empleando un ensayo de bioluminiscencia y los niveles de las proteínas CD73 y CD39 mediante western blot.

## V.RESULTADOS

### 5.1 CUANTIFICACIÓN DE ATP INTRACELULAR:

#### 5.1.1 Células endoteliales:

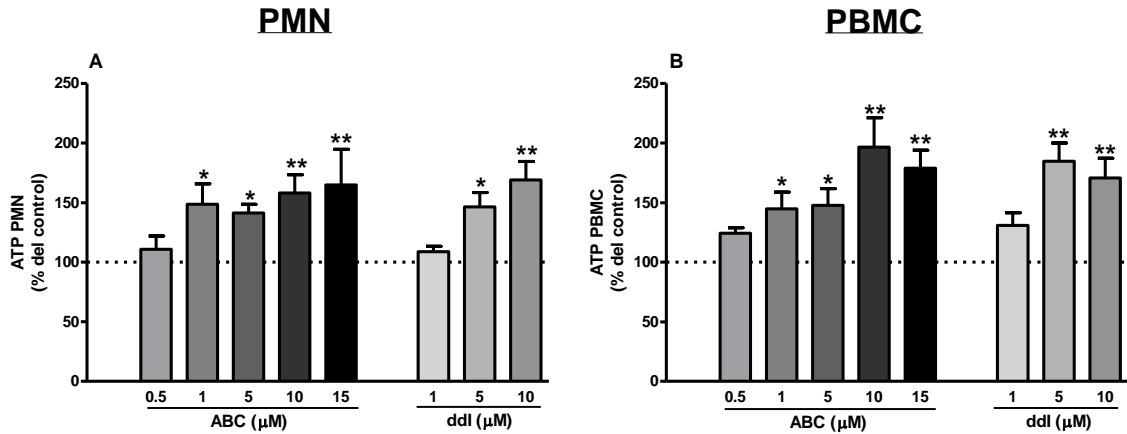
El tratamiento de HUVEC o HUAEC tanto con ABC como con ddi (4 h, 37°C) produjo un incremento significativo y dosis dependiente de los niveles de ATP intracelulares (Figura 47).



**Figura 47.** Efecto de ABC y ddi sobre los niveles de ATP intracelular en células endoteliales. HUVEC (A) o HUAEC (B) fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15 µM), didanosina (ddi, 1-10 µM) o su vehículo (4 h). Los valores representan el porcentaje de la intensidad de bioluminiscencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 5). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

#### 5.1.2 Leucocitos:

La incubación de leucocitos (PMN y PBMC) con ABC o ddi (4 h, 37°C) produjo un incremento significativo y dosis dependiente de los niveles de ATP intracelulares (Figura 48).

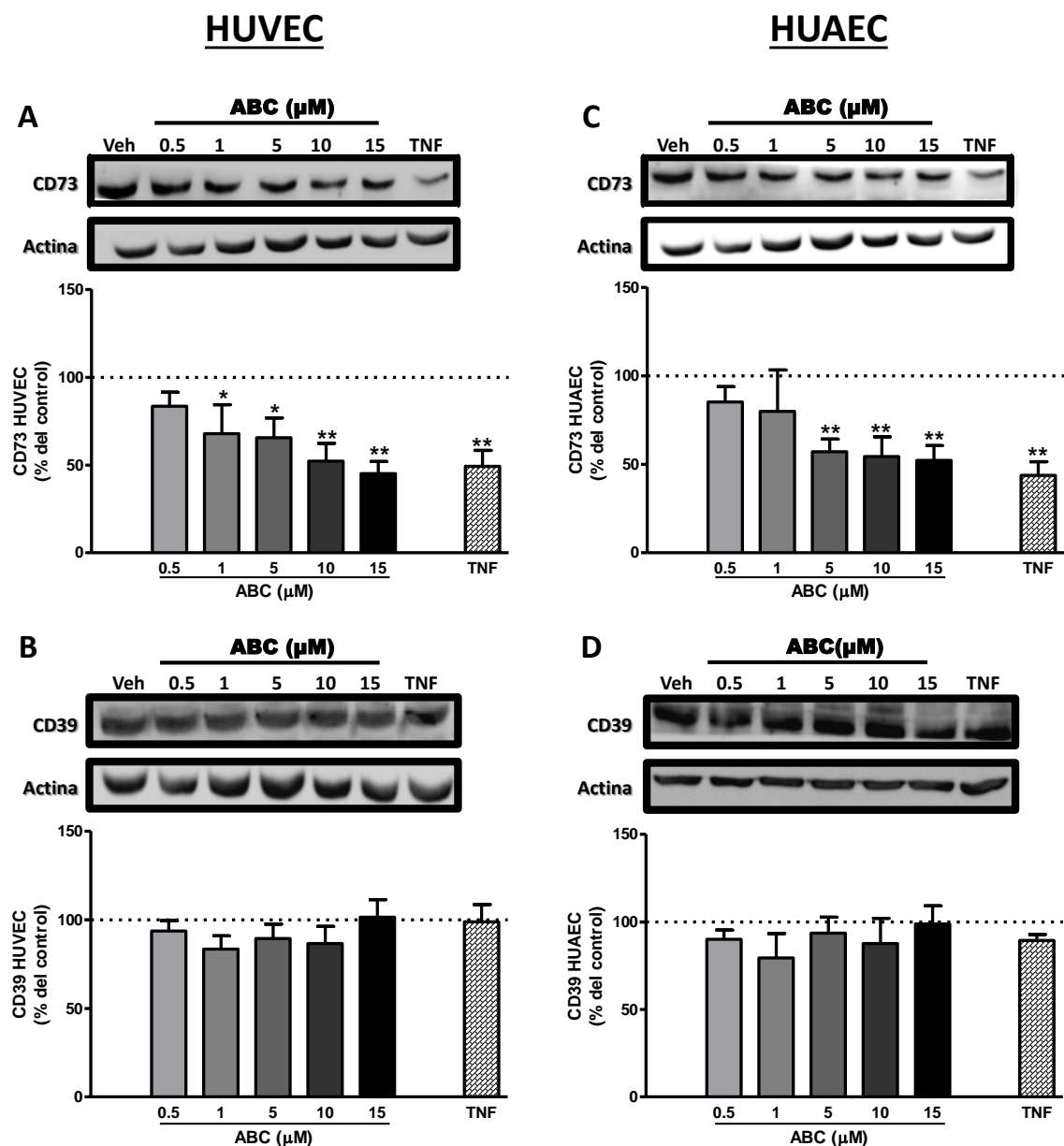


**Figura 48.** Efecto de ABC y ddi sobre los niveles intracelulares de ATP en PMN (A) o PBMC (B). PMN o PBMC fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15 μM), didanosina (ddi, 1-10 μM) o su vehículo (4 h). Los valores representan el porcentaje de la intensidad de bioluminiscencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 5). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## 5.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS CD73 Y CD39:

### 5.2.1 Células endoteliales:

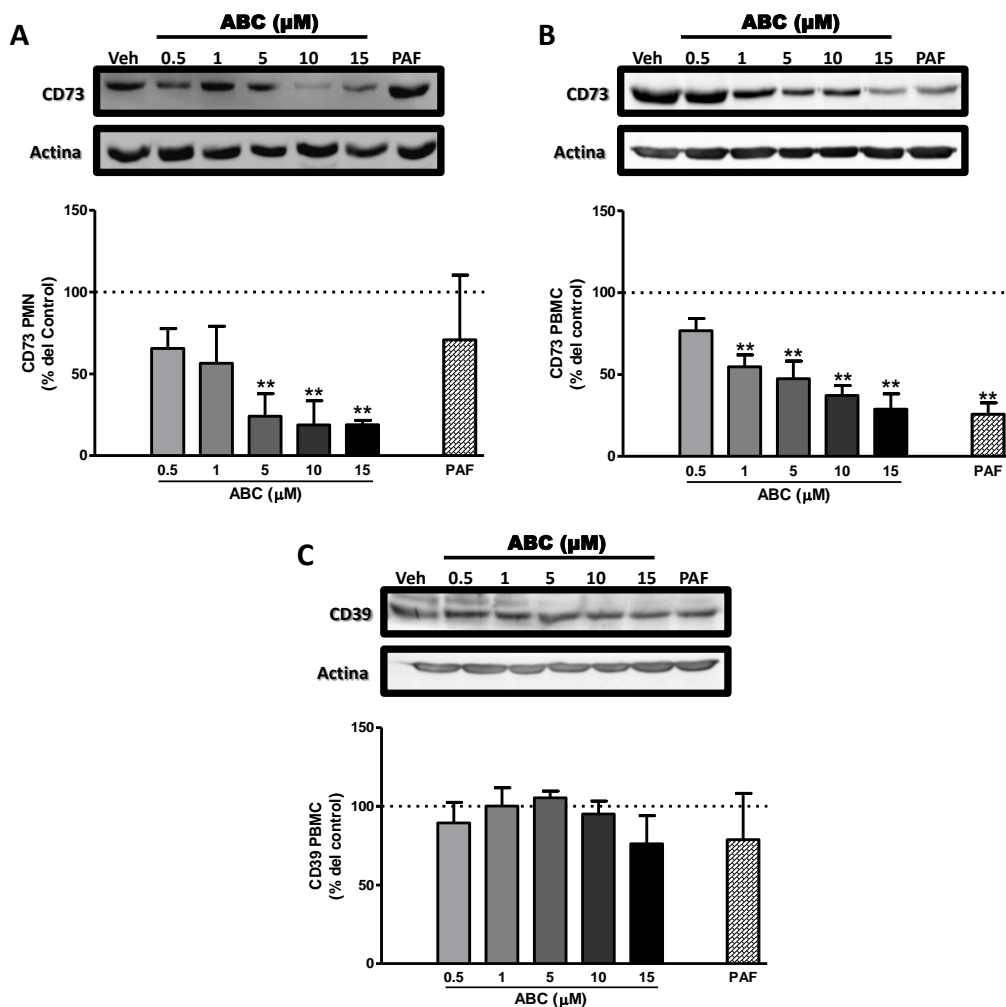
El tratamiento de ambos tipos de células endoteliales con ABC, produjo una reducción significativa y dosis dependiente de la expresión de la enzima CD73 en HUVEC (Figura 49A) y en HUAEC (Figura 49C). Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de CD39 en ninguno de los dos tipos de endotelio (Figura 49B, D).



**Figura 49. Efecto de ABC sobre los niveles de proteínas CD73 y CD39 en células endoteliales.** HUVEC o HUAEC fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15 μM), TNF-α (25 ng/mL) o su vehículo (4 h). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de proteínas CD73 (A, C) y CD39 (B, D) en HUVEC o HUAEC respectivamente tras su tratamiento con ABC. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 5-6). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

5.2.2 **Leucocitos:**

Al igual que en el endotelio, observamos que ABC indujo una reducción significativa y dosis dependiente de la expresión de la enzima CD73 en PMN (Figura 50A) y PBMC (Figura 50B). Con respecto a CD39, esta proteína no fue detectada en PMN, mientras que en PBMC no observamos variaciones en su expresión (Figura 50C).



**Figura 50. Efecto de ABC sobre los niveles de proteínas CD73 y CD39 en leucocitos.** PMN o PBMC fueron tratadas con abacavir (ABC, 0.5-15  $\mu$ M), su vehículo (4 h) o con PAF (10  $\mu$ M, 1 h). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de proteínas CD73 (A, B) en PMN o PBMC respectivamente y CD39 (C) en PBMC tras su tratamiento con ABC. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

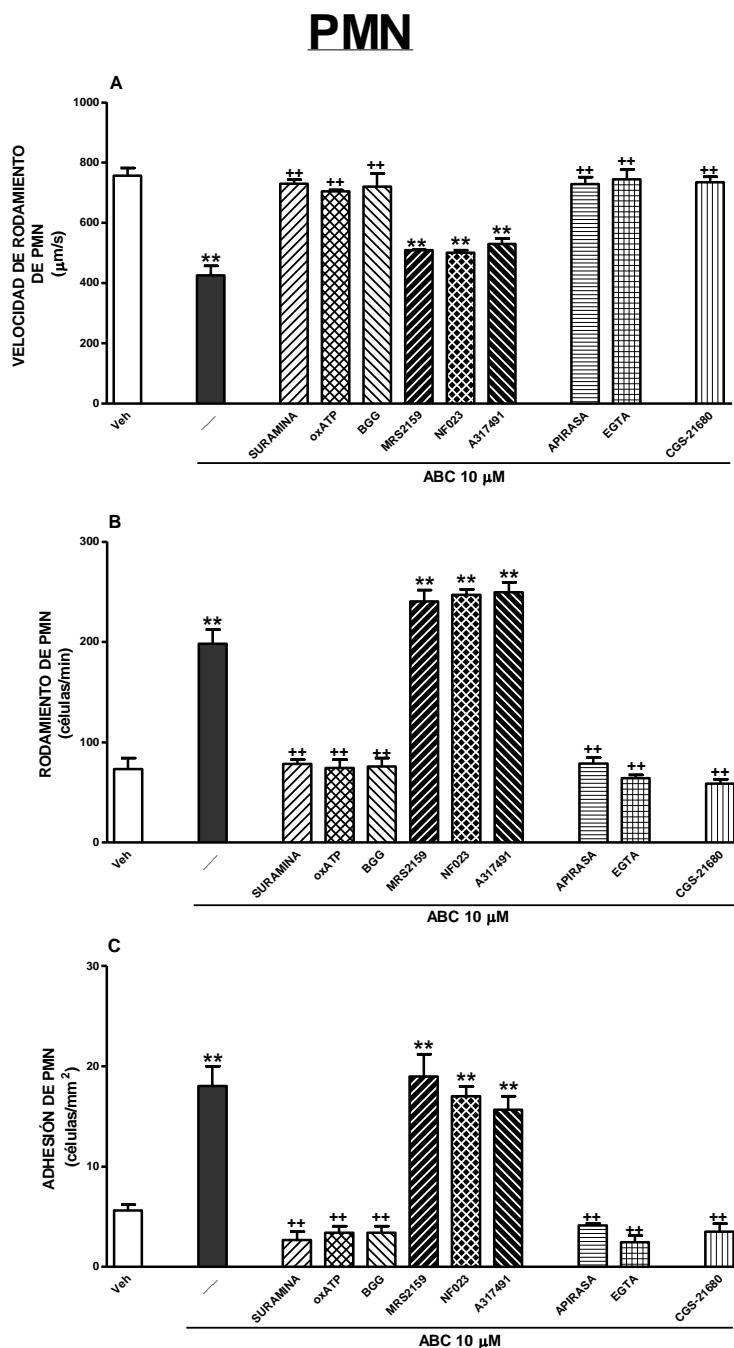
### **5.3 ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL ATP Y SUS RECEPTORES EN LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC:**

ABC, tanto en endotelio como en leucocitos, induce un aumento de los niveles de ATP intracelulares y reduce la expresión de la proteína CD73, enzima implicada en la ruta de degradación del ATP.

Debido a estos resultados nos planteamos evaluar la implicación funcional del ATP y de sus receptores en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo y pre-tratando tanto las células endoteliales como los leucocitos con diferentes antagonistas de los receptores de ATP, con un fármaco que hidroliza el ATP, con un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  o con un agonista de los receptores de adenosina.

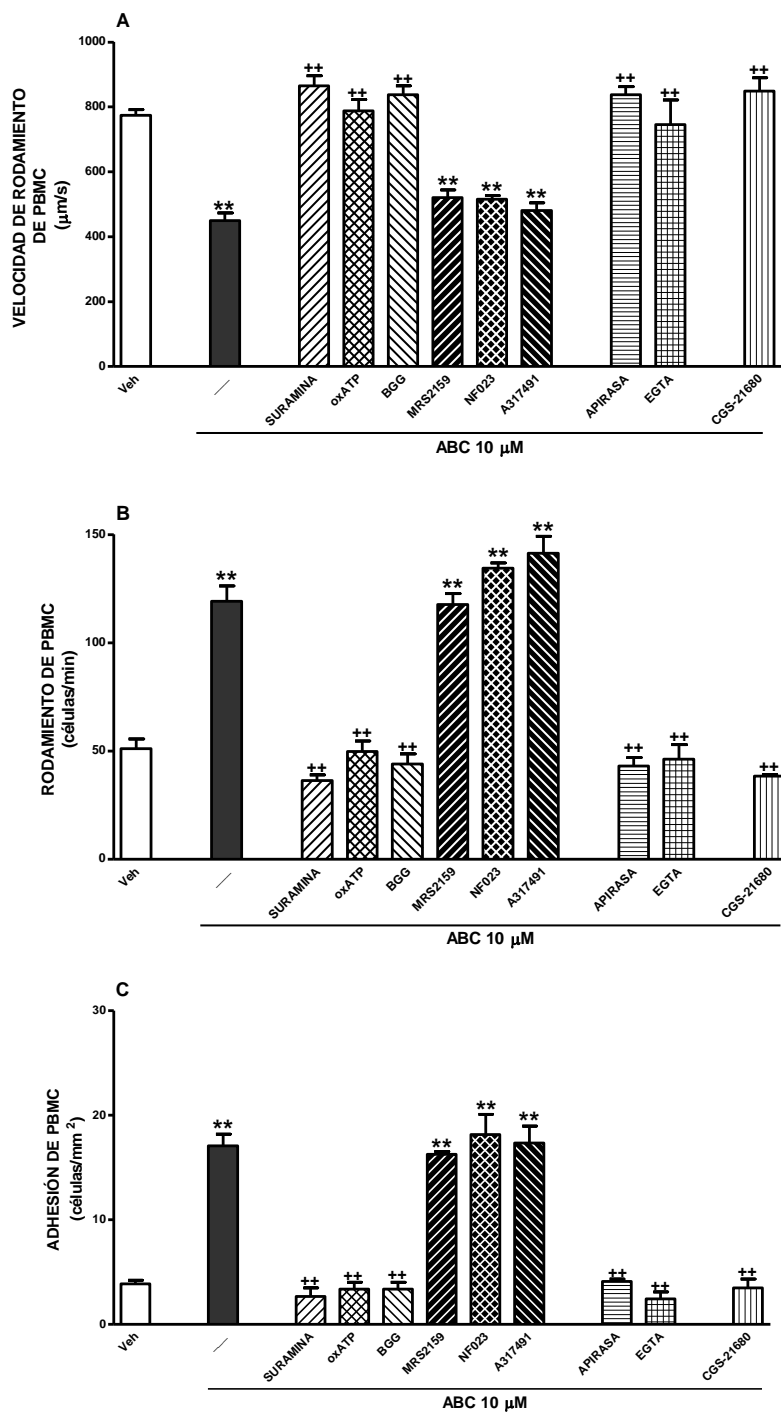
La interacción leucocito–endotelio inducida por ABC fue completamente abolida cuando pre-tratamos ambos tipos celulares con un antagonista no selectivo de los receptores de ATP (suramina), con diferentes antagonistas del receptor de ATP  $\text{P2X}_7$  (oxATP y BGG), con un compuesto que hidroliza el ATP (apirasa), con un quelante del  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA) o con un agonista de los receptores de adenosina  $\text{A}_{2A}$  (CGS-21680) tanto en PMN (Figura 51) como en PBMC (Figura 52). Sin embargo, no observamos ninguna modificación cuando adicionamos antagonistas de otros receptores de ATP diferentes del  $\text{P2X}_7$ : antagonista del receptor de ATP  $\text{P2X}_1$  (MRS2159), antagonista de los receptores  $\text{P2X}_{1-4}$  (NF023) o antagonista de los receptores de  $\text{P2X}_3$  y  $\text{P2X}_{2/3}$  (A317491).

Estos resultados demuestran el papel clave que ejerce el ATP a través de sus receptores P2X<sub>7</sub> en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC.



**Figura 51.** Efecto del bloqueo de distintos receptores y pasos de la ruta de degradación del ATP sobre la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de PMN inducida por ABC. HUVEC y PMN fueron tratados independientemente con oxATP, BGG, MRS2159, NF023, A317491, apirasa o EGTA (30 min) o con suramina o CGS-21680 (1 h) previo al tratamiento con abacavir (ABC, 10 μM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 3). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## PBMC



**Figura 52.** Efecto del bloqueo de distintos receptores y pasos de la ruta de degradación del ATP sobre la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de PBMC inducida por ABC. HUVEC y PBMC fueron tratados independientemente con oxATP, BGG, MRS2159, NF023, A317491, apirasa o EGTA (30 min) o con suramina o CGS-21680 (1 h) previo al tratamiento con abacavir (ABC, 10 μM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 3). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).



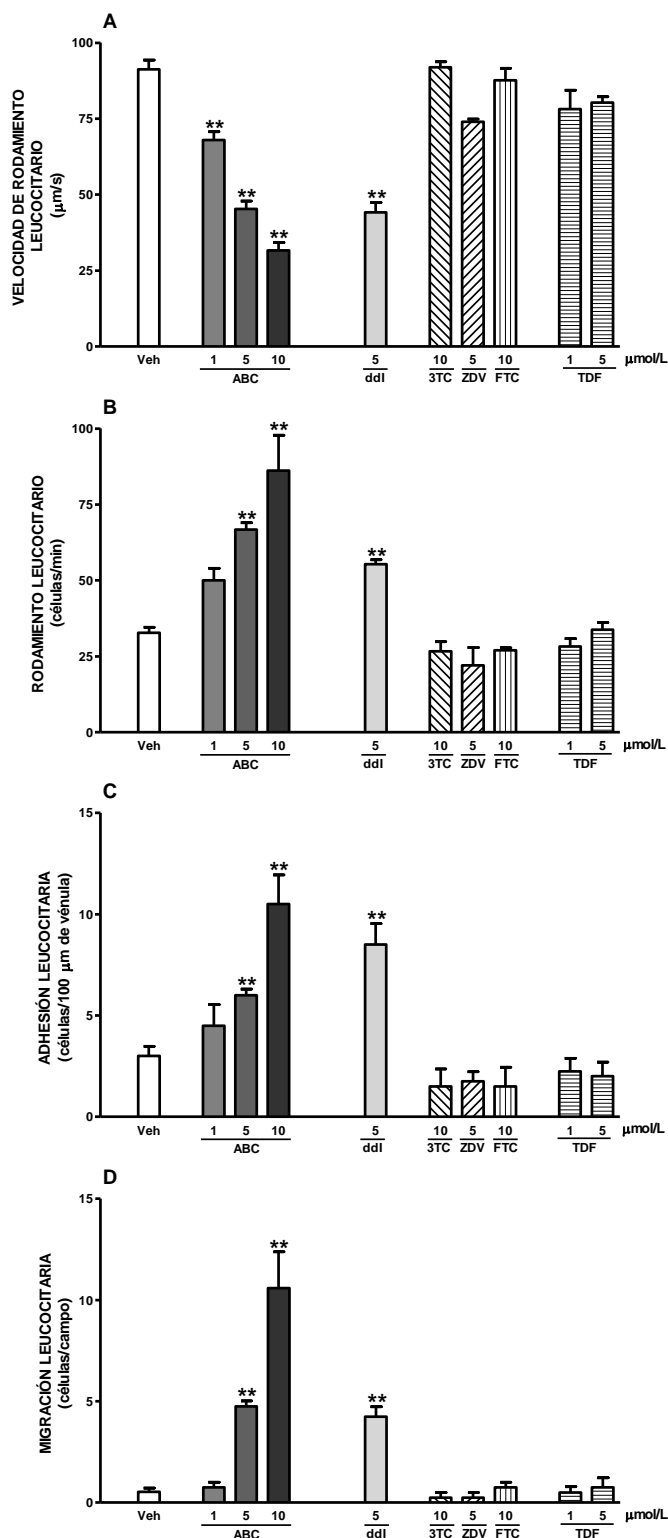
## **BLOQUE II: ESTUDIOS IN VIVO**

### **1. ESTUDIO DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO:**

Con el fin de darle mayor relevancia fisiológica a nuestros resultados, evaluamos el efecto de ABC, ddI, 3TC, ZDV, FTC y TDF sobre la interacción leucocito-endotelio en un modelo animal *in vivo* empleando la técnica de microscopía intravital en mesenterio de rata.

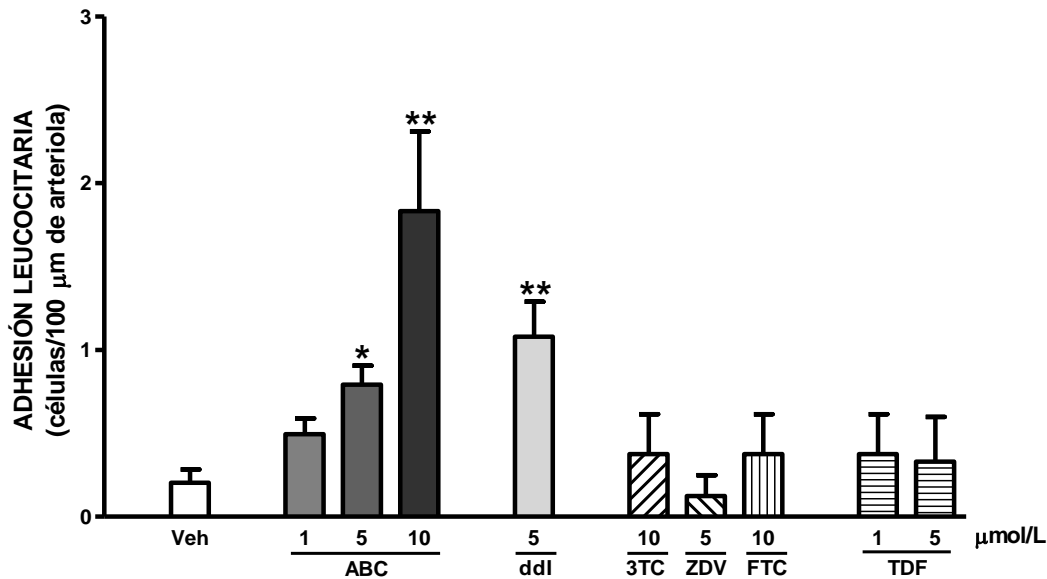
En vénulas, ABC produjo un incremento significativo y dosis dependiente en los parámetros de rodamiento (Figura 53B), adhesión (Figura 53C) y migración (Figura 53D) leucocitarios así como una reducción de la velocidad de rodamiento leucocitaria (Figura 53A). Con respecto al resto de ITIAN evaluados, únicamente en el caso de ddI observamos resultados similares a los obtenidos en ratas tratadas con ABC (Figura 53). Sin embargo, los tratamientos con 3TC, ZDV, FTC y TDF no produjeron modificaciones en ninguno de los parámetros leucocitarios evaluados (Figura 53).

## V.RESULTADOS



**Figura 53.** Efecto de diferentes ITIAN sobre la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B), la adhesión (C) y la migración (D) leucocitarios en vénulas mesentéricas. Las ratas fueron tratadas intraperitonealmente con abacavir (ABC, 1-10  $\mu\text{M}$ ), didanosina (ddl, 5  $\mu\text{M}$ ), lamivudina (3TC, 10  $\mu\text{M}$ ), zidovudina (ZDV, 5  $\mu\text{M}$ ), emtricitabina (FTC, 10  $\mu\text{M}$ ), tenofovir (TDF, 1-5  $\mu\text{M}$ ) o con vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Además, ABC y ddI, pero no 3TC, ZDV, FTC o TDF produjeron un incremento significativo de la adhesión arteriolar (Figura 54).



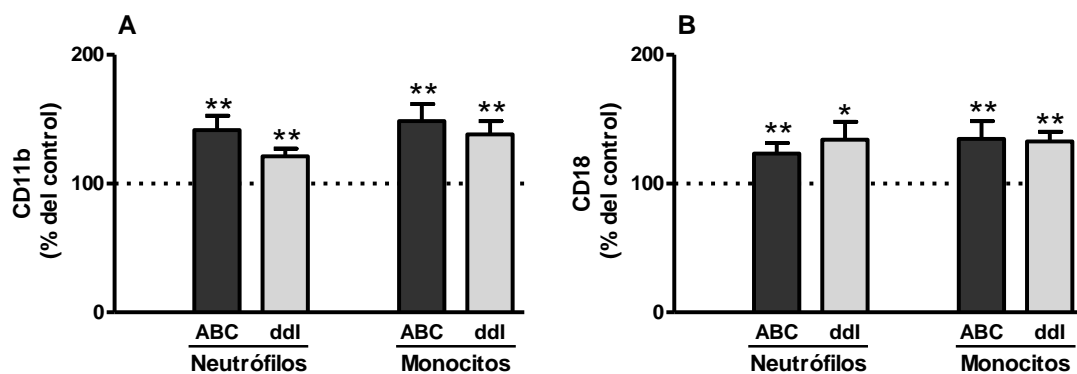
**Figura 54. Efecto de diferentes ITIAN sobre la adhesión leucocitaria en arteriolas mesentéricas.** Las ratas fueron tratadas intraperitonealmente con abacavir (ABC, 1-10 μM), didanosina (ddI, 5 μM), lamivudina (3TC, 10 μM), zidovudina (ZDV, 5 μM), emtricitabina (FTC, 10 μM), tenofovir (TDF, 1-5 μM) o con su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4-6). \*\*p<0.01 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## **2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS ITIAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS EN SANGRE DE RATA:**

Analizamos el efecto de dosis clínicas de ABC y ddI sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión leucocitarias: LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), integrinas β<sub>2</sub> (CD18), VLA-4 (CD49d) y L-selectina (CD62L) en sangre de rata (obtenida tras la realización de los experimentos de microscopía intravital) por citometría de flujo.

## V.RESULTADOS

ABC y ddI (4 h, 37°C) indujeron un incremento significativo de la expresión de la subunidad específica CD11b en neutrófilos y en monocitos (Figura 55A), así como de la subunidad común CD18 en neutrófilos y en monocitos (Figura 55B).



**Figura 55. Efecto de ABC o ddI sobre la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias CD11b (A) y CD18 (B) en neutrófilos y monocitos.** Las ratas fueron tratadas intraperitonealmente con abacavir (ABC, 10  $\mu$ M), didanosina (ddI, 5  $\mu$ M) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n= 8-10). \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Sin embargo, ABC y ddI no tuvieron efectos sobre las subunidades CD11a, CD49d o CD62L en neutrófilos ni en monocitos a ninguna de las dosis evaluadas (Tabla 13). Tampoco se observaron cambios en la expresión de las moléculas de adhesión evaluadas a nivel de la población linfocitaria (datos no mostrados).

**Tabla 13.** Efecto de ABC y ddi sobre la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias en neutrófilos y monocitos de rata.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LEUCOCITOS, % vs. control (4 h)				
	ABC (10 µM)		ddi (5 µM)	
	Neutrófilos	Monocitos	Neutrófilos	Monocitos
<b>CD11a</b>	105.3 ± 6.7	99.1 ± 5.3	94.2 ± 8.5	104.3 ± 9.5
<b>CD49d</b>	90.3 ± 5.7	95.6 ± 4.3	104.4 ± 6.6	98.5 ± 11.7
<b>CD62L</b>	92.6 ± 10.1	92.6 ± 10.5	102.8 ± 10.4	103.6 ± 4.2

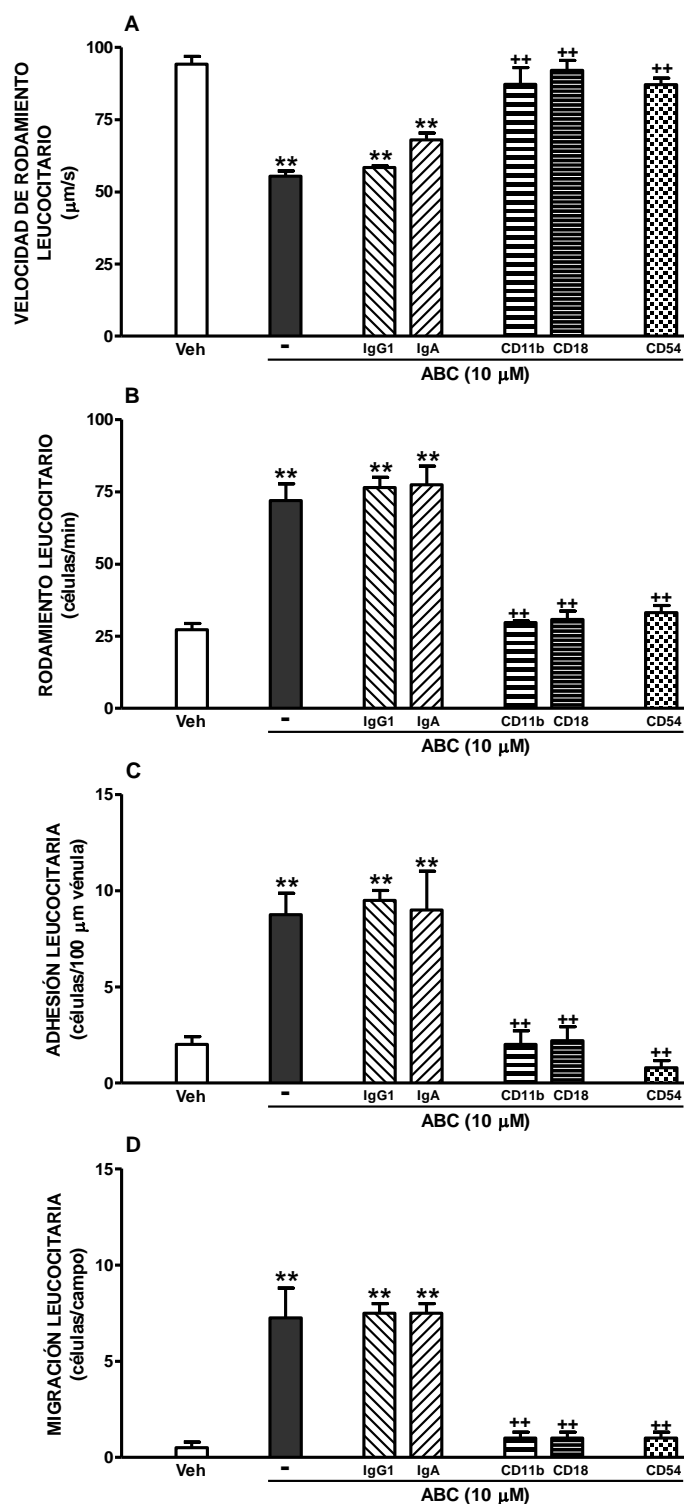
Las ratas fueron tratadas intraperitonealmente con abacavir (ABC, 10 µM), didanosina (ddi, 5 µM) o con su vehículo (4 h). Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto del control (100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n= 8-10). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

### **3. ESTUDIO DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO INDUCIDA POR ABC O ddi *IN VIVO*.**

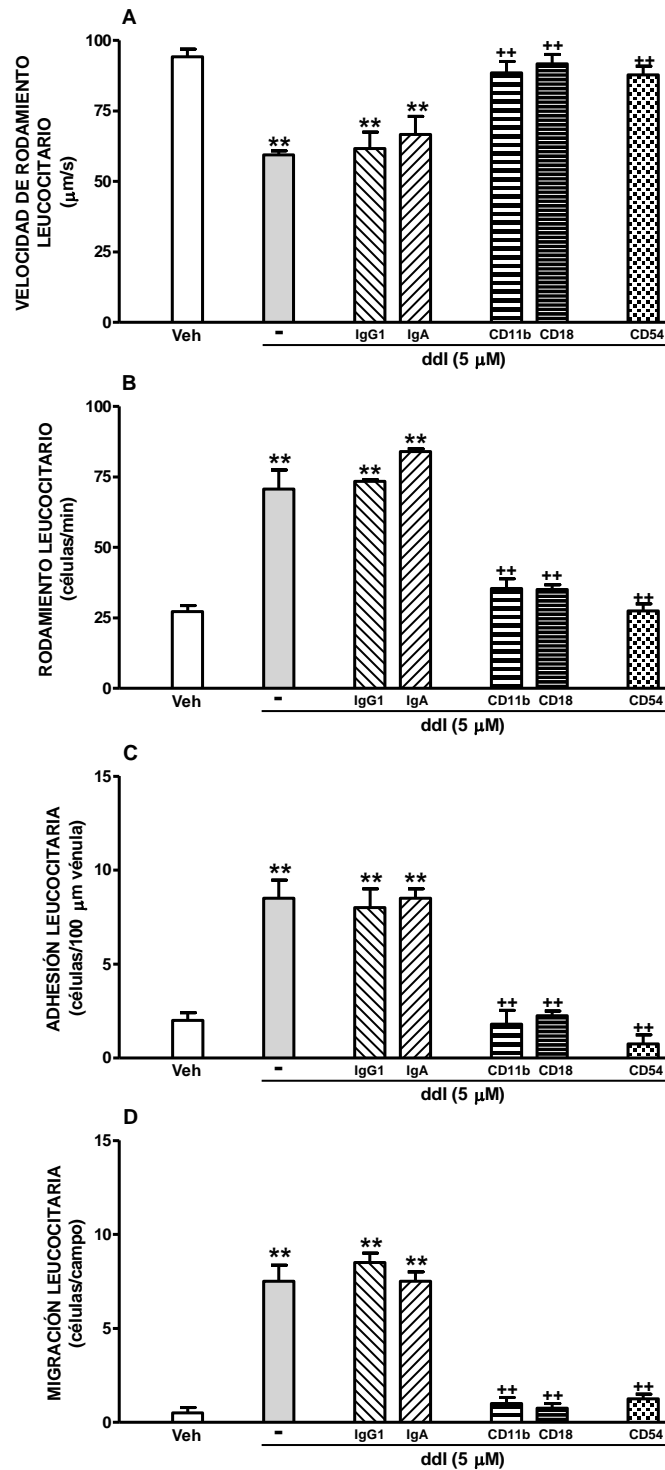
Con el fin de demostrar la implicación de las moléculas Mac-1 e ICAM-1 en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC o por ddi *in vivo*, empleamos la técnica de microscopía intravital en mesenterio de rata adicionando anticuerpos bloqueantes frente a estas moléculas de adhesión previamente al tratamiento con estos ITIAN.

En vénulas, la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC (Figura 56) o por ddi (Figura 57) fue completamente bloqueada mediante anticuerpos frente a CD11b, CD18 o ICAM-1.

## V.RESULTADOS



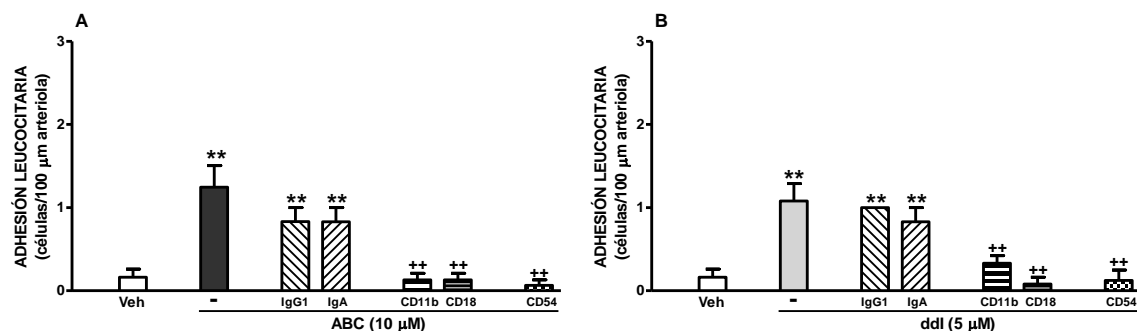
**Figura 56. Efecto del bloqueo de Mac-1 (CD11b/CD18) o ICAM-1 (CD54) sobre la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B), adhesión (C) y migración (D) leucocitaria inducida por ABC en vénulas de rata.** Las ratas fueron pre-tratadas por vía intravenosa con los anticuerpos bloqueantes (anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD54, anti-IgG1 o anti-IgA) (30 min) y posteriormente por vía intraperitoneal con abacavir (ABC, 10  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 4). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo, ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).



**Figura 57.** Efecto del bloqueo de Mac-1 (CD11b/CD18) o ICAM-1 (CD54) sobre la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B), adhesión (C) y migración (D) leucocitaria inducida por ddi en vénulas de rata. Las ratas fueron pre-tratadas por vía intravenosa con los anticuerpos bloqueantes (anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD54, anti-IgG1 o anti-IgA) (30 min) y posteriormente por vía intraperitoneal con didanosina (ddl, 5 μM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo, ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

## V.RESULTADOS

Resultados similares fueron obtenidos en arteriolas, así la adhesión a nivel arteriolar inducida por ABC o ddi también fue bloqueada totalmente con el pre-tratamiento con anticuerpos frente a CD11b, CD18 o ICAM-1 (Figura 58).



**Figura 58.** Efecto del bloqueo de Mac-1 (CD11b/CD8) o ICAM-1 (CD54) sobre la adhesión arteriolar en ratas tratadas con ABC (A) o ddi (B). Las ratas fueron pre-tratadas por vía intravenosa con los anticuerpos bloqueantes (anti-CD11b, anti-CD18, anti-CD54, anti-IgG1 o anti-IgA) (30 min) y posteriormente por vía intraperitoneal con abacavir (ABC, 10 μM), didanosina (ddi, 5 μM) o su vehículo (4 h). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 4). \*\*p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo, ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC o ddi (ANOVA seguido de Newman-Keuls como post-test).

Estos resultados permiten concluir que la interacción entre Mac-1 e ICAM-1 es la responsable de la acumulación leucocitaria producida por ABC o ddi en vénulas y en arteriolas *in vivo*.



## **VI.DISCUSIÓN**



ABC es uno de los fármacos más empleados dentro del grupo de los ITIAN y de la terapia antirretroviral en general. Actualmente existe una creciente evidencia que correlaciona el uso de los ITIAN análogos de purina, y más concretamente ABC, con la aparición de efectos adversos cardiovasculares <sup>65-69</sup>. Sin embargo, desde que se detectó por primera vez esta posible correlación <sup>63</sup> ha habido mucha controversia sobre el tema <sup>64-73</sup>. Debido a la disparidad de datos, al frecuente uso de este fármaco en la terapéutica actual <sup>32</sup> y al hecho de que a día de hoy no haya ninguna evidencia clara sobre cuál podría ser el mecanismo por el que produciría esta toxicidad cardiovascular, nos planteamos ahondar y esclarecer esta posible asociación.

El presente estudio demuestra por primera vez la capacidad que poseen ABC y ddi (ambos ITIAN análogos de purina) de inducir la interacción leucocito-endotelio, la cual constituye el primer paso en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio. Sin embargo, el resto de fármacos del grupo analizados (3TC, ZDV, FTC y TDF) no promueven dicho proceso. Estas interacciones leucocito-endotelio son críticas para la homeostasis y la integridad celular vascular. Pero una exacerbación de las mismas contribuye a la disfunción vascular y al daño que tiene lugar en algunas patologías vasculares (aterosclerosis, hipercolesterolemia, etc.).

Para evaluar dicha interacción en profundidad, hemos empleado dos aproximaciones experimentales: un modelo *in vitro* de adhesión dinámica y un modelo *in vivo* de microscopía intravital. Para la experimentación *in vitro* utilizamos un sistema de cámara paralela de flujo en el que los leucocitos fluyen sobre una monocapa endotelial con un flujo similar al observado *in vivo*

## VI.DISCUSIÓN

---

y en el que se puede observar las interacciones (rodamiento y adhesión) entre ambos tipos celulares que reproducen a las que preceden a la formación del foco inflamatorio *in vivo* <sup>110, 124-126</sup>. El segundo modelo permite el análisis en directo de vasos vivos, observando adicionalmente el proceso de migración leucocitaria. Ambas técnicas han sido utilizadas para entender la cascada inflamatoria asociada a procesos vasculares así como para realizar un análisis del efecto proinflamatorio de diversos fármacos <sup>127-130</sup>.

En pacientes adultos la pauta posológica de ABC es de 300 mg/12 h o de 600 mg/24 h, originándose una concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) de 3.85 µg/mL <sup>131</sup>. Teniendo en cuenta esto, seleccionamos concentraciones de ABC entre 0.1-15 µM, valores que mimetizan las alcanzadas en pacientes que reciben este antirretroviral (1-10 µM) <sup>75, 111-113</sup>. La pauta posológica de ddI es de 200 mg/12 h o de 400 mg/24 h, alcanzándose una C<sub>max</sub> de 2.6 µg/mL <sup>75</sup>. Debido a esto elegimos concentraciones de ddI entre 1-10 µM, valores similares a los alcanzadas en pacientes que reciben este fármaco (11 µM) <sup>75</sup>. Del mismo modo, seleccionamos concentraciones clínicamente relevantes de 3TC (10 µM), ZDV (5 µM), FTC (10 µM) y TDF (1 µM) que se asemejan a las alcanzadas en pacientes bajo tratamiento con dichos ITIAN (1.5-8 µM, 4 µM, 2.7-10.4 µM, y 0.5-1.3 µM respectivamente) <sup>75, 113</sup>.

Así, concentraciones clínicas de ABC (0.1-15 µM) y ddI (5 µM) inducen rodamiento y adhesión de leucocitos PMN y PBMC sobre el endotelio tanto venular como arterial. *In vivo*, además de promover rodamiento y adhesión, inducen el proceso de migración leucocitaria. Éste es el último paso del proceso inflamatorio y además es crítico ya que se trata de una fase de no retorno, así a

diferencia de las fases previas (rodamiento y adhesión) que son reversibles y en las que los leucocitos que se adhieren a vénulas postcapilares en los lugares de inflamación pueden despegarse y volver a formar parte de la circulación, los leucocitos que inician la diapedesis no regresan al torrente sanguíneo o al menos no como el mismo tipo celular <sup>132</sup>. Otro hecho importante que observamos *in vivo* con ambos ITIAN es que promueven la adhesión en arteriolas. De hecho, y a pesar de que la magnitud de la adhesión a este nivel fue menor que en vénulas y que en ellas no pudimos observar los procesos de rodamiento y migración, los efectos encontrados en arteriolas son sorprendentes debido a que existen sólo unos pocos estímulos (daño láser a nivel perivascular, humo de tabaco, TNF- $\alpha$  o angiogénesis del proceso aterosclerótico) capaces de modificar los parámetros leucocitarios en este tipo de vasos visualizándolos por microscopía intravital <sup>122</sup>. Asimismo, observamos un aumento de la adhesión de PBMC al endotelio arterial (HUAEC) tras el tratamiento con ambos ITIAN *in vitro*,

Los tratamientos tanto *in vitro* como *in vivo* con los ITIAN análogos de pirimidina 3TC, ZDV, FTC y el análogo de nucleótido TDF no produjeron modificaciones en ninguno de los parámetros analizados. Al analizar estos antirretrovirales de forma combinada, siguiendo las dos pautas preferentes recomendadas en la actualidad <sup>32</sup>, pudimos confirmar que únicamente la combinación ABC/3TC promueve la interacción leucocito-endotelio a un nivel muy similar al observado con el uso de ABC de forma individual, mientras que la combinación FTC/TDF no modificó ninguno de los parámetros evaluados. Estos datos concuerdan con estudios clínicos recientes los cuales correlacionan ABC (pero no FTC/TDF) con enfermedades cardiovasculares y que afirman que pacientes que cambian su pauta antirretroviral de ABC/3TC a FTC/TDF

## VI.DISCUSIÓN

---

muestran una mejoría tanto en la rigidez arterial <sup>133-135</sup> como en los niveles de diferentes marcadores de riesgo cardiovascular metabólicos (colesterol), inflamatorios (CRP, IL-6, sVCAM-1, MCP-1, IL-8 y MIP-1 $\alpha$ ) o procoagulantes (D-dimero). Incluso se ha sugerido que TDF podría tener propiedades antiinflamatorias. En este sentido, se describió una mejora significativa en la disfunción endotelial y una reducción de los niveles de sVCAM y MCP-1 en los pacientes que recibían TDF pero no en los que eran tratados con ABC <sup>134</sup>. Asimismo, otro estudio describe la capacidad de TDF de reducir la liberación de ciertas citoquinas proinflamatorias (IL-8 y MIP-1 $\alpha$ ) en células humanas primarias y de producir un giro en el balance IL-10/IL-12 desplazándolo hacia un perfil antiinflamatorio <sup>135</sup>.

Una vez establecido que únicamente los ITIAN análogos de purina, ABC y ddi, inducen interacciones leucocito-endotelio, analizamos las moléculas de adhesión implicadas en dicho proceso. Observamos que la acumulación leucocitaria inducida por ambos fármacos ocurría simultáneamente al aumento en la expresión de Mac-1 (CD11b/CD18) en la superficie de neutrófilos y monocitos tanto humanos como de rata tras 4 h de tratamiento. La expresión de otras moléculas de adhesión leucocitarias (CD11a, CD49d o CD62L) no se vio modificada en neutrófilos ni monocitos, así como tampoco la expresión de todas estas moléculas en la población linfocitaria. A nivel del endotelio venular y arterial, no observamos variaciones en los niveles de expresión de las moléculas de adhesión endoteliales E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 tras 4 h de tratamiento.

Mac-1 es una integrina  $\beta_2$  que es movilizada desde vesículas secretoras intracelulares a la superficie celular en minutos tras la

estimulación de neutrófilos y monocitos. A pesar de que puede interaccionar con ICAM-2, iC3B, factor X o fibrinógeno, su principal ligando es ICAM-1, el cual se expresa de forma constitutiva en la superficie del endotelio vascular <sup>79</sup>. Por tanto, la activación temprana de Mac-1 mediada por ABC y ddI y su subsecuente unión a la inmunoglobulina ICAM-1 expresada constitutivamente a nivel endotelial podría ser suficiente para inducir la acumulación leucocitaria. En nuestro estudio, las interacciones leucocito-endotelio inducidas por ABC o ddI *in vitro* e *in vivo* fueron prevenidas con el pre-tratamiento con anticuerpos bloqueantes frente a CD11b, CD18 o su ligando endotelial CD54, demostrando la implicación de Mac-1 e ICAM-1 en estas respuestas. Aunque la participación de esta integrina  $\beta_2$  en los procesos de adhesión y migración leucocitaria era previsible <sup>83, 86</sup>, no era tan evidente su implicación en el proceso de rodamiento leucocitario ya que tradicionalmente las selectinas y/o el complejo VLA-4/VCAM-1 eran considerados los principales responsables de mediar esta fase <sup>81-85</sup>. Sin embargo, actualmente existe una creciente evidencia del papel del tándem Mac-1/ICAM-1 en el rodamiento leucocitario <sup>81, 83</sup>.

ABC y ddI afectan específicamente a PMNs y PBMCs, siendo los PBMCs más sensibles que los PMNs al efecto de estos fármacos. El hecho de que estén afectando a ambos tipos de leucocitos es muy relevante ya que hay un incremento en los niveles de neutrófilos y monocitos durante el infarto agudo de miocardio así como un aumento de la expresión de Mac-1 en ambas poblaciones celulares respecto a sujetos control <sup>136</sup>. Además, se ha descrito que Mac-1 induce la unión de neutrófilos a miocitos cardiacos activados <sup>137</sup>. De este modo, esta molécula podría ser el nexo de unión entre adhesión celular y trombosis,

## VI.DISCUSIÓN

---

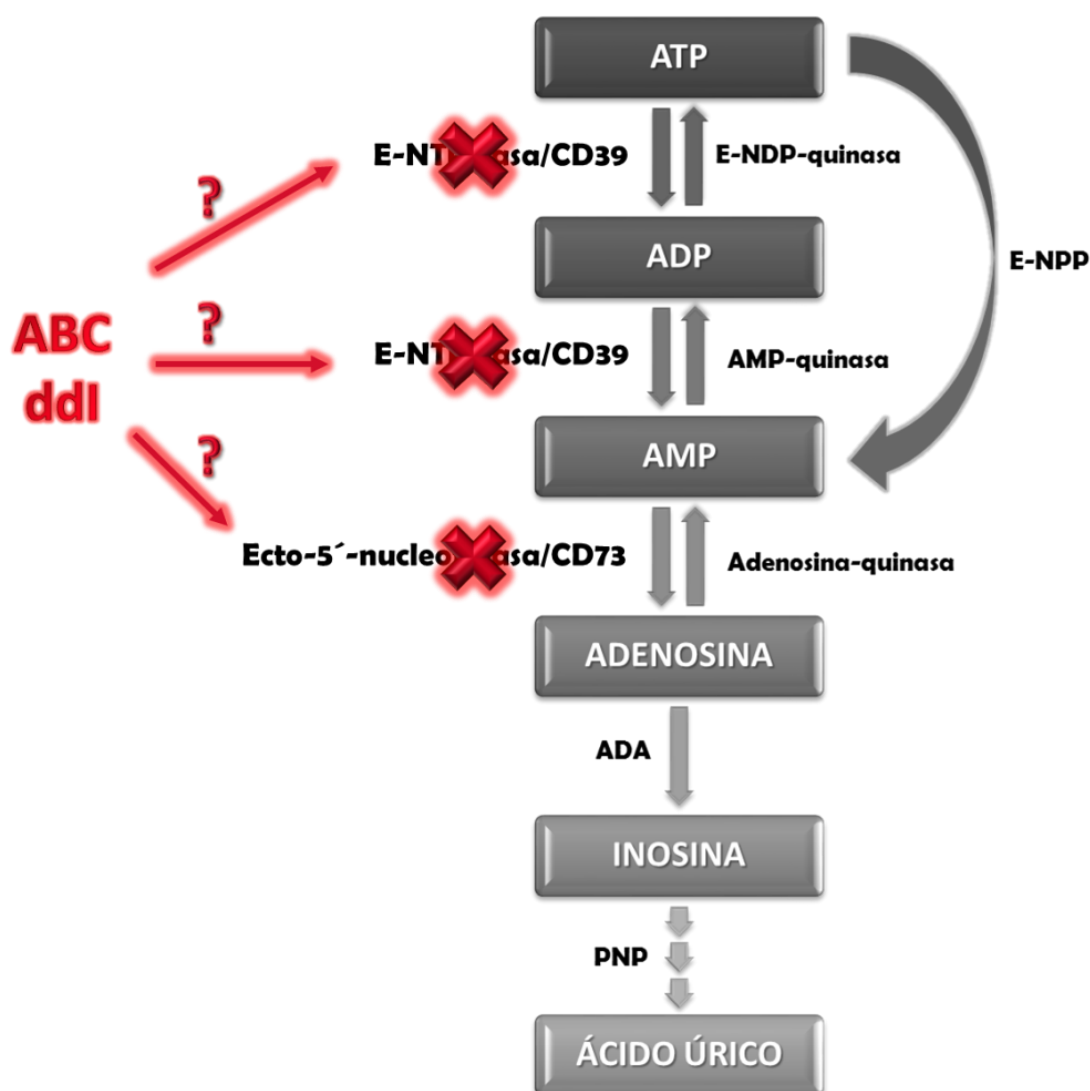
debido a que por un lado Mac-1 está presente en neutrófilos y monocitos que tras su interacción con ICAM-1 se adhieren firmemente al endotelio y por otro lado se ha propuesto como molécula responsable de mediar el reclutamiento de los leucocitos por parte de las plaquetas <sup>138, 139</sup>. En este sentido, los leucocitos ruedan sobre las plaquetas a través de la interacción PSGL-1/P-selectina y posteriormente se unen a ellos a través de Mac-1 interaccionando con receptores presentes en la membrana plaquetaria como GPIb $\alpha$ , “Junctional adhesion molecule-3” (JAM-3) o ICAM-2 <sup>140</sup>.

El hecho de que ICAM-1 constitutiva participase en las respuestas inducidas por ABC y ddi aunque estos fármacos no activaran su expresión, sugiere que estos fármacos activan el reclutamiento de leucocitos en la pared vascular antes de causar la activación o disfunción endotelial. En este sentido, fueron necesarias 24 h para que ABC cause disfunción endotelial en células endoteliales pulmonares humanas <sup>75</sup>. Este estudio sugiere que serían necesarios periodos de exposición al fármaco más prolongados para provocar la liberación de ET-1, la reducción del potencial de membrana y la disminución de la expresión de eNOS que conducen a una disfunción endotelial <sup>75</sup>. Nuestros resultados están en consonancia con estos hechos ya que fueron necesarias 24 h de tratamiento con ABC para inducir un incremento significativo en la expresión de ICAM-1 en células endoteliales venulares o arteriales. Además y mediante experimentos de adhesión dinámica en cámara de flujo tratando un único tipo celular (leucocitos o células endoteliales) de forma independiente con ABC pudimos confirmar que tanto el endotelio como los leucocitos están implicados en la acumulación leucocitaria inducida por ABC, siendo el endotelio afectado en menor medida



que los leucocitos. Asimismo comprobamos que a nivel endotelial, ABC promueve la producción de ERO, la pérdida citosólica de I $\kappa$ B- $\alpha$  así como la transcripción de NF- $\kappa$ B al núcleo.

ABC y ddi son fármacos ITIAN análogos de purina, mientras que 3TC, ZDV y FTC tienen estructura pirimidínica y TDF aunque es un análogo de bases púricas, es un análogo de nucleótido en vez de nucleósido. El hecho de que ddi pero no 3TC, ZDV, FTC ni TDF tuviera un efecto y un mecanismo similar al de ABC, apunta a la existencia de una relación entre la estructura química del ITIAN y su capacidad de inducir interacciones leucocito-endotelio. Debido a la analogía estructural de ABC y ddi con los nucleósidos análogos de bases púricas naturales (guanosina y adenosina respectivamente), nos planteamos que estos dos antirretrovirales tuvieran la capacidad de interferir en la cascada de señalización purinérgica (responsable de la degradación del ATP convirtiéndolo en adenosina), bloqueando distintas enzimas (CD39 o CD73), y con ello provocar por un lado, un aumento de los niveles de nucleótidos y/o nucleósidos proinflamatorios como ATP/ADP/AMP y, por otro, la reducción de los niveles de adenosina, la cual es antiinflamatoria <sup>93, 94, 96, 103, 107</sup> (Figura 59). Esta cascada de señalización es una de las rutas influyentes en la iniciación y progresión de la respuesta inflamatoria, y su desequilibrio hacia el incremento de ATP y ADP favorece el desarrollo de complicaciones cardiovasculares con componente inflamatorio entre las que destacan aterosclerosis e infarto de miocardio <sup>93, 94, 103</sup>. Así, el efecto de ABC y ddi sobre esta cascada podría explicar la correlación entre estos fármacos y el riesgo de sufrir infarto de miocardio observado en estudios clínicos.

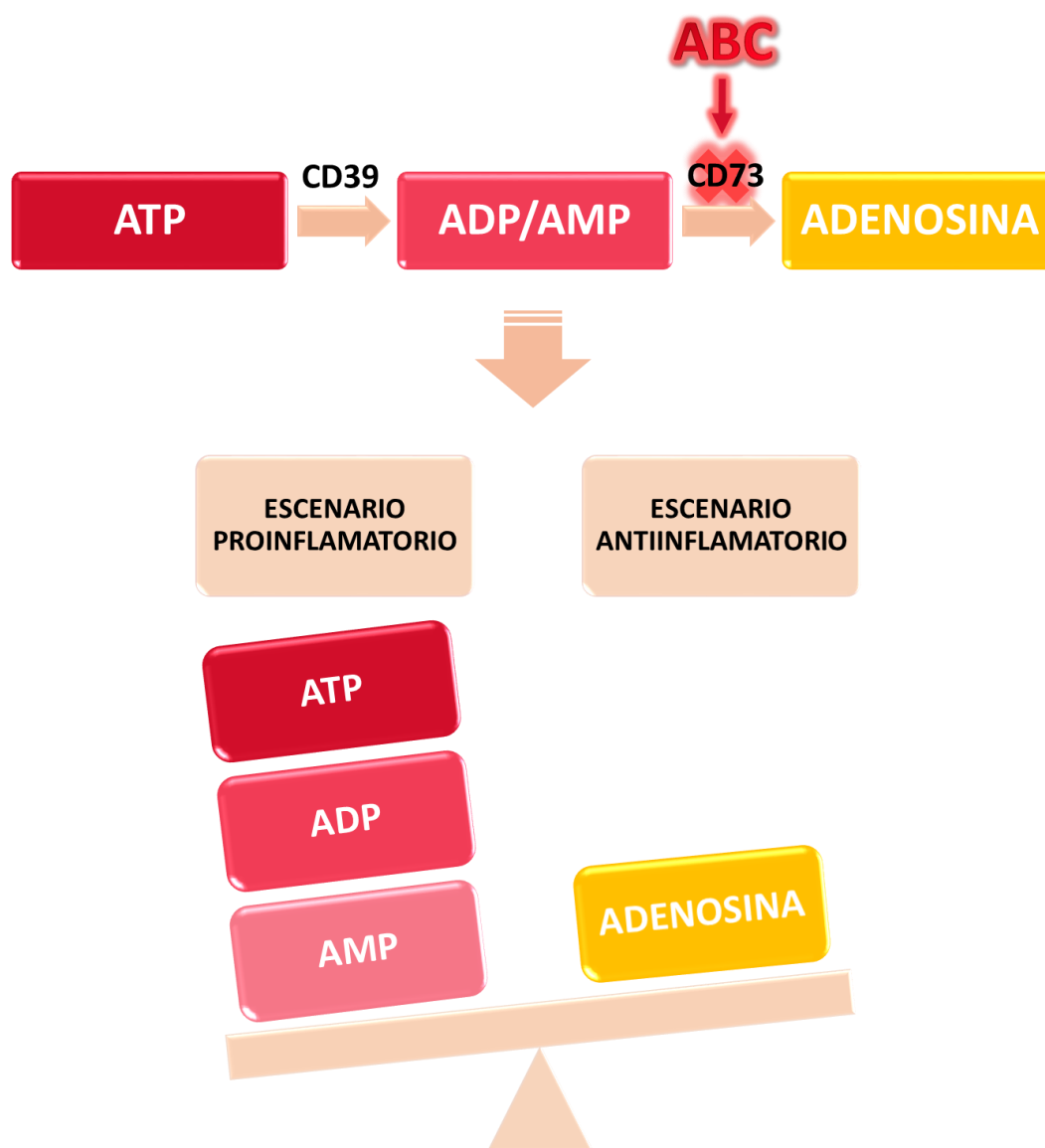


**Figura 59.** Esquema representativo de la ruta de degradación/formación del ATP. La figura muestra la ruta de conversión del ATP a adenosina y finalmente la transformación de adenosina a ácido úrico, así como las enzimas a las cuales pudieran estar afectando los ITIAN análogos de nucleósido.

Seguindo esta hipótesis, demostramos que tanto ABC como ddi aumentan los niveles de ATP intracelular a nivel endotelial (vena y arteria) y a nivel leucocitario (PMN y PBMC); además producen una reducción tanto a nivel endotelial como leucocitario en la expresión de la enzima ecto-5'-nucleotidasa (CD73) de la ruta de degradación del ATP (enzima responsable de transformar

el AMP en adenosina) sin afectar la expresión de E-NTPasa (CD39).

Esta menor expresión de CD73 podría deberse a que ambos fármacos podrían unirse a la enzima provocando un cambio conformacional en su estructura que conllevaría a una menor cuantificación de su expresión. Además, ABC y ddi, por su analogía estructural con los nucleósidos de purina, estarían actuando como falsos sustratos de esta enzima, impidiendo la degradación del AMP en adenosina y produciéndose por tanto una acumulación de moléculas proinflamatorias como ATP/ADP/AMP y una reducción de la concentración de adenosina, antiinflamatoria (Figura 60). Un mecanismo similar se ha descrito para la activación de plaquetas por ABC: este fármaco produce la inhibición de la enzima guanilil ciclasa (GC), por tanto aumenta los niveles del sustrato de la reacción [guanosina trifosfato (GTP)] y disminuye los del producto [guanosin monofosfato cíclico (GMPc)]. Este desequilibrio entre GTP/GMPc produce un incremento en la expresión de la molécula de adhesión P-selectina <sup>141</sup>.



**Figura 60.** Esquema representativo del mecanismo de acción de ABC sobre la cascada purinérgica. ABC reduce la expresión de la enzima ecto-5'-nucleotidasa (CD73) originando un aumento de los niveles de los mediadores proinflamatorios ATP/ADP/AMP y una reducción de la concentración de adenosina, antiinflamatoria.

Esta reducción de la enzima CD73 tendría mucha relevancia ya que es responsable de la regulación del balance de los mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios en la vasculatura. La enzima ecto-5'-nucleotidasa se asocia principalmente al endotelio vascular de los grandes vasos como la

aorta, la carótida y las arterias coronarias <sup>93, 142</sup>, mientras que su presencia es más limitada en neutrófilos, eritrocitos, plaquetas y otras células sanguíneas <sup>93, 143-145</sup>. Aunque su principal función es la regulación de la cascada de señalización purinérgica <sup>93, 146</sup>, también posee otras funciones no enzimáticas como la inducción de la señalización y mediación de las adhesiones célula-célula y célula-matriz <sup>93, 147</sup>. Recientemente, en ratones deficientes en CD73 se han observado alteraciones tanto en la función de la barrera vascular en varios tejidos durante la hipoxia <sup>146, 148</sup> como en la integridad pulmonar en modelos murinos de lesión de pulmón <sup>149, 150</sup>. Además, en estos ratones deficientes en CD73 se observó un incremento en la formación de la placa neointima y en la acumulación de macrófagos tras una lesión en las arterias carótidas <sup>93, 107</sup>.

En nuestros estudios y empleando de nuevo la técnica de adhesión dinámica, tratando ambos tipos celulares con antagonistas de distintos receptores de ATP o con diferentes productos que afectan a los niveles de ATP, confirmamos la implicación funcional de este nucleótido a través de los receptores P2X<sub>7</sub> en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC. El ATP es una molécula que no causa únicamente daño celular directo, sino que actúa como ayudante del sistema inmune en la iniciación de la respuesta inflamatoria. Cuando se produce un daño, estrés o infección, se generan altos niveles de ATP en el espacio extracelular. Este aumento promueve la iniciación de un amplio abanico de procesos que llevan en última instancia a la génesis del proceso inflamatorio y con ello a la aparición de patologías asociadas. En particular, la unión del ATP a sus receptores P2X<sub>7</sub> constituye una señal de alerta que promueve la activación del NALP3 inflamasoma conllevando a la activación de

## VI.DISCUSIÓN

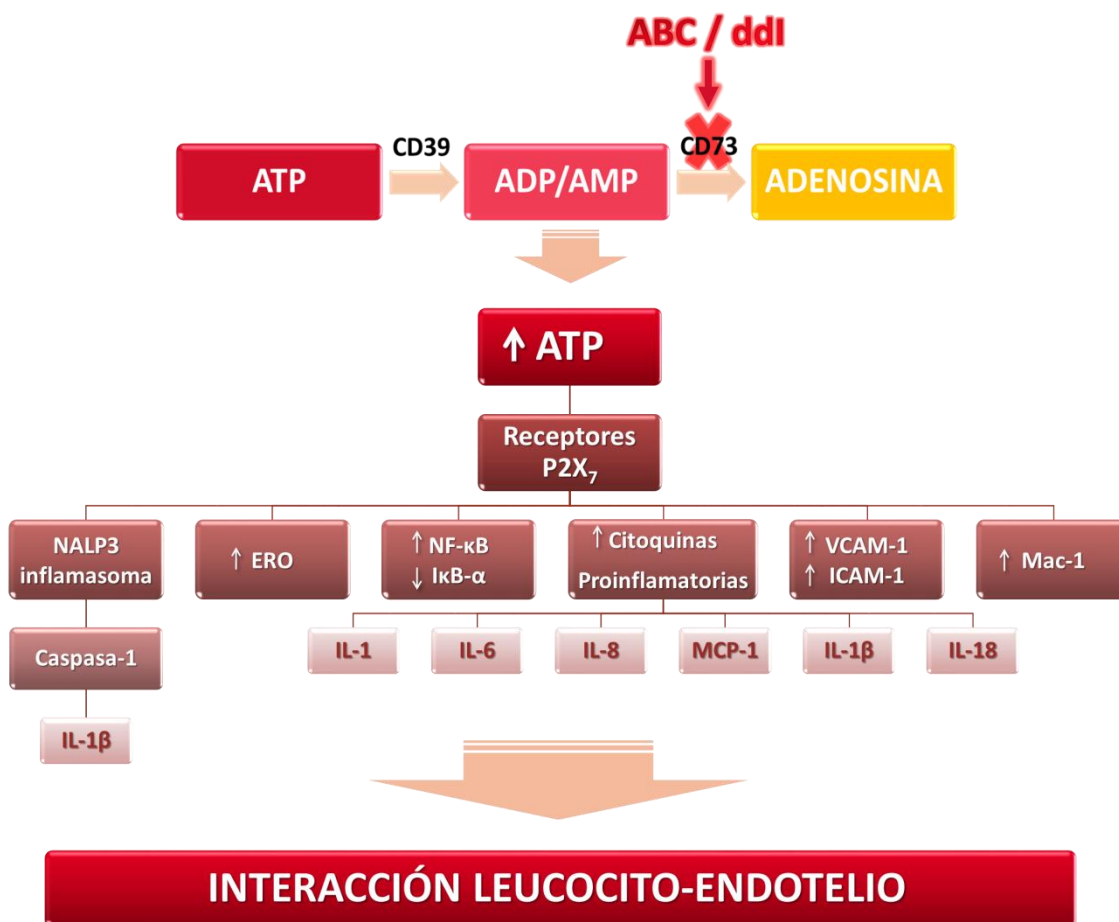
---

citoquinas proinflamatorias que inician tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Una de sus primeras consecuencias es la maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 gracias a la acción caspasa-1 la cual es activada por el NALP3 inflamasoma<sup>103, 104</sup>. La interacción ATP-receptor también es responsable del aumento de otras citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y LPS) en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales, de la producción de ERO, de la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B y de la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias (Mac-1) y endoteliales (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1)<sup>94, 103, 105, 106</sup>.

En este estudio hemos observado por una parte que ABC induce una gran parte de los efectos proinflamatorios descritos para ATP: liberación de ERO, translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo e incremento de ICAM-1 en el endotelio así como incremento de Mac-1 en los leucocitos y por otra, que los efectos proinflamatorios de ABC están mediados por ATP a través de su interacción con su receptor P2X<sub>7</sub>. Por tanto, nuestros resultados apuntan a que el mecanismo por el cual los ITIAN análogos de purina promueven la interacción leucocito-endotelio implicaría una extensa red de acciones las cuales tendrían al ATP como principal protagonista (Figura 61). Estos fármacos reducen a nivel endotelial y leucocitario la expresión de la enzima ecto-5'-nucleotidasa (CD73), elemento clave en la ruta de degradación del ATP, originándose una acumulación de moléculas proinflamatorias (ATP, ADP y AMP). Este ATP generado puede actuar a través de su unión a receptores P2X<sub>7</sub>, de este modo activaría el NALP3 inflamasoma y caspasa-1 e induciría la maduración de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , aumentando la producción de ERO, la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y la pérdida citosólica de I $\kappa$ B- $\alpha$ , la

liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1, Il-6, IL-8, MCP-1 e IL-18 y el incremento de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales (ICAM-1) y leucocitarias (Mac-1), conllevando todo ello a una acumulación leucocitaria que llevaría en última instancia a la génesis del proceso inflamatorio y con ello a la aparición de patologías asociadas (infarto de miocardio, aterosclerosis o trombosis).

En conclusión, el presente trabajo describe los mecanismos celulares y moleculares por los que los ITIAN análogos de purina ABC y ddI inducirían interacciones leucocito-endotelio como primer paso del desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio. Dada la importancia de estos fármacos en la terapia antirretroviral actual, la controversia generada en torno a ellos y teniendo en cuenta la limitación que supone el haber utilizado células de pacientes sin VIH, las diferencias observadas en el perfil de toxicidad cardiovascular apoyan la asociación clínica entre ABC y ddI y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.



**Figura 61.** Esquema representativo del mecanismo de acción proinflamatorio propuesto para ABC y ddi. ABC y ddi bloquean la acción de la enzima ecto-5'-nucleotidasa (CD73) originando un aumento de los niveles del mediador proinflamatorio ATP. ATP interacciona con sus receptores P2X<sub>7</sub> pudiendo provocar una activación de la ruta del NALP3 inflammasoma, aumento de ERO, transcripción de NF- $\kappa$ B, liberación de citoquinas proinflamatorias, así como un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y Mac-1.



## **VII.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



1. ABC y ddi (4 h), pero no 3TC, ZDV, FTC ni TDF, poseen acción proinflamatoria a concentraciones clínicamente relevantes. *In vitro*, inducen rodamiento y adhesión de PMN y PBMC sobre HUVEC y HUAEC. *In vivo*, producen rodamiento, adhesión y migración leucocitaria en vénulas así como adhesión leucocitaria en arteriolas mesentéricas de rata.
2. La combinación terapéutica ABC/3TC produce el mismo efecto proinflamatorio que ABC. Sin embargo, la combinación alternativa FTC/TDF no promueve dichos efectos.
3. ABC y ddi (4 h) causan un incremento en la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos y monocitos tanto de sangre humana como de rata. Sin embargo, no modifican la expresión de otras moléculas de adhesión leucocitarias (LFA-1, CD49d o L-selectina) ni endoteliales (E-selectina, ICAM-1 o VCAM-1).
4. La acción proinflamatoria de ABC y ddi, *in vitro* e *in vivo*, es debida a la interacción de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 con su ligando endotelial ICAM-1.
5. El endotelio también posee un papel importante en esta respuesta. A nivel endotelial, ABC promueven la producción de ERO, así como la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo tras la pérdida citosólica de su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ .
6. ABC incrementa los niveles de ATP intracelulares y produce una reducción en los niveles de ecto-5'-nucleotidasa (CD73) tanto en células endoteliales (HUVEC y HUAEC) como en leucocitos (PMN y PBMC). Además, la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC está mediada por ATP a través de sus receptores P2X<sub>7</sub>.



1. ABC and ddI (4 h), but not 3TC, ZDV, FTC or TDF, have a proinflammatory action at clinically relevant concentrations. *In vitro*, they promote leukocyte (PMN and PBMC) rolling and adhesion on HUVEC and HUAEC. *In vivo*, they induce venular leukocyte rolling, adhesion and emigration and arteriolar leukocyte adhesion in the rat mesentery.
2. The therapeutic combination ABC/3TC produces the same proinflammatory effect than ABC. However, the alternative combination FTC/TDF does not exert these actions.
3. ABC and ddI (4 h) cause an increase in the expression of the leukocyte adhesion molecule Mac-1 (CD11b/CD18) on neutrophils and monocytes from human and rat blood. However, these drugs do not modify the expression of other leukocyte (LFA-1, CD49d or L-selectin) or endothelial (E-selectin, ICAM-1 or VCAM-1) adhesion molecules.
4. The proinflammatory effects of ABC and ddI, both *in vitro* and *in vivo*, are due to the interaction of the leukocyte adhesion molecule Mac-1 with its endothelial ligand ICAM-1.
5. The endothelium also plays an important role in this response. At the endothelial level, ABC promotes ROS production, as well as NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus and the degradation of its cytosolic inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$ .
6. ABC increases the intracellular levels of ATP and reduces the expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) on endothelial cells (HUVEC and HUAEC) and on leukocytes (PMN and PBMC). Moreover, the leukocyte-endothelium interaction induced by ABC is mediated by ATP through its P2X<sub>7</sub> receptors.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**





- (1) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- (2) Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Gueye-NDiaye A, Mboup S, Kanki PJ. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 2003 February 28;22(4):573-93.
- (3) Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002 June;83(Pt 6):1253-65.
- (4) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995 January 12;373(6510):123-6.
- (5) Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, . Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995 January 12;373(6510):117-22.
- (6) Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996 May 24;272(5265):1167-70.
- (7) Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:825-54.
- (8) Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998 March 26;338(13):853-60.
- (9) Mofenson LM, Brady MT, Danner SP, Dominguez KL, Hazra R, Handelsman E, Havens P, Nesheim S, Read JS, Serchuck L, Van DR. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections among HIV-exposed and HIV-infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics. *MMWR Recomm Rep* 2009 September 4;58(RR-11):1-166.
- (10) UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. 2013.
- (11) Caceres W, Cruz-Amy M, Diaz-Melendez V. AIDS-related malignancies: revisited. *P R Health Sci J* 2010 March;29(1):70-5.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- (12) Meys R, Gotch FM, Bunker CB. Human papillomavirus in the era of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus: an immune reconstitution-associated disease? *Br J Dermatol* 2010 January;162(1):6-11.
- (13) Chan W, Sviridov D, Dart AM. HIV, atherosclerosis and inflammation: implications for treatment. *J HIV Ther* 2009 November;14(3):61-8.
- (14) Mishra RK. Cardiac emergencies in patients with HIV. *Emerg Med Clin North Am* 2010 May;28(2):273-82, Table.
- (15) Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect Dis* 2009 August;9(8):493-504.
- (16) Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio MA, Knysz B, Dietrich M, Phillips AN, Lundgren JD. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 2003 July 5;362(9377):22-9.
- (17) Panos G, Samonis G, Alexiou VG, Kavarnou GA, Charatsis G, Falagas ME. Mortality and morbidity of HIV infected patients receiving HAART: a cohort study. *Curr HIV Res* 2008 May;6(3):257-60.
- (18) Imamichi T. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr Pharm Des* 2004;10(32):4039-53.
- (19) de Bethune MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res* 2010 January;85(1):75-90.
- (20) Ezzell C. AIDS drug gets green light. *Nature* 1987 October 29;329(6142):751.
- (21) Lewis W, Day BJ, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2003 October;2(10):812-22.
- (22) Ribera E, Tuset M, Martin M, del CE. [Characteristics of antiretroviral drugs]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011 May;29(5):362-91.
- (23) Piliero PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004 September 1;37 Suppl 1:S2-S12.
- (24) Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res* 2004 October;2(4):323-32.

- (25) Wensing AM, van Maarseveen NM, Nijhuis M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res* 2010 January;85(1):59-74.
- (26) Curran A, Falcó V, Ribera E. Inhibidores de la proteasa. In: Soriano V, González- Lahoz J, eds. *Manual de SIDA*. 8ª Edición ed. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2009. p. 167-202.
- (27) Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 1998 November;4(11):1302-7.
- (28) Perry CM. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. *Drugs* 2010 June 18;70(9):1189-213.
- (29) Hicks C, Gulick RM. Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clin Infect Dis* 2009 April 1;48(7):931-9.
- (30) Hammer SM, Eron JJ, Jr., Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2008 August 6;300(5):555-70.
- (31) Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Actualización Enero 2013. 2013.
- (32) Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, Eron JJ, Gunthard HF, Hammer SM, Reiss P, Richman DD, Rizzardini G, Thomas DL, Jacobsen DM, Volberding PA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 2012 July 25;308(4):387-402.
- (33) Domingo P, Lozano F. [Management of antiretroviral drug toxicity]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011 August;29(7):535-44.
- (34) Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antiviral Res* 2010 January;85(1):201-9.
- (35) Akanbi MO, Scarci K, Taiwo B, Murphy RL. Combination nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors for treatment of HIV infection. *Expert Opin Pharmacother* 2012 January;13(1):65-79.
- (36) Petit F, Fromenty B, Owen A, Estaquier J. Mitochondria are sensors for HIV drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2005 May;26(5):258-64.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- (37) Blas-Garcia A, Esplugues JV, Apostolova N. Twenty years of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: time to reevaluate their toxicity. *Curr Med Chem* 2011;18(14):2186-95.
- (38) Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A, El-Sadr W, Thiebaut R, De WS, Kirk O, Fontas E, Law MG, Phillips A, Lundgren JD. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2007 April 26;356(17):1723-35.
- (39) Hull MW, Montaner JS. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Ann Med* 2011 August;43(5):375-88.
- (40) Mulligan K, Grunfeld C, Tai VW, Algren H, Pang M, Chernoff DN, Lo JC, Schambelan M. Hyperlipidemia and insulin resistance are induced by protease inhibitors independent of changes in body composition in patients with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 January 1;23(1):35-43.
- (41) Flint OP, Noor MA, Hruz PW, Hylemon PB, Yarasheski K, Kotler DP, Parker RA, Bellamine A. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. *Toxicol Pathol* 2009 January;37(1):65-77.
- (42) Naggie S, Hicks C. Protease inhibitor-based antiretroviral therapy in treatment-naive HIV-1-infected patients: the evidence behind the options. *J Antimicrob Chemother* 2010 June;65(6):1094-9.
- (43) Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, De WS, Law M, d'Arminio MA, Friis-Moller N, Kirk O, Pradier C, Weller I, Phillips AN, Lundgren JD. 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 April 26;371(9622):1417-26.
- (44) Bonnet F, Morlat P, Chene G, Mercie P, Neau D, Chossat I, Decoin M, Djossou F, Beylot J, Dabis F. Causes of death among HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy, Bordeaux, France, 1998-1999. *HIV Med* 2002 July;3(3):195-9.
- (45) Triant VA. HIV infection and coronary heart disease: an intersection of epidemics. *J Infect Dis* 2012 June;205 Suppl 3:S355-S361.
- (46) Acevedo M, Sprecher DL, Calabrese L, Pearce GL, Coyner DL, Halliburton SS, White RD, Sykora E, Kondos GT, Hoff JA. Pilot study of coronary atherosclerotic risk and plaque burden in HIV patients: 'a call for cardiovascular prevention'. *Atherosclerosis* 2002 August;163(2):349-54.
- (47) Pellicelli AM, Palmieri F, Cicalini S, Petrosillo N. Pathogenesis of HIV-related pulmonary hypertension. *Ann N Y Acad Sci* 2001 November;946:82-94.

- (48) Chow FC, Regan S, Feske S, Meigs JB, Grinspoon SK, Triant VA. Comparison of ischemic stroke incidence in HIV-infected and non-HIV-infected patients in a US health care system. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012 August 1;60(4):351-8.
- (49) Gujuluva C, Burns AR, Pushkarsky T, Popik W, Berger O, Bukrinsky M, Graves MC, Fiala M. HIV-1 penetrates coronary artery endothelial cells by transcytosis. *Mol Med* 2001 March;7(3):169-76.
- (50) Zietz C, Hotz B, Sturzl M, Rauch E, Penning R, Lohrs U. Aortic endothelium in HIV-1 infection: chronic injury, activation, and increased leukocyte adherence. *Am J Pathol* 1996 December;149(6):1887-98.
- (51) Puppo F, Brenci S, Scudeletti M, Lanza L, Bosco O, Indiveri F. Elevated serum levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in HIV infection. *AIDS* 1993 April;7(4):593-4.
- (52) Most J, Zangerle R, Herold M, Fuchs D, Wachter H, Fritsch P, Dierich MP. Elevated concentrations of circulating intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993 March;6(3):221-6.
- (53) Diez-Ruiz A, Kaiser G, Jager H, Birkmann J, Tilz GP, Wachter H, Fuchs D. Increased levels of serum intercellular adhesion molecule 1 in HIV infection are related to immune activation. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102(1):56-60.
- (54) Sipsas N, Sfikakis PP, Sfikakis P, Choremi H, Kordossis T. Serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 and progress towards disease in patients infected with HIV. *J Infect* 1994 November;29(3):271-82.
- (55) Galea P, Vermot-Desroches C, Le CC, Wijdenes J, Chermann JC. Circulating cell adhesion molecules in HIV1-infected patients as indicator markers for AIDS progression. *Res Immunol* 1997 February;148(2):109-17.
- (56) Seigneur M, Constans J, Blann A, Renard M, Pellegrin JL, Amiral J, Boisseau M, Conri C. Soluble adhesion molecules and endothelial cell damage in HIV infected patients. *Thromb Haemost* 1997 April;77(4):646-9.
- (57) de Larranaga GF, Petroni A, Deluchi G, Alonso BS, Benetucci JA. Viral load and disease progression as responsible for endothelial activation and/or injury in human immunodeficiency virus-1-infected patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003 January;14(1):15-8.
- (58) Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio MA, El-Sadr WM, Reiss P, Thiebaut R, Morfeldt L, De WS, Pradier C, Calvo G, Law MG, Kirk O, Phillips AN, Lundgren JD. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003 November 20;349(21):1993-2003.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- (59) Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, Maa JF, Hodder S. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003 August 1;33(4):506-12.
- (60) Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* 1999 June 19;353(9170):2093-9.
- (61) Fontas E, van LF, Sabin CA, Friis-Moller N, Rickenbach M, d'Arminio MA, Kirk O, Dupon M, Morfeldt L, Mateu S, Petoumenos K, El-Sadr W, De WS, Lundgren JD, Pradier C, Reiss P. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis* 2004 March 15;189(6):1056-74.
- (62) Klein. Surveillance data for myocardial infarction hospitalizations among HIV+ and HIV-northern Californians 1994-2006. 2007.
- (63) Sanz E. Abacavir-myocardial infarction. 4-6-2005.
- (64) Bavinger C, Bendavid E, Niehaus K, Olshen RA, Olkin I, Sundaram V, Wein N, Holodniy M, Hou N, Owens DK, Desai M. Risk of Cardiovascular Disease from Antiretroviral Therapy for HIV: A Systematic Review. *PLoS One* 2013;8(3):e59551.
- (65) Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El Sadr W, Dabis F, De Wit S, Law M, d'Arminio MA, Friis-Moller N, Kirk O, Pradier C, Weller I, Phillips AN, Lundgren JD. 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 April 26;371(9622):1417-26.
- (66) Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008 September 12;22(14):F17-F24.
- (67) Obel N, Farkas DK, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Riis A, Pedersen C, Gerstoft J, Sorensen HT. Abacavir and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: a population-based nationwide cohort study. *HIV Med* 2010 February;11(2):130-6.
- (68) Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, Gilquin J, Partisani M, Simon A, Boccara F, Costagliola D. Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4. *Arch Intern Med* 2010 July 26;170(14):1228-38.
- (69) Durand M, Sheehy O, Baril JG, Leloirier J, Tremblay CL. Association between HIV infection, antiretroviral therapy, and risk of acute myocardial infarction: a cohort and nested case-control study using

- Quebec's public health insurance database. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011 July 1;57(3):245-53.
- (70) Cutrell A, Brothers C, Yeo J, Hernandez J, Lapierre D. Abacavir and the potential risk of myocardial infarction. *Lancet* 2008 April 26;371(9622):1413.
- (71) Brothers CH, Hernandez JE, Cutrell AG, Curtis L, Ait-Khaled M, Bowlin SJ, Hughes SH, Yeo JM, Lapierre DH. 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 May 1;51(1):20-8.
- (72) Ribaud HJ, Benson CA, Zheng Y, Koletar SL, Collier AC, Lok JJ, Smurzynski M, Bosch RJ, Bastow B, Schouten JT. 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 April 1;52(7):929-40.
- (73) Bedimo RJ, Westfall AO, Drechsler H, Vidiella G, Tebas P. Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular events in the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 2011 July 1;53(1):84-91.
- (74) Behrens GM, Reiss P. Abacavir and cardiovascular risk. *Curr Opin Infect Dis* 2010 February;23(1):9-14.
- (75) Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009 March;174(3):771-81.
- (76) Alvarez A, Sanz MJ. Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *J Leukoc Biol* 2001 August;70(2):199-206.
- (77) Alvarez A, Hermenegildo C, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circ Res* 2002 December 13;91(12):1142-50.
- (78) Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-97.
- (79) Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 October 1;84(7):2068-101.
- (80) van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 May;24(5):824-33.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- (81) McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:363-96.
- (82) Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Semin Hematol* 1997 October;34(4):319-26.
- (83) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007 September;7(9):678-89.
- (84) Sriramarao P, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol* 1994 November 1;153(9):4238-46.
- (85) Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995 March;128(6):1243-53.
- (86) Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991 May 31;65(5):859-73.
- (87) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994 January 28;76(2):301-14.
- (88) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992 April 3;69(1):11-25.
- (89) Smith CW. Transendothelial migration. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993;184:201-12.
- (90) Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* 1991 October 15;78(8):2089-97.
- (91) Ebisawa M, Liu MC, Yamada T, Kato M, Lichtenstein LM, Bochner BS, Schleimer RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. II. Potentiation of eosinophil transendothelial migration by eosinophil-active cytokines. *J Immunol* 1994 May 1;152(9):4590-6.
- (92) Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA, Jr. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1991 March 1;146(5):1617-25.



- (93) Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008 May;1783(5):673-94.
- (94) Bours MJ, Swennen EL, Di VF, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006 November;112(2):358-404.
- (95) Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972 September;24(3):509-81.
- (96) Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997 June 19;79(12A):2-10.
- (97) Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 2003 December;1(12):2497-509.
- (98) Bodin P, Burnstock G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 December;38(6):900-8.
- (99) Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2000 March;129(5):921-6.
- (100) Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 2006 November 10;99(10):1100-8.
- (101) Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, Chanson M, Goodenough DA, Kwak BR. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med* 2006 August;12(8):950-4.
- (102) Di VF, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2002 February;135(4):831-42.
- (103) Bours MJ, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di VF. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:1443-56.
- (104) Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009;27:229-65.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- (105) Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2007 February 2;282(5):2871-9.
- (106) Boeynaems JM, Communi D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. *J Invest Dermatol* 2006 May;126(5):943-4.
- (107) Zernecke A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzlaff JM, Luscher B, Schrader J, Weber C. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 2006 May 2;113(17):2120-7.
- (108) Altieri DC, Wiltse WL, Edgington TS. Signal transduction initiated by extracellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18. *J Immunol* 1990 July 15;145(2):662-70.
- (109) Gordon EL, Pearson JD, Slakey LL. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. *J Biol Chem* 1986 November 25;261(33):15496-507.
- (110) Ibiza S, Alvarez A, Romero W, Barrachina MD, Esplugues JV, Calatayud S. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009 December;297(6):C1588-C1595.
- (111) Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M, Capeau J. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther.* 2007;12(4):489-500.
- (112) Moyle G, Boffito M, Fletcher C, Higgs C, Hay PE, Song IH, Lou Y, Yuen GJ, Min SS, Guerini EM. Steady-state pharmacokinetics of abacavir in plasma and intracellular carbovir triphosphate following administration of abacavir at 600 milligrams once daily and 300 milligrams twice daily in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Apr;53(4):1532-8.
- (113) Parks DA, Jennings HC, Taylor CW, Acosta EP. Pharmacokinetics of once-daily tenofovir, emtricitabine, ritonavir and fosamprenavir in HIV-infected subjects. *AIDS* 2007 Jun 19;21(10):1373-5.
- (114) Heit B, Colarusso P, Kubes P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha 4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci.* 2005 Nov 15;118:5205-20.
- (115) Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2

- (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008 Sep 15;112:2327-35.
- (116) Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, Coutinho-Silva R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Inmunobiology* 2011 Jan-Feb;216:1-11.
- (117) Henriquez M, Herrera-Molina R, Valdivia A, Alvarez A, Kong M, Muñoz N, Eisner V, Jaimovich E, Schneider P, Quest AFG, Leyton L. ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *J Cell Sci.* 2011 May 1;124:1581-8.
- (118) Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Lusinskas FW, Mayadas TN. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* 2007 November 15;110(10):3682-90.
- (119) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150:76-85.
- (120) Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1979 September;25(9):1531-46.
- (121) Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993 May;302(2):348-55.
- (122) Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY, Mata M, Issekutz AC, Panes J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004 July 15;104(2):402-8.
- (123) Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *Am J Pathol.* 1997 March;150:971-9.
- (124) De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010 June 1;24(9):1259-66.
- (125) De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Marti-Cabrera M, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of Tenofovir/Emtricitabine and Abacavir/Lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antivir Ther* 2012 September 7.
- (126) Dunne JL, Collins RG, Beudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003 December 1;171(11):6105-11.
- (127) Hughes EL, Gavins FN. Troubleshooting methods: Using intravital microscopy in drug research. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010 March;61(2):102-12.
- (128) Gavins FN. Intravital microscopy: new insights into cellular interactions. *Curr Opin Pharmacol* 2012 October;12(5):601-7.
- (129) Goetz DJ, Greif DM, Shen J, Luscinskas FW. Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods Mol Biol* 1999;96:137-45.
- (130) Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007 August 3;101(3):234-47.
- (131) Yuen GJ, Weller S, Pakes GE. A review of the pharmacokinetics of abacavir. *Clin Pharmacokinet* 2008;47(6):351-71.
- (132) Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 2009 July 31;105(3):223-30.
- (133) 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 September 24;24(15):2403-5.
- (134) 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 October;25(10):567-9.
- (135) Melchjorsen J, Risor MW, Sogaard OS, O'Loughlin KL, Chow S, Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Hedley DW, Minderman H, Ostergaard L, Tolstrup M. 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 August 1;57(4):265-75.
- (136) Meisel SR, Shapiro H, Radnay J, Neuman Y, Khaskia AR, Gruener N, Pauzner H, David D. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging. *J Am Coll Cardiol* 1998 January;31(1):120-5.
- (137) Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002 January;53(1):31-47.
- (138) Woollard KJ, Suhartoyo A, Harris EE, Eisenhardt SU, Jackson SP, Peter K, Dart AM, Hickey MJ, Chin-Dusting JP. Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ Res* 2008 November 7;103(10):1128-38.

- (139) Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T, Mayadas TN. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009 September 29;120(13):1255-65.
- (140) Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005 December;115(12):3378-84.
- (141) Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. *AIDS* 2011 November 28;25(18):2243-8.
- (142) Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004 October 15;95(8):814-21.
- (143) Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 1998 February;161:95-109.
- (144) Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, Laurent AB, Resta R, Khare K, Coe A, Kincade PW, Thompson LF. CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998 October;28(10):2981-90.
- (145) Spychala J, Zimmermann AG, Mitchell BS. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J Biol Chem* 1999 August 6;274(32):22705-12.
- (146) Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006 June;2(2):351-60.
- (147) Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol* 1997 January 27;136(2):421-31.
- (148) Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004 December 6;200(11):1395-405.
- (149) Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 2006 April 1;176(7):4449-58.
- (150) Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK. Identification of ectonucleotidases CD39 and

## VIII.BIBLIOGRAFÍA

---

CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* 2007 June 15;178(12):8127-37.

# **ANEXO**





## **IX. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**



## **PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1. DERIVADA DE ESTA TESIS:**

- **De Pablo C**, Orden S, Esplugues JV, Álvarez A. "ATP plays a role in leukocyte accumulation induced by ABC through its P2X<sub>7</sub> receptors". (Manuscrito en preparación).
- **De Pablo C**, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues JV, Álvarez A. "Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse transcriptase inhibitors *in vivo*". The Journal of Infectious Diseases, 2013 (in press).
- **De Pablo C**, Orden S, Calatayud S, Martí-Cabrera M, Esplugues JV, Álvarez A. "Differential effects of Tenofovir/Emtricitabine and Abacavir/Lamivudine on human leukocyte recruitment". Antiviral Therapy, 2012 Sep; 17: 1615-1619.
- **De Pablo C**, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Álvarez A. "Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation". AIDS, 2010 Jun 1;24(9):1259-66.

### **2. DERIVADA DE LA ESTANCIA EN EL EXTRANJERO:**

- Bertram A, Zhang H, von Vietinghoff S, **De Pablo C**, Haller H, Shushakova N, Ley K. "Protein kinase C- $\theta$  is required for murine neutrophil recruitment and adhesion strengthening under flow". The Journal of Immunology, 2012 Apr 15; 188(8):4043-51.

### 3. **DERIVADA DE DIVERSAS COLABORACIONES:**

- Rovira-Llopis S, Rocha M, Falcon R, **De Pablo C**, Álvarez A, Jover A, Hernandez-Mijares A, Victor VM. "Enhanced levels of myeloperoxidase and human leukocyte/endothelium interactions and their relationship with nephropathy in type 2 diabetes". Antioxidants & Redox Signalling. 2013 Mar 25. (Epub ahead of print) PMID: 23521574.
- Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, **De Pablo C**, Álvarez A, Roldan-Torres I, Sola-Izquierdo E, Victor VM. "Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in Type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia". Diabetes Care. 2013 Jan 8 (Epub ahead of print) PMID: 23300290.
- Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Álvarez A, **De Pablo C**, Sanchez-Serrano M, Gomez M, Hernandez-Mijares A. "Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance". The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011 Oct; 96(10):3115-22.

# **ARTÍCULO I**

## **Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation**

**De Pablo C**, Orden S, Apostolova N, Blanquer A,  
Esplugues JV, Álvarez A

AIDS, 2010 Jun 1;24(9):1259-66



## Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation

Carmen De Pablo<sup>a</sup>, Samuel Orden<sup>a</sup>, Nadezda Apostolova<sup>a</sup>,  
Amando Blanquer<sup>c</sup>, Juan V. Esplugues<sup>a,b</sup> and Angeles Alvarez<sup>a</sup>

**Objective:** Abacavir and didanosine are nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) widely used in therapy for HIV-infection but which have been linked to cardiovascular complications. The objective of this study was to analyze the effects of clinically relevant doses of abacavir and didanosine on human leukocyte-endothelium interactions and to compare them with those of other NRTIs.

**Design and methods:** The interactions between human leukocytes – specifically peripheral blood polymorphonuclear (PMN) or mononuclear (PBMC) cells – and human umbilical vein endothelial cells were evaluated in a flow chamber system that reproduces conditions *in vivo*. The expression of adhesion molecules was analyzed by flow cytometry.

**Results:** Abacavir induced a dose-dependent increase in PMN and PBMC rolling and adhesion. This was reproduced by didanosine but not by lamivudine or zidovudine. Both abacavir and didanosine increased Mac-1 expression in neutrophils and monocytes, but produced no effects on either lymphocytes or the expression of endothelial adhesion molecules. The PMN/PBMC rolling and adhesion induced by abacavir or didanosine did not occur when antibodies against Mac-1 or its ligand ICAM-1 were blocked.

**Conclusion:** Abacavir induces significant human leukocyte accumulation through the activation of Mac-1, which in turn interacts with its endothelial ligand ICAM-1. The fact that didanosine exhibits similar effects and that lamivudine and zidovudine do not points to a relationship between the chemical structure of NRTIs and the induction of leukocyte/endothelial cell interactions. This mechanism may be especially relevant to the progression of the vascular damage associated with atherosclerosis and myocardial infarction in abacavir and didanosine-treated patients.

© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

*AIDS* 2010, **24**:1259–1266

**Keywords:** abacavir, cardiovascular diseases, HIV, leukocyte-endothelium interactions, nucleoside reverse transcriptase inhibitor

### Introduction

Continuous administration of 'highly active antiretroviral therapy' (HAART) has made AIDS a chronic illness. However, with the increased longevity of patients there is growing concern about the long-term adverse effects

induced by this life-long pharmacological treatment, particularly its role in cardiovascular complications such as atherosclerosis and myocardial infarction [1]. HAART is a combination of at least three drugs: two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) plus a protease inhibitor and/or a nonnucleoside reverse transcriptase

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología and CIBERehd, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, <sup>b</sup>Fundación Hospital Universitario Dr Peset, and <sup>c</sup>Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, Valencia, Spain.

Correspondence to Juan V. Esplugues, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez 15-17, 4610 Valencia, Spain

Tel: +34 96 3864624; fax: +34 96 3983879; e-mail: Juan.V.Esplugues@uv.es

Received: 27 December 2009; revised: 12 March 2010; accepted: 23 March 2010.

DOI:10.1097/QAD.0b013e32833a2b02

inhibitor (NNRTI) [2]. Although protease inhibitors were originally considered responsible for these deleterious cardiovascular effects, there is recent evidence that also implicates NNRTIs and, particularly, NRTIs [1].

A potential link between abacavir (ABC), one of the most widely used NRTIs, and myocardial infarction was first highlighted in 2005 [3], and substantial controversy has surrounded the subject ever since. Recent studies have not only further implicated ABC as agent that raises the risk of myocardial infarction but also highlight a similar risk is, though to a lesser extent, with didanosine (ddI), another NRTI [4–7]. The reasons for these adverse effects are not clear as neither ABC nor ddI seem to exert a negative influence on major predisposing factors such as lipid and/or glucose metabolism. However, the fact that the potential to develop myocardial infarction exists as long as patients are receiving the drugs and decreases when therapy is discontinued points to the existence of a rapid mechanism involving vascular inflammation [4]. There is some evidence that ABC causes endothelial nitric oxide synthase (eNOS) downregulation and superoxide anion production in human endothelial cells [8], both of which situations can lead to vascular dysfunction and leukocyte accumulation [9,10]. In addition, ABC-treated patients exhibit elevated levels of the inflammatory markers C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 [5].

The accumulation of leukocytes in the vessel wall is a hallmark of the early stages of atherosclerosis, acute myocardial infarction and other vascular diseases and is mediated by the interaction between the adhesion molecules expressed on white blood cells and/or endothelial cells. During this process, leukocytes roll along the wall of inflamed vessels before coming to a halt, after which they adhere and transmigrate [11]. In the present study, we demonstrate the capacity of both ABC and ddI to elicit such interactions and explore the molecular mechanisms involved. NRTIs can be classified as purine or pyrimidine analogues. Purine analogues can be guanosine (ABC) or adenosine (ddI) derivatives. Pyrimidine analogues can be thymidine (zidovudine and stavudine) or cytosine (lamivudine, zalcitabine and emtricitabine) derivatives [12,13]. Our primary hypothesis was based on the existing clinical evidence obtained with ABC and ddI; however for the sake of comparison, we extended our analysis to include the pyrimidine analogues lamivudine and zidovudine.

## Methods

### Human umbilical vein endothelial cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were harvested from freshly obtained umbilical cords by

collagenase treatment as previously described [14]. Briefly, umbilical cord veins were rinsed of blood products with warm PBS, after which the vein was filled with collagenase (1 mg/ml) for 17 min at 37°C. The cords were then gently massaged to ensure detachment of endothelial cells from the vessel wall. The digest was collected, centrifuged and pelleted once more. The pellet was resuspended in endothelial cell growth medium (EGM-2) inside T25 culture flasks where cells were cultured until confluence. After reaching confluence, primary cultures were detached with trypsin and transferred into appropriate culture dishes. Passage 1 from these primary cultures was subsequently employed. For adhesion studies, HUVEC were cultured on fibronectin (5 µg/ml)-coated 25-mm plastic coverslips until confluent (~48 h).

### Leukocyte isolation

Human peripheral blood mononuclear (PBMC) or polymorphonuclear (PMN) cells were isolated from whole blood anticoagulated with sodium citrate drawn from healthy volunteers [14]. Samples were incubated with dextran (3%) for 45 min. PBMC and PMN in the supernatant were separated by gradient density centrifugation (250 g, 25 min) with Ficoll-Paque™ Plus. After red blood cell lysis, leukocytes were washed (HBSS without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>) and resuspended in complete RPMI media.

The medical ethical committee of the Hospital Clínico Universitario de Valencia approved the study and all patients provided written informed consent.

### Adhesion assay under flow conditions

The parallel plate flow chamber in-vitro model has been described previously in detail [14,15]. For adhesion assays, coverslips containing confluent HUVEC monolayers were inserted into a circular recess in the bottom plate of the flow chamber (maintained at 37°C), where a portion (5 × 25 mm) of the monolayer was exposed to the flow. The entire chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, Amstelveen, The Netherlands) connected to a video camera (Sony Exware HAD, Koeln, Germany). Experiments were conducted using a 40× objective lens. PMNs or PBMCs were resuspended in flow buffer (DPBS<sup>+</sup> containing 20 mmol/l HEPES and 0.1% HSA) at 1 × 10<sup>6</sup> or 0.5 × 10<sup>6</sup> cells/ml respectively and drawn across the HUVEC monolayer at a controlled flow rate of 0.36 ml/min (estimated shear stress of 0.7 dyne/cm<sup>2</sup>). A circular glass window in the top plate of the chamber allowed direct live microscopic examination of the monolayer exposed to the flow. Images were recorded in a single field of view over a 5 min period during which leukocyte parameters were determined. Leukocyte rolling was calculated by counting the number of leukocytes rolling over 100 µm<sup>2</sup> of the endothelial monolayer during 1 min period. Velocities of 20



consecutive leukocytes in the field of focus were determined by measuring the time required to travel a distance of 100  $\mu\text{m}$ . Leukocyte adhesion was determined by counting the number of leukocytes that maintained stable contact with the monolayer for 30 s.

#### Experimental protocol

In order to study the effects of NRTIs on leukocyte-endothelial cell interactions, we chose one of the analogues of each purine or pyrimidine. In this way, leukocytes (PMNs or PBMCs) and HUVEC were treated for 4 h at 37°C with NRTI purine analogues [ABC (0.1–15  $\mu\text{mol/l}$ ) or ddI (5  $\mu\text{mol/l}$ )] or NRTI pyrimidine analogues [lamivudine (10  $\mu\text{mol/l}$ ) or zidovudine (5  $\mu\text{mol/l}$ )] or with a control vehicle. Tumoral necrosis factor (TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml, 4 h) and platelet-activating factor (PAF, 1  $\mu\text{mol/l}$ , 1 h) were used as positive controls for HUVEC and leukocytes respectively. Doses were chosen in order to mimic clinical plasma concentrations of the drugs [8,16,17]. To study the effects of blocking antibodies on NRTI-induced leukocyte-endothelial cell interactions, PMN or PBMC were pretreated with anti-lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), anti-macrophage 1 antigen (Mac-1, 20  $\mu\text{g/ml}$ ), anti- $\beta_2$  integrins (CD18, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) or control antibodies (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 20 min (4°C, darkness) prior to NRTI administration or HUVEC monolayers were pretreated with anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) or control antibodies for 30 min at 37°C prior to drug administration. The antibodies were assayed at the previously described doses [18,19].

#### Analysis of the expression of adhesion molecules in peripheral blood leukocytes and in human umbilical vein endothelial cells

Leukocyte adhesion molecules were analyzed in citrated blood samples from healthy donors (40  $\mu\text{l}$ ) as described previously [14,20]. These samples were treated for 4 h at 37°C with the NRTI agents and were then incubated for 20 min on ice in the dark with saturating amounts of the corresponding FITC-conjugated antibody. An automated lysing procedure to remove red blood cells and to fix leukocytes was carried out using the EPICS TQ-PREP system (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA). Neutrophils, monocytes and lymphocytes were identified in the flow cytometer by their specific size (forward-angle light scatter) and granularity (side-angle light scatter). HUVEC were grown to confluence in six well plates as mentioned earlier. Cells were then stimulated for 4 h at 37°C with NRTI agents. Cells were detached with trypsin and placed in suspension and were then incubated with the corresponding antibody (20 min, ice, darkness), fixed (formaldehyde) and analyzed for protein expression according to forward and side scatter characteristics. For both leukocytes and HUVEC, the median of the specific fluorescence intensity was employed as a marker

of the expression of the respective epitope, and all samples were compensated using the appropriate isotype-matched negative control. Ten thousand cells were analyzed in each case. Analysis was performed in an EPICS XL-MCL cytometer (Coulter Electronics).

#### Materials

Dulbecco's PBS with (DPBS<sup>+</sup>) or without (DPBS<sup>-</sup>) Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, EGM-2 culture media and foetal bovine serum were provided by LONZA (Verviers, Belgium). Recombinant TNF- $\alpha$ , human serum albumine (HSA, Albuminate 25%), RPMI1640 supplemented with 20 mM HEPES, HBSS, fibronectin and dextran were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, Missouri, USA). Ficoll-Paque TM Plus was purchased from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Plastic coverslips with a diameter of 25 mm were obtained from Nunc (supplied by Thermo Fisher Scientific). PBS, collagenase, and trypsin were obtained from Gibco Invitrogen. The Immunoprep reagent was acquired from Beckman Coulter. ABC, ddI, lamivudine and zidovudine were from Sequoia Research Products. The following mAb have been reported previously and were used as purified IgG: blocking antibodies against CD11a (clone m38), CD11b (clone ICRF44),  $\beta_2$ -integrins and controls were purchased from Calbiochem (San Diego, California, USA). The blocking antibody against ICAM-1 was obtained from BD Bioscience. FITC or PE conjugated control antibodies and antibodies against E-selectin, ICAM-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, CD18, CD11a, CD11b or CD11c were from BD Bioscience.

#### Data analysis and statistics

Data are mean  $\pm$  SEM of *n* at least four experiments. Statistical significance was considered to be less than 0.05 by one-way ANOVA analysis of variance with Newman-Keuls post-test correction to compare multiple variances.

## Results

#### Effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on leukocyte-endothelium interactions

ABC induced a significant and dose-dependent increase in the rolling flux (Fig. 1a and 1c) and adhesion (Fig. 1b and 1d) of PMN and PBMC. Concomitantly, ABC induced a decrease in the rolling velocity of PMN (veh: 732  $\pm$  104, ABC 5  $\mu\text{mol/l}$ : 542  $\pm$  58  $\mu\text{m/s}$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ) and PBMC (veh: 751  $\pm$  69, ABC 5  $\mu\text{mol/l}$ : 469  $\pm$  120  $\mu\text{m/s}$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 6$ ). PBMC were more sensitive than PMN to the effects of ABC, and this difference reached significance with doses 10 times lower (1  $\mu\text{mol/l}$ ). Leukocyte-endothelium interactions were significantly increased by ddI but not by zidovudine or lamivudine (Fig. 2).

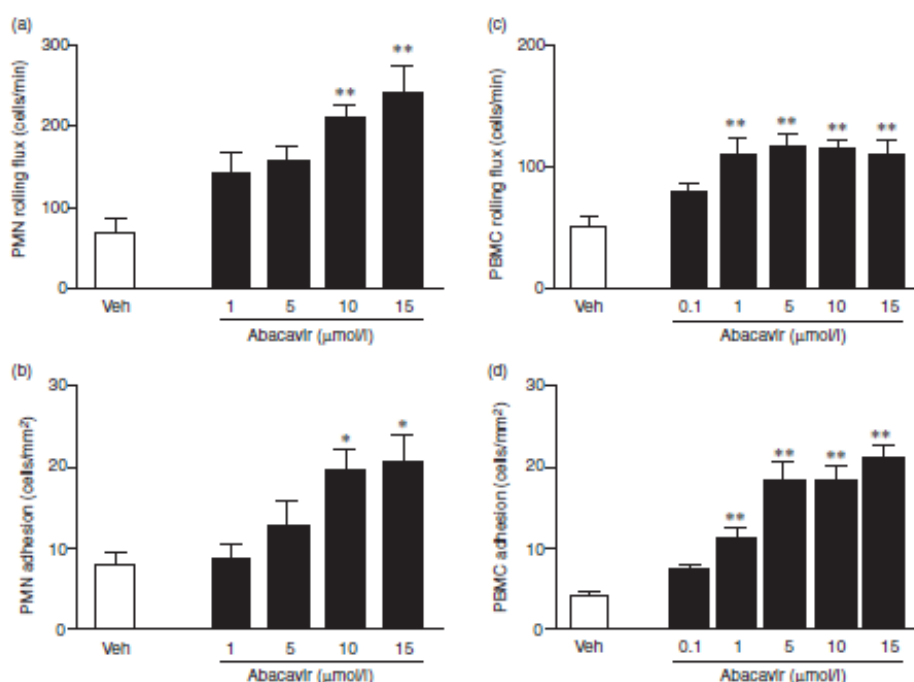


Fig. 1. Effects of ABC on PMN rolling (a) and adhesion (b), and PBMC rolling (c) and adhesion (d). HUVEC and leukocytes (PMNs or PBMCs) were treated (4 h) with ABC (0.1–15  $\mu\text{mol/l}$ ) or its vehicle. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4-6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

#### Endothelial cells were not activated by ABC or ddi

In HUVECs, the highest concentrations of ABC (15  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n=4$ ) or ddi (10  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n=4$ ) had no effect on the expression (as % of control) of E-selectin (ABC:  $103 \pm 5\%$ , ddi:  $99 \pm 2\%$ ), ICAM-1 (ABC:  $99 \pm 15$ , ddi:  $93 \pm 7\%$ ) or VCAM-1 (ABC:  $98 \pm 7\%$ , ddi:  $109 \pm 18\%$ ).

#### Role of Mac-1 in the activation of leukocytes

Monocyte and neutrophil adhesion to the endothelium is generally mediated by the interaction of  $\beta_2$ -integrins LFA-1 and/or Mac-1 with their endothelial ligand ICAM-1. However, Mac-1 has other nonendothelial matrix ligands.  $\beta_2$ -integrins share a common  $\beta$  subunit (CD18) and have a specific  $\alpha$  subunit (CD11a for LFA-1 and CD11b for Mac-1) [11]. Treatment of neutrophils and monocytes with ABC or ddi increased the expression of CD18 and CD11b (Fig. 3 and Supplemental Figure 1, <http://links.lww.com/QAD/A33>) but had no effect on the expression of CD11a, CD49d and L-selectin. Once again, monocytes were more sensitive than neutrophils to the effects of ABC. Neither ABC nor ddi had any effect on the adhesion molecules of lymphocytes (data not

shown). The interactions induced by ABC or ddi were prevented by antibodies against CD11b, CD18 or ICAM-1, but not by antibodies against CD11a (Fig. 4 and Supplemental Figure 2, <http://links.lww.com/QAD/A34>), thus suggesting that a CD11b-CD18 (Mac-1) mechanism is responsible for the accumulation of leukocytes.

#### Discussion

This study demonstrates for the first time that both ABC and ddi induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells by activating Mac-1 in neutrophils and monocytes, but not in lymphocytes, which in turn interacts with the ICAM-1 that is present on endothelial cells.

We used an in-vitro model in which human leukocytes flow over a monolayer of human endothelial cells with a shear stress similar to that observed *in vivo* [14]. This reproduces the processes that precede the formation of an inflammatory focus *in vivo* (rolling and adhesion) and

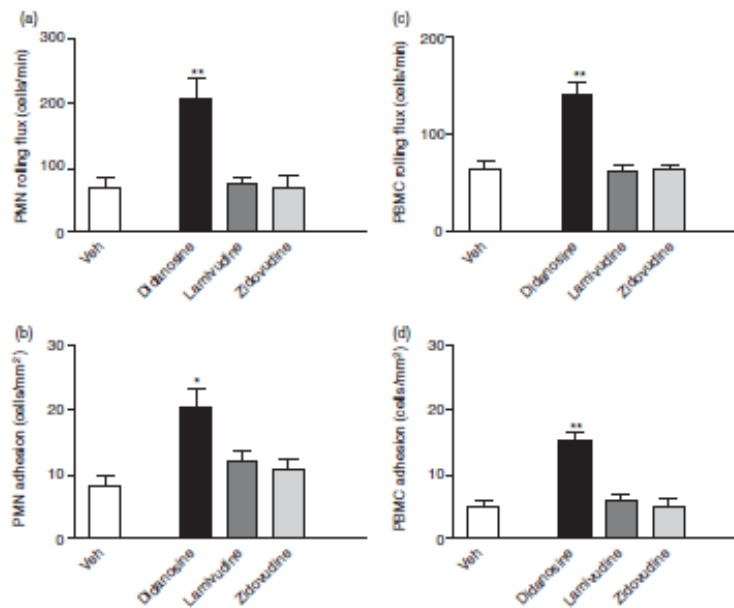


Fig. 2. Effects of NRTI on PMN rolling (a) and adhesion (b), and PBMC rolling (c) and adhesion (d). HUVEC and leukocytes were treated (4h) with ddl (5  $\mu\text{mol/l}$ ), lamivudine (10  $\mu\text{mol/l}$ ), zidovudine (5  $\mu\text{mol/l}$ ) or vehicle. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

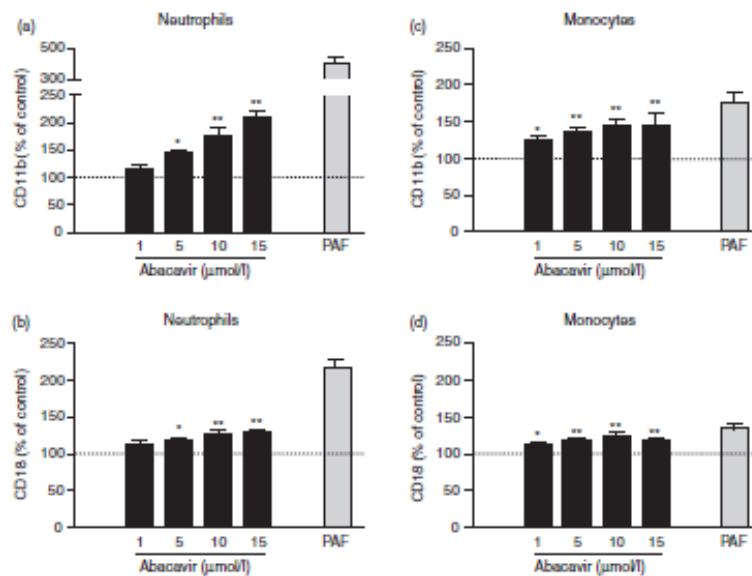
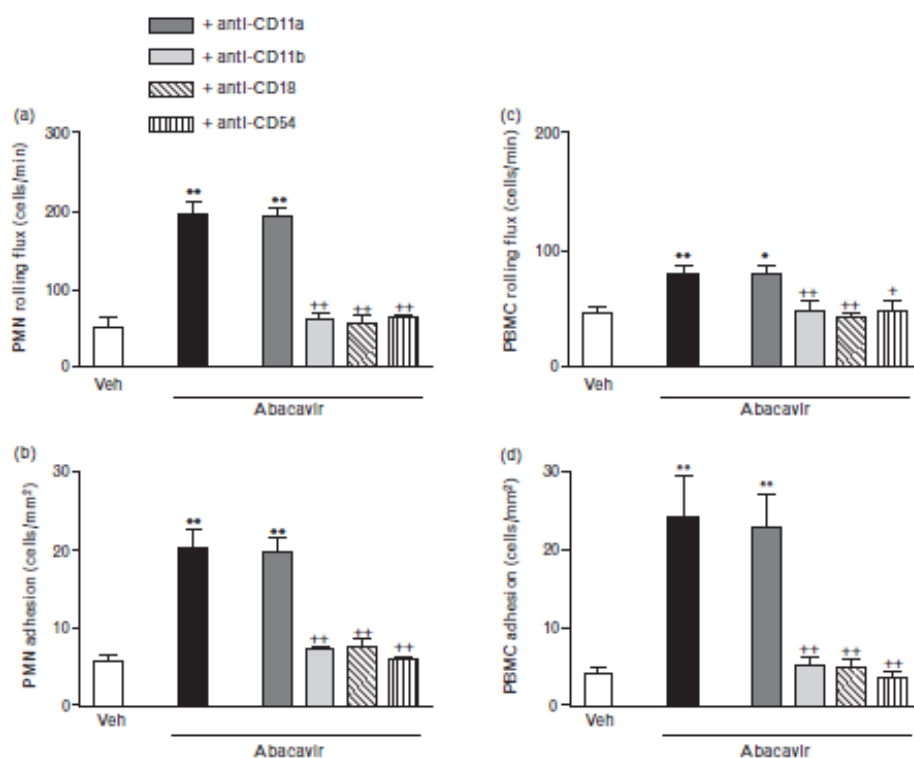


Fig. 3. Effects of ABC on the expression of CD11b (a, c) and CD18 (b, d) integrin subunits on the surface of neutrophils and monocytes. Whole blood was treated (4h) with ABC (1–15  $\mu\text{mol/l}$ ) or vehicle. Fluorescence values are expressed as percentage of mean fluorescence intensities of control cells (dotted line). PAF (1  $\mu\text{mol/l}$ , 1h) was used as positive control. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4-6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).



**Fig. 4.** Effects of blockade of CD11a, CD11b, CD18 or ICAM-1 (CD54) on PMN rolling (a) and adhesion (b), and PBMC rolling (c) and adhesion (d) induced by ABC. Leukocytes and HUVEC were treated (4h) with ABC (15 µmol/l) or its vehicle. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4-6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group and + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  vs. corresponding value in ABC-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

which are critical for hemostasis and vascular cell integrity. However, an exacerbation of these interactions contributes to the vascular dysfunction and injury associated with many vascular diseases (e.g., atherosclerosis, diabetic vasculopathy, hypercholesterolemia, hypertension, ischemia-reperfusion, ...) [21]. Our dynamic experimental system has been widely used to visualize and analyze the multistep recruitment of leukocytes in these diseases; moreover, it allows the mechanisms of action implicated in this recruitment to be assessed [22,23].

In our experiments, concentrations of ABC (0.1–15 µmol/l) and ddl (5 µmol/l) that mimic those present in patients (1–8 and 3–10 µmol/l respectively) [8,24,25] induced leukocyte-endothelial cell interactions (rolling and adhesion). The magnitude of the increases obtained with both drugs was smaller than that observed after direct stimulation with proinflammatory agents such as TNF- $\alpha$ , interleukin-4 or RANTES [26,27]; however, it was substantially greater than that exhibited in unsti-

mulated PMNs or PBMCs from patients with different vascular conditions [28–30]. Leukocyte accumulation induced by ABC or ddl occurred simultaneously with the selective upregulation of Mac-1 on the surface of human neutrophils and monocytes. Nevertheless, the expression of other adhesion molecules in these leukocytes [CD11a/CD18 or very late antigen (VLA)-4] or in endothelial cells (E-selectin, ICAM-1 or VCAM-1) was not affected. Thus, our results suggest that ABC and ddl promote the recruitment of leukocytes before activating the endothelium, and thus before dysfunction appears which needs a much longer period of exposure (24 h) to develop [8].

HIV-infection itself is associated with a more pronounced adhesion of leukocytes to endothelial cells [31] and with an elevated cardiovascular risk [32]. Both situations could be related to the high levels of the endothelial dysfunction markers (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) that are present in these patients [32]. Since ABC has been

specifically associated with an impaired endothelial function in HIV-infected patients [33] and given the difference between the activation profile of adhesion molecules observed in our experiments and that of HIV patients, the effects of antiretrovirals and those of the virus could feasibly be accumulative. In other words, the virus may cause endothelial activation [34] and antiretrovirals could activate leukocytes. This is an interesting hypothesis, but further clinical and experimental studies would be necessary before any solid conclusion can be drawn.

Mac-1 is mobilized from intracellular secretory vesicles to the cell surface within minutes of stimulating neutrophils and monocytes. Although it may interact with ICAM-2, iC3B, factor X or fibrinogen, its main ligand, ICAM-1 is constitutively expressed on the surface of the vascular endothelium [11]. Thus, the fact that blocking either Mac-1 or ICAM-1 significantly reduced the effects of ABC and ddI point to a role for both these molecules in the rolling and adhesion induced by these two antiretrovirals. Although their involvement in adhesion is to be expected, rolling is considered to be mediated by selectins and/or VLA-4/VCAM-1 [11]. However, there is growing evidence of the implication of Mac-1/ICAM-1 in rolling in both the activated and resting endothelium [35,36].

ABC and ddI specifically affect PMN and PBMC. This is of relevance given that there is a substantial increase in the levels of neutrophils and monocytes during acute myocardial infarction and in the expression of Mac-1 among the two cell populations [37]. In addition, it has been reported that Mac-1 induces the binding of neutrophils to activated cardiac myocytes [38], and recent evidence points to the mediation of the leukocyte engagement of platelets as the link between cellular adhesion and thrombosis by Mac-1 [36,39].

Finally, the fact that similar effects to those of ABC were observed with ddI but not with lamivudine or zidovudine suggests a relationship between the chemical structure of NRTIs and the induction of leukocyte/endothelial cell interactions. It is tempting to speculate that purine analogues such as ABC or ddI have the potential to interfere with purine-signaling pathways and to provoke cardiovascular complications with inflammatory components (such as atherosclerosis and myocardial infarction) by reducing the levels of adenosine and increasing those of proinflammatory ATP. However, it is necessary to evaluate the actions, on the one hand, of other NRTIs such as tenofovir and emtricitabine, both of which are potential alternatives to ABC for patients with an elevated risk of cardiovascular disease, and on the other hand, of NNRTIs and protease inhibitors in this and other experimental settings before a sound clinical conclusion can be established.

## Acknowledgements

C.D.P. performed the research; S.O., N.A. and A.B. helped perform the research and J.V.E. and A.A. designed the research and wrote the paper. J.V.E. and A.A. contributed equally to this study.

This study has been supported by grants SAF2007-60021 from Ministerio de Educación y Cultura; GV/2007/074, GVACOMP2009-266, ACOMP2009-194 and CS2009-AP-030 from Generalitat Valenciana and CD06/04/0071 (CIBERehd) and PI081325 from Ministerio de Sanidad y Consumo. C.D.P. and S.O. have been supported by grants from Ministerio de Educación y Cultura and from Fundación Juan Esplugues respectively.

## References

1. Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R, D'Arminio MA, El Sadr WM, Reiss P, et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 349:1993-2003.
2. Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2008; 300:555-570.
3. Sanz E. Abacavir-myocardial infarction. *WHO Signal* 5 A.D: 4-6. 2005.
4. Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El Sadr W, Dabis F, et al. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multicohort collaboration. *Lancet* 2008; 371:1417-1426.
5. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008; 22:F17-F24.
6. Worm SW, Sabin C, Weber R, Reiss P, El Sadr W, Dabis F, et al. Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis* 2010; 201:318-330.
7. Obel N, Farkas DK, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Riis A, et al. Abacavir and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: a population-based nationwide cohort study. *HIV Med* 2010; 11:130-136.
8. Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other antihuman immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009; 174:771-781.
9. Alvarez A, Hemenegildo C, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circ Res* 2002; 91:1142-1150.
10. Alvarez A, Sanz MJ. Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *J Leukoc Biol* 2001; 70:199-206.
11. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-2101.
12. Pilloni PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37 (Suppl 1):S2-S12.
13. De Clercq E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. *Rev Med Virol* 2009; 19:287-299.
14. Ibaiza S, Alvarez A, Romero W, Barachina MD, Esplugues JV, Calatayud S. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297:C1588-C1595.

15. Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Luscinikas FW, Mayadas TN. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEF1 in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* 2007; **110**:3682-3690.
16. Jiang B, Hebert VY, Li Y, Mathis JM, Alexander JS, Dugas TR. HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **224**:60-71.
17. Caron M, Auclair M, Vissian A, Vigouroux C, Capeau J. Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir Ther* 2008; **13**:27-38.
18. Heit B, Colarusso P, Kubus P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci* 2005; **118**:5205-5220.
19. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballarntyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; **112**:2327-2335.
20. Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY, Mata M, Issekutz AC, Panes J, et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004; **104**:402-408.
21. Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001; **14**:44S-54S.
22. Goetz DJ, Greif DM, Shen J, Luscinikas FW. Cell-cell adhesive interactions in an in vitro flow chamber. *Methods Mol Biol* 1999; **96**:137-145.
23. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinikas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007; **101**:234-247.
24. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, et al. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007; **12**:489-500.
25. Moyle G, Boffito M, Fletcher C, Higgs C, Hay PE, Song IH, et al. Steady-state pharmacokinetics of abacavir in plasma and intracellular carbovir triphosphate following administration of abacavir at 600 milligrams once daily and 300 milligrams twice daily in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:1532-1538.
26. Mateo T, Naim Abu NY, Losada M, Estelles R, Company C, Bedrina B, et al. A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. *Blood* 2007; **110**:1895-1902.
27. von Hundelshausen P, Weber KS, Hua Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001; **103**:1772-1777.
28. Sundstrom JB, Martinson DE, Mosunjac M, Bostik P, McMullan LK, Donahoe RM, et al. Norepinephrine enhances adhesion of HIV-1-infected leukocytes to cardiac microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; **228**:730-740.
29. Liu NT, Madden J, Calder PC, Crimble RF, Shearman CP, Chan T, et al. Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis* 2007; **193**:259-268.
30. Abu-Taha M, Rius C, Hermenegildo C, Noguera I, Cerda-Nicolas JM, Issekutz AC, et al. Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan. *J Immunol* 2009; **183**:1393-1402.
31. Zietz C, Hotz B, Stuzl M, Rauch E, Penning R, Lohrs U. Aortic endothelium in HIV-1 infection: chronic injury, activation, and increased leukocyte adherence. *Am J Pathol* 1996; **149**:1887-1898.
32. de Gaetano DK, Rabagliati R, Iacoviello L, Cuda R. HIV infection, HAART, and endothelial adhesion molecules: current perspectives. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**:213-222.
33. Hsue PY, Hunt PW, Wu Y, Schnell A, Ho JE, Hatano H, et al. Association of abacavir and impaired endothelial function in treated and suppressed HIV-infected patients. *AIDS* 2009; **23**:2021-2027.
34. Francisci D, Giannini S, Baldelli F, Leone M, Belfiori B, Guglielmini G, et al. HIV type 1 infection, and not short-term HAART, induces endothelial dysfunction. *AIDS* 2009; **23**:589-596.
35. Dunne JL, Collins RG, Besudet AI, Ballarntyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003; **171**:6105-6111.
36. Woollard KJ, Suhartoyo A, Harris EE, Eisenhardt SU, Jackson SP, Peter K, et al. Pathophysiological levels of soluble P-selectin mediate adhesion of leukocytes to the endothelium through Mac-1 activation. *Circ Res* 2008; **103**:1128-1138.
37. Meisel SR, Shapiro H, Radnay J, Neuman Y, Khaskia AR, Gruener N, et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging. *J Am Coll Cardiol* 1998; **31**:120-125.
38. Fangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; **53**:31-47.
39. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009; **120**:1255-1265.

# **ARTÍCULO II**

## **Differential effects of Tenofovir/Emtricitabine and Abacavir/Lamivudine on human leukocyte recruitment**

**De Pablo C**, Orden S, Calatayud S, Martí-Cabrera M,  
Esplugues JV, Álvarez A

Antiviral Therapy, 2012 Sep; 17: 1615-1619





## Short communication

# Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment

Carmen De Pablo<sup>1</sup>, Samuel Orden<sup>1</sup>, Sara Calatayud<sup>1</sup>, Miguel Marti-Cabrera<sup>1</sup>, Juan V Esplugues<sup>1,2</sup>, Angeles Alvarez<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología and CIBERehd, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Fundación Hospital Universitario Dr Peset, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Fundación General Universidad de Valencia, Valencia, Spain

\*Corresponding author e-mail: angeles.alvarez@uv.es

**Background:** The association of abacavir (ABC) with cardiovascular disease has led to HIV treatment guidelines favouring the combination of tenofovir/emtricitabine (TDF/FTC) over that of ABC/lamivudine (ABC/3TC). We have analysed the effects of plasma-relevant concentrations of TDF, FTC, ABC and 3TC, individually and in clinically employed combinations, on human leukocyte accumulation. The effects of ABC, 3TC, TDF and FTC on the expression of adhesion molecules were also evaluated.

**Methods:** Interactions between human leukocytes – specifically peripheral blood polymorphonuclear or mononuclear cells – and human umbilical vein endothelial cells were evaluated in a flow chamber reproducing *in vivo* conditions. The expression of adhesion molecules was analysed by flow cytometry.

**Results:** Concentrations of TDF, FTC or 3TC mimicking those in the plasma of patients did not have any effect on human leukocyte–endothelial cell interactions, while contrasting results were obtained with ABC. This distinct pattern was reproduced when the drugs were administered in combination; namely, ABC/3TC had a significant influence on rolling and adhesion while TDF/FTC did not. However, the effects produced by ABC alone did not differ when it was combined with 3TC, which suggests the former drug was responsible for the effects observed. ABC, 3TC, TDF and FTC did not modify the expression of endothelial adhesion molecules. Conversely, only ABC enhanced the expression of leukocyte CD11b/CD18 in neutrophils and monocytes.

**Conclusions:** Our results provide evidence that the combination TDF/FTC has a better vascular profile than ABC/3TC.

## Introduction

Abacavir/lamivudine (ABC/3TC) and tenofovir/emtricitabine (TDF/FTC) are the most widely used nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) associations in combined antiretroviral therapy [1]. Current clinical guidelines reflect a preference for the TDF/FTC combination due to the lower virological efficacy of ABC/3TC [1] and evidence, though not uniformly reproduced [2], that ABC (and not TDF) is associated with cardiovascular disease (CVD) [3,4]. This recommendation should however be viewed with caution, since a similar association between TDF/FTC and CVD may have gone undetected until now due to this combination having been commercialized for a shorter period of time.

The relationship between ABC and CVD cannot be explained by an effect on lipid and glucose

metabolism. Indeed, the risk of CVD is reduced when therapy with this drug is discontinued, which points towards a direct and more acute mechanism such as vascular inflammation [3–5]. The role of vascular inflammation in CVD is widely acknowledged [5] and involves the accumulation in the vessel wall of both leukocytes and platelets as a consequence of interactions between adhesion molecules expressed on these cells and/or the endothelium [6,7]. In this circumstance, leukocytes roll along the wall of inflamed vessels before coming to a halt, after which they adhere and transmigrate. In a second phase, platelets bind to the endothelium and recruit other circulating platelets and leukocytes, thereby amplifying the thrombotic and atherosclerotic process.

C De Pablo *et al.*

We have recently demonstrated the capacity of ABC and didanosine (ddI), another purine analogue, to elicit leukocyte accumulation, an effect that was not observed with the pyrimidine analogues 3TC and zidovudine [8]. In the present study, we compare TDF/FTC and ABC/3TC, individually and in combination, on leukocyte accumulation. The effects of FTC, TDF, ABC and 3TC on the expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules are also analysed.

## Methods

We employed passage 1 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) harvested from umbilical cords [8]. Peripheral blood mononuclear (PBMC) or polymorphonuclear (PMN) cells were isolated from whole blood of healthy volunteers [8]. Samples were obtained from Hospital Clínico Universitario (Valencia, Spain) following approval from its ethical committee.

### Adhesion assay under flow conditions

The parallel plate flow chamber model was used for these assays [9,10]. Coverslips (fibronectin [5 µg/ml]-coated) containing confluent HUVEC monolayers were inserted in the chamber (37°C) so that a portion (5×25 mm) was exposed to the flow. The chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, ×40; Amstelveen, the Netherlands) with a video camera (Sony Exware HAD; Koeln, Germany). PMNs or PBMCs were re-suspended in buffer (Dulbecco's phosphate-buffered saline with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> [DPBS<sup>-</sup>] containing 20 mM HEPES and 0.1% HSA) at 1×10<sup>6</sup> or 0.5×10<sup>6</sup> cells/ml, respectively, and drawn across the monolayer (flow rate 0.36 ml/min, shear stress 0.7 dyne/cm<sup>2</sup>). Images of a single field were recorded over 5 min and leukocyte parameters were determined. Rolling flux was calculated by counting the number of cells rolling across 100 µm<sup>2</sup> of the monolayer during 1 min [11]. Rolling leukocytes are easily visualized since they travel more slowly than free-flowing cells. Velocities of 20 consecutive leukocytes in the field of focus were determined by measuring the time required to travel 100 µm. Distances were calibrated using a Neubauer cell chamber. Adhesion was determined after 5 min of perfusion by analysis of 5–10 high power (40×) fields. Leukocytes were considered to be adherent after 30 s of stable contact with the monolayer [10].

### Experimental protocol

Leukocytes and HUVECs were treated independently (4 h, 37°C) with TDF (0.5–1 µmol/l), FTC (5–10 µmol/l), ABC (10 µmol/l), 3TC (10 µmol/l), TDF/FTC (1/10 µmol/l), ABC/3TC (10/10 µmol/l) or control. These concentrations mimic clinically relevant plasma concentrations [12,13].

### Expression of adhesion molecules

Leukocyte adhesion molecules were analysed in blood samples and endothelium molecules in confluent HUVECs [8]. Cells were treated with the NRTI (4 h, 37°C), incubated with saturating amounts of antibodies (20 min, 4°C, darkness), fixed and identified in a flow cytometer (EPICS XL-MCL cytometer; Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). Mean fluorescence intensity was employed as marker of expression of the respective epitope.

### Materials

Dulbecco's PBS with (DPBS<sup>+</sup>) or without (DPBS<sup>-</sup>) Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, endothelial cell growth media-2 culture media and fetal bovine serum (LONZA, Barcelona, Spain), human serum albumine (HSA, Albuminate 25%), RPMI1640 supplemented with 20 mM HEPES, HBSS, fibronectin and dextran (Sigma Chemical Co, Madrid, Spain); Ficoll-Paque TM Plus (GE Healthcare, Valencia, Spain), coverslips (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), PBS, collagenase and trypsin (Gibco, Invitrogen, Barcelona, Spain), Immunoprep reagent (Beckman Coulter, Izasa, Barcelona, Spain), antiretrovirals (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK) and fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-conjugated antibodies (BD Bioscience, Madrid, Spain).

### Statistics

One-way ANOVA with a Newman-Keuls post-test correction was employed for statistical analysis (mean ± SEM; n≥4; P<0.05).

## Results

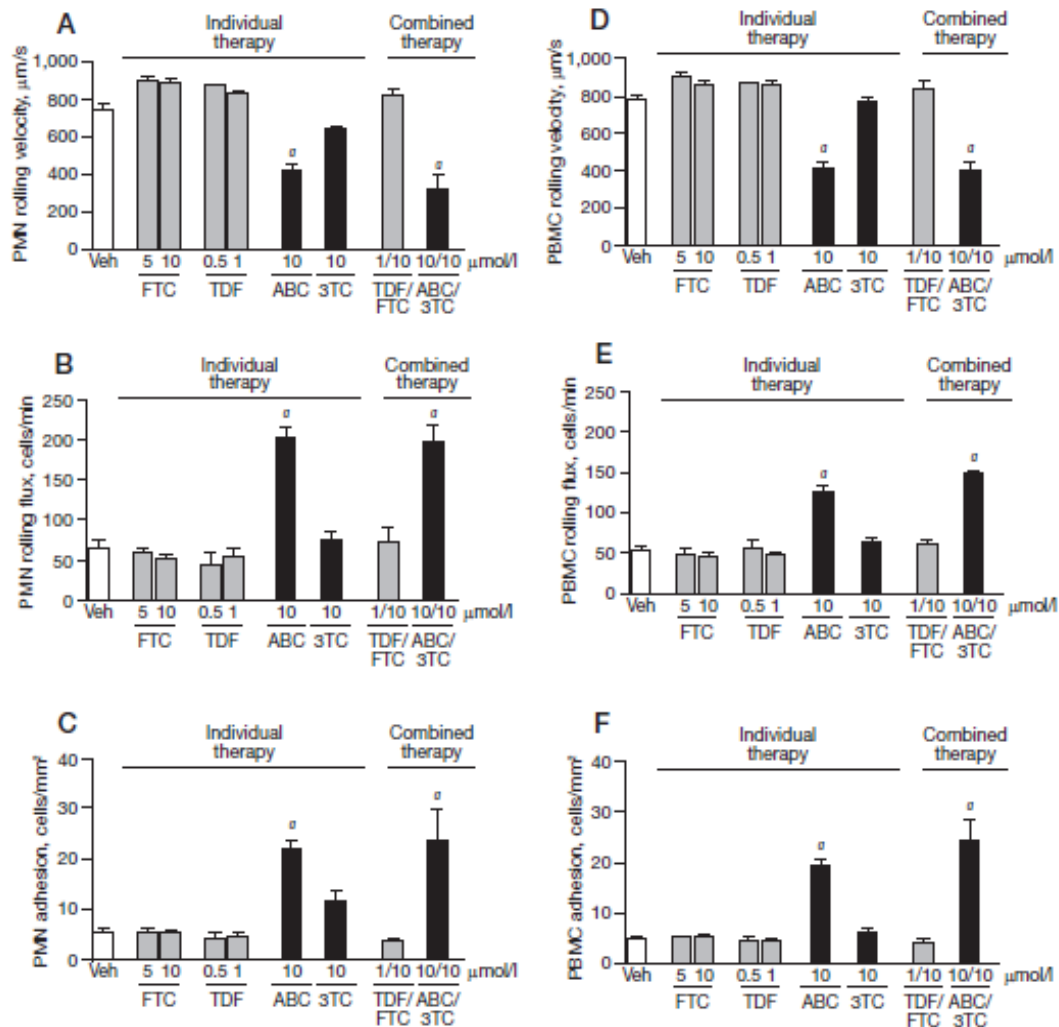
### Leukocyte-endothelial cell interactions

FTC, TDF, 3TC or TDF/FTC did not modify rolling velocity, rolling flux or adhesion of PMN and PBMC (Figure 1). ABC and ABC/3TC induced a significant increase in rolling flux and adhesion while decreasing the rolling velocity of PMN and PBMC (Figure 1).

### Expression of adhesion molecules

FTC, TDF, ABC and 3TC had no effect on the expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in HUVECs (Table 1). Treatment of whole blood with FTC, TDF or 3TC did not alter the expression of CD11a, CD11b, CD18 and CD49d in neutrophils or monocytes (Table 2). Incubation of whole blood with ABC significantly increased the expression of CD11b and CD18 in neutrophils and monocytes (Table 2) but had no effect on CD11a and CD49d. Lymphocyte adhesion molecules were not modified by any of the compounds.

Figure 1. Effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on leukocyte-endothelial cell interactions



Comparison of the effects of emtricitabine (FTC), tenofovir (TDF), abacavir (ABC), lamivudine (3TC), TDF/FTC or ABC/3TC on (A) rolling velocity, (B) rolling flux and (C) adhesion of peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) and on (D) rolling velocity, (E) rolling flux and (F) adhesion of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Human umbilical vein endothelial cells and leukocytes (PMNs or PBMCs) were treated (4 h) with FTC (5–10  $\mu\text{mol/l}$ ), TDF (0.5–1  $\mu\text{mol/l}$ ), ABC (10  $\mu\text{mol/l}$ ), 3TC (10  $\mu\text{mol/l}$ ), TDF/FTC (1/10  $\mu\text{mol/l}$ ), ABC/3TC (10/10  $\mu\text{mol/l}$ ) or vehicle. Results are mean  $\pm$ SD,  $n=4$ . \* $P<0.001$  versus corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

## Discussion

This is the first study to analyse the effects of the two most recommended NRTIs, TDF and FTC, on leukocyte accumulation. We evaluated the effects

of both drugs individually and together, as they are administered in clinical practice, and compared them with those of the recommended alternative combination (ABC/3TC). Concentrations of TDF (0.5–1  $\mu\text{mol/l}$ ), FTC (5–10  $\mu\text{mol/l}$ ), ABC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) or 3TC

C De Pablo et al.

**Table 1.** Expression of endothelial adhesion molecules E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on HUVECs

	FTC	TDF	ABC	3TC
E-selectin	103.9 ±3.0	102.2 ±2.3	110.3 ±19.9	111.4 ±18.8
ICAM-1	102.9 ±5.7	105.7 ±7.4	104.4 ±16.8	89.3 ±9.7
VCAM-1	109.1 ±5.6	109.0 ±5.6	98.3 ±5.5	103.8 ±6.1

Data is adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), percentage versus control. HUVECs were treated with emtricitabine (FTC; 10 µmol/l), tenofovir (TDF; 1 µmol/l), abacavir (ABC; 10 µmol/l), lamivudine (3TC; 10 µmol/l) or vehicle (4 h) and were analysed by flow cytometry as described in Methods. Fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-fluorescence values are expressed as a percentage of the mean fluorescence intensities of control cells (100%). Results are mean ±SD of n=4–6 experiments. ANOVA followed by Newman-Keuls test was performed. ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

(10 µmol/l) mimicking those found in clinical contexts (0.5–1.3, 2.7–10.4, 3–10 and 1.5–8 µmol/l, respectively) were employed [12,13]. TDF, FTC and 3TC had no effect on human leukocyte–endothelial cell interactions. In contrast, ABC induced accumulation of white cells. This distinct pattern was reproduced when drugs were administered in combination; in other words, ABC/3TC significantly influenced rolling and adhesion while TDF/FTC did not. However, ABC exerted a similar action alone or in combination (ABC/3TC), which points to this drug as being responsible for the effects observed. The dynamic experimental system we have employed, in which leukocytes flow over a monolayer of HUVECs is widely acknowledged to accurately reproduce the rolling and adhesion processes that precede the formation of an inflammatory focus *in vivo*. It has provided valuable insight into leukocyte/endothelium interactions [9,10], and has been used to analyse leukocyte recruitment in patients with CVD [14] and to determine the vascular proinflammatory effects of drugs [15]. Furthermore, these *in vitro* conditions allow the actions of a specific agent or combination to be assessed, thereby overcoming the limitations of clinical studies.

We also evaluated effects of TDF, FTC and 3TC on key adhesion molecules and found that none of the three drugs altered the expression of CD11a, CD11b, CD18 or CD49d (present in leukocytes) or endothelial E-selectin, ICAM-1 or VCAM-1. In contrast, ABC induced CD11b and CD18 expression (Mac-1), while it had no effect on CD11a, CD49d or endothelial adhesion molecules.

Mac-1, an adhesion molecule, is thought to be the link between cellular adhesion and thrombosis [16]. Present in neutrophils and monocytes, it interacts with either its constitutive endothelial ligand ICAM-1, causing it to adhere to the endothelium [6], or with platelet ligands (GPIb $\alpha$ ,  $\alpha$ <sub>IIb</sub> $\beta$ <sub>3</sub> and JAM-3) [7], thereby mediating leukocyte engagement of platelets [16].

The actions of ABC could be related to its chemical structure. Since leukocyte accumulation is induced only by cyclic purine analogues (ABC or ddI), and not by pyrimidine analogues (3TC, zidovudine, FTC) or the acyclic nucleotide TDF (current observations and [8]), we propose that ABC and ddI competitively inhibit the purine signalling cascade and increase levels of proinflammatory ATP. This would lead to augmentation of CD11b/CD18 and, consequently, of leukocyte–endothelial interactions. This mechanism is related to the one that seems to underlie activation of platelets by ABC, which involves inhibition of guanylyl cyclase, followed by a decrease in cGMP and increased expression of P-selectin [17].

Clinical studies suggested a relationship between ABC (but not TDF/FTC) and CVD [3,4] and have implicated the expression of metabolic, inflammatory, procoagulant or endothelial markers in said relationship [18,19]. For instance, patients switching from ABC/3TC to TDF/FTC show improvements in both arterial stiffness and CVD markers, including c-reactive protein, interleukin (IL)-6, D-dimer and cholesterol [20]. Indeed, two studies have concluded that TDF has anti-inflammatory potential. One reported a significant improvement in the endothelial dysfunction associated with HIV-infection and decreased levels of sVCAM-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients receiving TDF, but not in those on ABC [21]. The second described the capacity of TDF to undermine the release of cardiovascular-related inflammatory cytokines (IL-8 and MIP-1 $\alpha$ ) from human primary cells and to produce a shift in the IL-10/IL-12 balance towards an anti-inflammatory profile [22].

Given that CVD is the most prevalent cause of death among the normal aged population, any hint of an association with the drugs used in combined antiretroviral therapy is of great relevance. Our results should be interpreted with caution, but they do confirm recent clinical evidence that the combination TDF/FTC has a better vascular profile than that of ABC/3TC and endorse recent guidelines favouring the use of TDF/FTC.

## Acknowledgements

This study has been supported by grants SAF2007-60021 from Ministerio de Educación y Ciencia cofunded by FEDER; SAF2010-16030 from Ministerio de Ciencia e Innovación, CB06/04/0071 (CIBERehd), PI11/00327 from Ministerio de Sanidad y Consumo and PROMETEO/2010/060 from Generalitat Valenciana. CDP is funded by an FPI grant (BES-2008-004338) from Ministerio de Ciencia e Innovación and SO by a VLC-CAMPUS grant from Universidad de Valencia. AA was a beneficiary of Ramón y Cajal (RYC2005-002295) and I3 programmes from Ministerio de Ciencia e Innovación.

**Table 2.** Expression of leukocyte adhesion molecules CD11a, CD11b, CD18 and CD49d integrin subunits on neutrophils and monocytes

Adhesion molecules in leukocytes		FTC	TDF	ABC	3TC
Adhesion molecules in neutrophils, % versus control	CD11a	96.8 ±2.4	96.2 ±2.6	102.9 ±2.6	97.9 ±3.1
	CD11b	96.3 ±10.3	103.3 ±13.4	160.8 ±18.5*	96.3 ±9.1
	CD18	96.8 ±4.1	96.3 ±5.7	122.4 ±7.0*	92.18 ±9.2
	CD49d	99.7 ±0.3	99.8 ±0.3	99.5 ±0.5	94.9 ±5.5
Adhesion molecules in monocytes, % versus control	CD11a	99.1 ±4.2	105.6 ±4.6	106.9 ±6.6	102.8 ±8.0
	CD11b	70.9 ±10.3	85.0 ±18.9	143.9 ±9.2*	87.5 ±17.7
	CD18	99.2 ±6.1	92.5 ±5.2	119.9 ±6.4*	92.0 ±5.3
	CD49d	102.4 ±3.2	97.8 ±3.5	100.1 ±5.1	102.6 ±0.4

Whole blood was treated with emtricitabine (FTC; 10 µmol/l), tenofovir (TDF; 1 µmol/l), abacavir (ABC; 10 µmol/l), lamivudine (3TC; 10 µmol/l) or vehicle (4 h) and was analysed by flow cytometry, as described in Methods. Fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-fluorescence values are expressed as a percentage of the mean fluorescence intensities of control cells (100%). Results are mean  $\pm$  SD of  $n=4-6$  experiments. \* $P<0.01$  versus corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

CDP performed the research, and was assisted by SO, SC and MM-C. CDP and AA analysed the data. JVE and AA designed the research and wrote the manuscript.

### Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

### References

- Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2010; 304:321-333.
- Ribaudo HJ, Benson CA, Zheng Y, *et al.* No risk of myocardial infarction associated with initial antiretroviral treatment containing abacavir: short and long-term results from ACTG A5001/ALIRT. *Clin Infect Dis* 2011; 52:929-940.
- Sabin CA, Worm SW, Weber R, *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.
- The SMART/INSIGHT and the D:A:D Study Groups. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008; 22:F17-F24.
- Behrens GM, Reiss P. Abacavir and cardiovascular risk. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23:9-14.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-2101.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115:3378-3384.
- De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010; 24:1259-1266.
- Goetz DJ, Greif DM, Shen J, Lusinskas FW. Cell-cell adhesive interactions in an *in vitro* flow chamber. *Methods Mol Biol* 1999; 96:137-145.
- Lusinskas FW, Kansas GS, Ding H, *et al.* Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol* 1994; 125:1417-1427.
- Gee DJ, Wright IK, Zimmermann J, Cole K, Soule K, Ubowski M. Dimethylsulfoxide exposure modulates HL-60 cell rolling interactions. *Biosci Rep* 2012; 32:375-382.
- Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009; 174:771-781.
- Parks DA, Jennings HC, Taylor CW, Acosta EP. Pharmacokinetics of once-daily tenofovir, emtricitabine, ritonavir and fosamprenavir in HIV-infected subjects. *AIDS* 2007; 21:1373-1375.
- Victor VM, Rocha M, Banuls C, *et al.* Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:3115-3122.
- Gallego MJ, Zoja C, Morigi M, *et al.* Cyclosporine enhances leukocyte adhesion to vascular endothelium under physiologic flow conditions. *Am J Kidney Dis* 1996; 28:23-31.
- Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, *et al.* Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009; 120:1255-1265.
- Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. *AIDS* 2011; 25:2243-2248.
- Rasmussen TA, Tolstrup M, Melchjorsen J, *et al.* Evaluation of cardiovascular biomarkers in HIV-infected patients switching to abacavir or tenofovir based therapy. *BMC Infect Dis* 2011; 11:267.
- Padilla S, Masia M, Garcia N, Jarrin I, Tormo C, Gutierrez F. Early changes in inflammatory and pro-thrombotic biomarkers in patients initiating antiretroviral therapy with abacavir or tenofovir. *BMC Infect Dis* 2011; 11:40.
- 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.
- Francisci D, Falcinelli F, Belfiori B, *et al.* Impact of tenofovir versus abacavir on HIV-related endothelial dysfunction. *AIDS Patient Care STDS* 2011; 25:567-569.
- Melchjorsen J, Risor MW, Sogaard OS, *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.

Accepted 21 July 2012; published online 7 September 2012



## **ARTÍCULO III**

**Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse transcriptase inhibitors *in vivo***

**De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD,  
Esplugues JV, Álvarez A**

The Journal of Infectious Diseases, 2013 (in press)





### **Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse transcriptase inhibitors *in vivo***

Carmen DE PABLO<sup>1</sup>, Samuel ORDEN<sup>1</sup>, Jose E. PERIS<sup>1</sup>

María D. BARRACHINA<sup>1</sup>, Juan V. ESPLUGUES<sup>1,3</sup> and Ángeles ÁLVAREZ<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología and CIBERehd, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. <sup>3</sup>FISABIO-Fundación Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Fundación General Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

**Total text word count: 1993**

**Total abstract word count: 99**

**Running head:** NRTIs and leukocyte accumulation *in vivo*

**Keywords:** NRTI, abacavir, didanosine, tenofovir, lamivudine, zidovudine, emtricitabine, leukocyte-endothelium interactions, HIV, cardiovascular diseases.

**Footnote:**

**Disclosure statement:** The authors declare no competing interests.

**Sources of funding:** This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación [grants SAF2010-16030 and SAF2010-20231], Ministerio de

## **IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

---

Sanidad y Consumo [grant PI11/00327], CIBERehd [grant CB06/04/0071] and Generalitat Valenciana [grant PROMETEO/2010/060]. C.d.P. was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación [FPI grant BES-2008-004338] and by Fundación Juan Esplugues and S.O. by Universidad de Valencia [VLC-CAMPUS grant]. A.A. was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación [Ramón y Cajal program RYC2005-002295 and I3 program].

**Presented in part:** 12th International Workshop on Adverse Drug Reactions and co-Morbidities in HIV, London, United Kingdom, November 2010 (abstract A4); 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2011), Boston, USA, February-March 2011 (abstract 815); 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Spain, July 2012 (abstract 662).

### **Corresponding author details:**

Ángeles Álvarez. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez 15-17, 46010 Valencia, Spain. Fax. 34-96-3983879. Tel. 34-96-3864898.

[angeles.alvarez@uv.es](mailto:angeles.alvarez@uv.es)

### ABSTRACT

**Background:** There is controversy regarding cardiovascular (CV) toxicity of the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) employed in HIV-treatment.

**Methods:** We evaluated the effects of NRTIs on leukocyte-endothelium interactions, a hallmark of CV diseases, in rat mesenteric vessels by intravital microscopy and in human arterial cells using a flow chamber system.

**Results:** Abacavir and didanosine increased rolling, adhesion and emigration in rat vessels. These effects were reversed with antibodies against Mac-1 or ICAM-1 and were reproduced in human cells. Lamivudine, zidovudine, emtricitabine and tenofovir had no effects.

**Conclusion:** Our results support the association of abacavir and didanosine with CV diseases.

### INTRODUCTION

Combined antiretroviral therapy (cART) has reduced the mortality rates associated with the HIV infection. However, with the increased longevity of patients there is growing concern about the adverse effects generated by this life-long treatment. The association with cardiovascular (CV) diseases is especially worrying given that HIV-infected subjects are already at risk of developing such conditions due to the virus [5]. cART is a combination of at least three drugs: a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and/or a protease inhibitor (PI), plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), the latter of which always forms a part of this therapy. Despite the controversy surrounding the CV toxicity of abacavir (ABC) [6], recent guidelines continue to recommend an initial regimen of this NRTI with lamivudine (3TC) [7].

Evidence supports the implication of vascular inflammatory mechanisms in the association between ABC and CV, including enhanced platelet reactivity, T-cell activation, arterial stiffness and endothelial dysfunction [5]. In addition, we have recently demonstrated *in vitro* the specific capacity of ABC and ddI to elicit leukocyte accumulation in venular endothelium [8, 9], a hallmark of vascular diseases characterized by inflammation such as atherosclerosis [6]. The endothelium is the principal controller of white cell traffic between the blood stream and extravascular space. This process involves a cascade of adhesive interactions between leukocytes and endothelial cells manifested in leukocyte rolling, leading to firm adhesion and subsequential endothelial transmigration. Although leukocyte recruitment via postcapillary venules is particularly

important in many inflammatory diseases, despite being less common, the interaction with arteries is crucial to the mononuclear infiltration appearing in the genesis of atherosclerotic processes [10].

We have performed *in vivo* experiments, in venules and arterioles, to evaluate the relevance of and mechanisms implicated in the leukocyte-endothelium interactions induced by ABC and didanosine (ddI). In addition, we have compared their actions with those of other NRTIs and assessed their effects on the interactions of leukocytes with human arterial cells *in vitro*.

### METHODS

#### **Intravital microscopy**

Leukocyte-endothelial cell interactions were evaluated in anesthetized Sprague-Dawley rats (200-250 g; with sodium pentobarbital 65 mg/kg, i.p.) following a standard technique [10]. A segment of the midjejunum was placed over an optically clear viewing pedestal at 37°C for tissue transillumination. The exposed mesentery was superfused with bicarbonate buffer saline (BBS; pH 7.4, 37°C, 2 mL min<sup>-1</sup>) and visualized using an orthostatic microscope (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Nikon, Badhoevedor, The Netherlands) coupled to a video camera (Sony SSC-C350P; Sony, Koeln, Germany) to allow image capturing on videotape (Sony SVT-S3000P) for playback analysis. A video caliper (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, TX) allowed the diameter of arterioles (15-30 µm) and single unbranched mesenteric venules (25-

## **IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

---

40  $\mu\text{m}$ ) to be measured on-line. Hemodynamic parameters were calculated as described previously [10].

### **Experimental protocol**

Animals were injected (2.5 mL, i.p.) with saline or one of the following NRTI solutions: ABC (1-10  $\mu\text{mol/L}$  equivalent to 8-80  $\mu\text{g/kg}$ ), ddI (5  $\mu\text{mol/L}$ , 15  $\mu\text{g/kg}$ ), 3TC (10  $\mu\text{mol/L}$ , 30  $\mu\text{g/kg}$ ), zidovudine (ZDV, 5  $\mu\text{mol/L}$ , 17  $\mu\text{g/kg}$ ), emtricitabine (FTC, 10  $\mu\text{mol/L}$ , 30  $\mu\text{g/kg}$ ) or tenofovir (TDF, 1-5  $\mu\text{mol/L}$ , 4-18  $\mu\text{g/kg}$ ). All doses were representative of plasma concentrations in patients [11-13] and administered i.p. as is usual in intravital microscopy [[10, 14]. ABC was also orally (100 mg/kg) administered [15]. Images (5-min period) were recorded 4 h later (in some cases at 24 or 48 h) and evaluated off-line by a blind observer.

Adhesion molecules were determined by pre-treatment (30 minutes prior to NRTI) with blocking- or with the corresponding control-antibodies (mAbs) injected through the tail vein in doses of 2 mg/kg for WT-5 (antirat Mac-1, CD11b) and 1 mg/kg for WT-3 (antirat  $\beta_2$ -integrins, CD18) and 1A29 (antirat ICAM-1, CD54), which have been shown to block the *in vivo* function of the adhesion molecules analyzed [10, 16].

### **Flow cytometry**

Portal blood samples were incubated (40  $\mu\text{L}$ , 20 min, ice, in darkness) with saturating amounts of the corresponding conjugated mAb antirat-FITC and then lysed and fixed [10]. Expression of adhesion molecules in granulocytes,

monocytes and lymphocytes was analyzed with a FACScalibur Flow Cytometer (BD).

### **Cell culture**

Human umbilical arterial endothelial cells (HUAEC, Passage 1) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers were from Hospital Clínico Universitario (Valencia). PBMC and HUAEC were treated independently (4 h, 37°C) with ABC (1-10 µmol/L), ddI (5 µmol/L), 3TC (10 µmol/L), ZDV (5 µmol/L), FTC (10 µmol/L), TDF (1 µmol/L) or control [8, 9].

### **Dynamic adhesion assay**

The parallel plate flow chamber model used has been described previously [9]. In brief, coverslips containing confluent HUAEC monolayers were inserted in a chamber (37°C) and a portion (5 x 25 mm) exposed to the flow. The chamber was mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S, x40 Amstelveen, The Netherlands) with a video-camera (Sony Exware HAD, Koeln, Germany). PBMCs were resuspended in buffer (Dulbecco's PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> [DPBS<sup>+</sup>] containing 20 mM HEPES and 0.1% HAS) at 0.5 x 10<sup>6</sup> cells/mL and drawn across the monolayer (flow rate 0.36 mL/min, shear stress 0.7 dyne/cm<sup>2</sup>). Images of a single field were recorded (5 min) and parameters determined.

## **IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

---

### **Materials**

Sprague-Dawley Rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain); pentobarbital (Guinama, Valencia, Spain); antibodies and lysis solution (BD Bioscience, Madrid, Spain); Dulbecco's PBS (DPBS), EGM-2 culture media and fetal bovine serum (Lonza, Barcelona, Spain); human serum albumine (HSA, albuminate 25%), RPMI1640 supplemented with 20 mM HEPES, HBSS, fibronectin and dextran (Sigma Chemical Co, Madrid, Spain); Ficoll-Paque TM Plus (GE Healthcare, Valencia, Spain); coverslips (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain); PBS, collagenase, and trypsin (Gibco, Invitrogen, Barcelona, Spain); and antiretrovirals (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK).

### **Ethics and Statistics**

Human (all donors provided informed consent) and animal procedures followed the Spanish laws and were approved by the respective Hospital or Faculty Ethic Committee. One-way ANOVA with a Newman-Keuls correction was employed (mean  $\pm$  S.E.M,  $n \geq 4$ ,  $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### **Leukocyte-endothelial interactions in venules and arterioles**

ABC induced a significant and dose-dependent decrease in leukocyte rolling velocity (Fig 1A), while increasing rolling flux (Fig 1B), adhesion (Fig 1C) and emigration (Fig 1D) in rat venules and adhesion in rat arterioles (Fig 1E). The



effects of ABC (5  $\mu\text{mol/L}$ , i.p.) were reproduced following oral dosage (100 mg/kg) (data not shown). The effects of ABC (10  $\mu\text{mol/L}$ , i.p.) were acute and reversible, with values returning to levels similar to control levels 48 h later (data not shown). The *in vivo* results obtained in rat arterioles were reproduced *in vitro* in human cells. ABC induced a significant decrease in PBMC rolling velocity and an increase in rolling flux and adhesion (Supplementary Fig 1). ddI (Fig 1 and Supplementary Fig 1), but not ZDV, 3TC, FTC or TDF (data not shown), triggered a response similar to ABC both *in vivo* and *in vitro*.

### **Role of Mac-1 and ICAM-1**

Flow cytometry revealed that both ABC and ddI induced a significant increase in CD11b and CD18 in rat neutrophils and monocytes, while having no effect on CD11a, CD49d or CD62L (Supplementary table 1). In animals treated with ddI, CD11b/c expression was enhanced in monocytes but not in neutrophils, while ABC had no bearing on either of these leukocyte populations. Neither ABC nor ddI exerted any influence on the adhesion molecules of lymphocytes (data not shown).

The effects of ABC and ddI were reversed by pretreatment with antibodies against Mac-1 (CD11b/CD18) or its ligand ICAM-1 (CD54) (Fig 2 and Supplementary Fig 2).

### DISCUSSION

This is the first study to analyse *in vivo* (in venules and arterioles) and *in vitro* (in arteries) the effects of the NRTIs most widely employed in HIV-treatment (ABC, ddI, 3TC, ZDV, FTC and TDF) on the trafficking of leukocytes from blood to tissue. Our *in vivo* results show that ABC and ddI induce inflammatory events through the interaction of the leukocyte's Mac-1 with its endothelial ligand ICAM-1. They expand preliminary *in vitro* data which suggested that ABC and ddI elicit leukocyte accumulation in venular endothelial cells [8]. We have now performed an in-depth investigation with intravital microscopy, a technique that has been instrumental in understanding the inflammatory cascade associated with vascular diseases and its pharmacological modulation [14, 17], in order to analyse the nature and characteristics of the leukocyte-endothelial cell interplay induced by NRTIs.

In this setting, concentrations of ABC (1-10  $\mu\text{mol/L}$ ) and ddI (5  $\mu\text{mol/L}$ ) that mimicked those present in patients (1-8 and 3-10  $\mu\text{mol/L}$  respectively) [11-13] not only induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules – of which we have observed signs previously [8] - but also caused significant leukocyte emigration. The fact that similar results were obtained with oral and i.p. ABC rules out a potential limitation of our intravital approach; i.e. that the pharmacokinetics of the i.p. administration of the drug do not replicate the clinical reality. Furthermore, although we did not measure the intracellular concentrations of the active metabolite of ABC, carbovir, the fact that its effects

were reversible and with a duration matching half-life of its metabolite ( $\pm 20$ h) [13], but not of ABC ( $\pm 2$  h), suggests that carbovir was implicated.

The migratory effect evidences the high activation elicited by ABC and ddI, since white cells moving towards inflamed tissue represent the last and critical step of leukocyte-endothelium interactions. Indeed, emigration is the point of no return in inflammatory responses, as preceding phases - rolling and adhesion - are reversible, and most leukocytes that attach to postcapillary venules at the site of inflammation eventually reenter the circulation. In contrast, leukocytes that commit to diapedesis do not return, – or at least not as the same cell type [18]. Importantly, we have appreciated that these two NRTIs also provoke leukocyte adhesion in arterioles. Despite the fact that the level of adhesion was lower than in venules, and that no rolling or emigration was apparent, these arterial effects are surprising, since few stimuli are capable of modifying the arteriolar-leukocyte parameters revealed by intravital microscopy, including perivascular laser injury, cigarette smoke, TNF $\alpha$  or Angiotensin-II [10]. Indeed, interaction with arteries is essential for mononuclear infiltration during genesis of the atherosclerotic process. Therefore, it is highly relevant that both drugs induced mononuclear (PBMC) rolling and adhesion in human arterial cells. This effect was evaluated in a dynamic flow adhesion assay, a well-established *in vitro* system employed for example to analyse leukocyte recruitment in patients with CV diseases or the vascular pro/anti-inflammatory effects of drugs [19].

Flow cytometry revealed that ABC and ddI induced selective up-regulation of Mac-1 (CD11b/CD18) on the surface of rat neutrophils and monocytes without

## IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

---

influencing the expression of CD11a, CD49d or CD62L. The only disparity between the two drugs was the augmentation of CD11b/c on rat monocytes by ddI. Furthermore, the *in vivo* interactions induced by ABC or ddI were prevented by antibodies against CD11b, CD18 or its endothelial ligand ICAM-1 (CD54). As a whole, these data clearly implicate Mac-1 (CD11b/CD18) and ICAM-1 (CD54) in the leukocyte-endothelial interactions induced by these two antiretrovirals. Interestingly, Mac-1 has been proposed as the link between cellular adhesion and thrombosis [20]. It is present in neutrophils and monocytes, where it interacts with ICAM-1, causing them to adhere to the endothelium [8]. It also interacts with platelet ligands [8] to mediate the leukocyte engagement of platelets, a fundamental step in the onset of the thrombotic process [20].

The effects of ABC and ddI in venules and arterioles were not reproduced (*in vivo* or *in vitro*) by the other NRTIs evaluated (data not shown, [8, 9]). Remarkably, if the chemical structure of the compounds is taken into account, a pattern of activity emerges; changes were induced by cyclic purine analogues (ABC or ddI), but not by pyrimidine analogues (3TC, ZDV, FTC) or the acyclic nucleotide TDF.

We must be cautious when extrapolating experimental data to the clinical human situation, particularly when complex pathological situations are involved. One potential limitation of this study could be that we have not used cells from HIV-patients in order to evaluate the effects of the drugs on their vascular responses.

However, even if this is taken into account, the differences we have observed in CV toxicity profile support the recently clinical association of ABC and ddI with CV diseases.

### REFERENCES

1. Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El Sadr W, Dabis F, *et al.* Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet* 2008; **371(9622)**:1417-1426.
2. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS* 2008; **22(14)**:F17-F24.
3. Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009; **174(3)**:771-781.
4. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; **84(7)**:2068-2101.
5. Triant VA. HIV infection and coronary heart disease: an intersection of epidemics. *J Infect Dis* 2012; **205 Suppl 3**:S355-S361.
6. Behrens GM, Reiss P. Abacavir and cardiovascular risk. *Curr Opin Infect Dis* 2010; **23(1)**:9-14.
7. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 2012; **308(4)**:387-402.
8. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010; **24(9)**:1259-1266.
9. De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Marti-Cabrera M, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of Tenofovir/Emtricitabine and Abacavir/Lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antivir Ther* 2012; **17**: 1615-1619.

## IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

---

10. Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY, Mata M, Issekutz AC, Panes J, *et al.* Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004; **104(2)**:402-408.
11. Wang X, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Pathol* 2009; **174(3)**:771-781.
12. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, *et al.* Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007; **12(4)**:489-500.
13. Moyle G, Boffito M, Fletcher C, Higgs C, Hay PE, Song IH, *et al.* Steady-state pharmacokinetics of abacavir in plasma and intracellular carbovir triphosphate following administration of abacavir at 600 milligrams once daily and 300 milligrams twice daily in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53(4)**:1532-1538.
14. Hughes EL, Gavins FN. Troubleshooting methods: Using intravital microscopy in drug research. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; **61(2)**:102-112.
15. Sumpter LR, Inayat MS, Yost EE, Duvall W, Hagan E, Mayhew CN, *et al.* In vivo examination of hydroxyurea and the novel ribonucleotide reductase inhibitors trimidox and didox in combination with the reverse transcriptase inhibitor abacavir: suppression of retrovirus-induced immunodeficiency disease. *Antiviral Res* 2004; **62(3)**:111-120.
16. Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *Am J Pathol* 1997; **150(3)**:971-979.
17. Gavins FN. Intravital microscopy: new insights into cellular interactions. *Curr Opin Pharmacol* 2012; **12(5)**:601-607.
18. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 2009; **105(3)**:223-230.
19. Luu NT, Madden J, Calder PC, Grimble RF, Shearman CP, Chan T, *et al.* Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from

healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis* 2007; **193(2)**:259-268.

20. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, *et al.* Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009; **120(13)**:1255-1265.

## IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

**Supplementary Table 1. Expression of leukocyte adhesion molecules CD11a, CD11b, CD11b/c, CD18, CD49d integrin subunits and CD62L on neutrophils or monocytes from animals treated with abacavir or didanosine.**

Mean fluorescence (% of control)				
	ABC (10 µmol/L)		ddI (5 µmol/L)	
	Neutrophils	Monocytes	Neutrophils	Monocytes
<b>CD11a</b>	105.3±6.7	99.1±5.3	94.2±8.5	104.3±9.5
<b>CD11b</b>	141.5±11.2**	148.5±13.2**	121.6±5.9**	138.2±14.4**
<b>CD11b/c</b>	108.1±5.2	115.3±10.8	119.9±10.3	147.2±8.1**
<b>CD18</b>	123.2±8.2**	134.7±13.7	134.1±13.7*	132.8±7.6**
<b>CD49d</b>	90.3±5.7	95.6±4.3	104.4±6.6	98.5±11.7
<b>CD62L</b>	92.6±10.1	92.6±10.5	102.8±10.4	103.6±4.2

Rats were treated intraperitoneally with saline (vehicle), abacavir (ABC, 10 µmol/L) or didanosine (ddI, 5 µmol/L). Portal blood samples were obtained after intravital microscopy and the expression of adhesion molecules analysed by flow cytometry. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-fluorescence values are expressed as a percentage of the mean fluorescence intensities of control cells (100%). Results are mean ± SEM of n=7-9 experiments. \*P<0.05 or \*\*P<0.01 vs. the corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).



### Figure legends

**Figure 1. Effects of NTRIs on leukocyte responses in rat mesenteric postcapillary vessels.** Animals were treated (i.p.) with saline (vehicle), abacavir (ABC, 1-10  $\mu\text{mol/L}$ ) or didanosine (ddI, 5  $\mu\text{mol/L}$ ). Responses of leukocyte rolling velocity (A), rolling flux (B), adhesion (C) and emigration (D) in venules and adhesion (E) in arterioles were quantified 4 h later. Rolling flux was assessed offline by counting the number of leukocytes passing a reference point in the vessel per min. Leukocyte rolling velocity ( $V_{\text{wbc}}$ ) was calculated by measuring the time required for these cells to travel along 100  $\mu\text{m}$  of the venule and expressed as  $\mu\text{m/s}$ . A leukocyte was considered to have adhered to the endothelium if it remained stationary for a period  $\geq 30\text{s}$  (number/100  $\mu\text{m}$  of vessel), while emigration was expressed as number of interstitial leukocytes/field. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ .  $**P<0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

**Figure 2. Role of Mac-1 and ICAM-1 in abacavir-induced leukocyte-endothelium interactions in rat mesenteric postcapillary vessels.** Rats were treated (i.p.) with saline (vehicle) or abacavir (ABC, 10  $\mu\text{mol/L}$ ). Some animals were treated (i.v.) with anti-CD11b mAb, anti-CD18 mAb, anti-ICAM-1 or the corresponding control mAb 30 min before administration of ABC. Responses of leukocyte rolling velocity (A), rolling flux (B), adhesion (C) and emigration (D) in venules and adhesion (E) in arterioles were quantified 4 h later. Rolling flux was assessed offline by counting the number of leukocytes passing a reference

## **IX.ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

---

point in the vessel per min. Leukocyte rolling velocity ( $V_{wbc}$ ) was calculated by measuring the time required for these cells to travel along 100  $\mu\text{m}$  of the venule and expressed as  $\mu\text{m/s}$ . A leukocyte was considered to have adhered to the endothelium if it remained stationary for a period  $\geq 30\text{s}$  (number/100  $\mu\text{m}$  of vessel), while emigration was expressed as number of interstitial leukocytes/field. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4-5$ . \*\* $P<0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group. ++  $P<0.01$  vs. corresponding value in ABC-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

**Supplementary Figure 1. Effects of NRTIs on leukocyte interaction with human arterial endothelial cells.** Human umbilical arterial endothelial cells (HUAEC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated (4 h) with abacavir (ABC, 1-10  $\mu\text{mol/L}$ ), didanosine (ddI, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) or vehicle. After assembling the flow chamber, rolling velocity (A), rolling flux (B) and adhesion (C) of PBMC were quantified. Rolling flux was number of cells rolling across 100  $\mu\text{m}^2$  over a 1-min period. The velocities of 20 consecutive leukocytes in the field of focus were determined by measuring the time required to travel 100  $\mu\text{m}$ . Leukocytes were considered to be adherent after 30 s of stable contact with the monolayer in 5 -10 fields. Results are mean  $\pm$  SEM,  $n=4-6$ . \* $P<0.05$  or \*\* $P<0.01$  vs. corresponding value in vehicle-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

### **Supplementary Figure 2. Role of Mac-1 and ICAM-1 in didanosine-induced leukocyte-endothelium interactions in rat mesenteric postcapillary vessels.**

Rats were treated (i.p.) with saline (vehicle) or didanosine (ddI, 5  $\mu\text{mol/L}$ ). Some animals were treated (i.v.) with anti-CD11b mAb, anti-CD18 mAb, anti-ICAM-1 or the corresponding control mAb 30 minutes before administration of ddI. Responses of leukocyte rolling velocity (A), rolling flux (B), adhesion (C) and emigration (D) in venules and adhesion (E) in arterioles were quantified 4 h later. Rolling flux was assessed offline by counting the number of leukocytes passing a reference point in the vessel per min. Leukocyte rolling velocity ( $V_{\text{wbc}}$ ) was calculated by measuring the time required for these cells to travel along 100  $\mu\text{m}$  of the venule and expressed as  $\mu\text{m/s}$ . A leukocyte was considered to have adhered to the endothelium if it remained stationary for a period  $\geq 30$  s (number/100  $\mu\text{m}$  of vessel), while emigration was expressed as number of interstitial leukocytes/field. Results are mean  $\pm$  SEM, n=4-5. \*\*P<0.01 vs. corresponding value in vehicle-treated group. ++ P<0.01 vs. corresponding value in ddI-treated group (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Figure 1

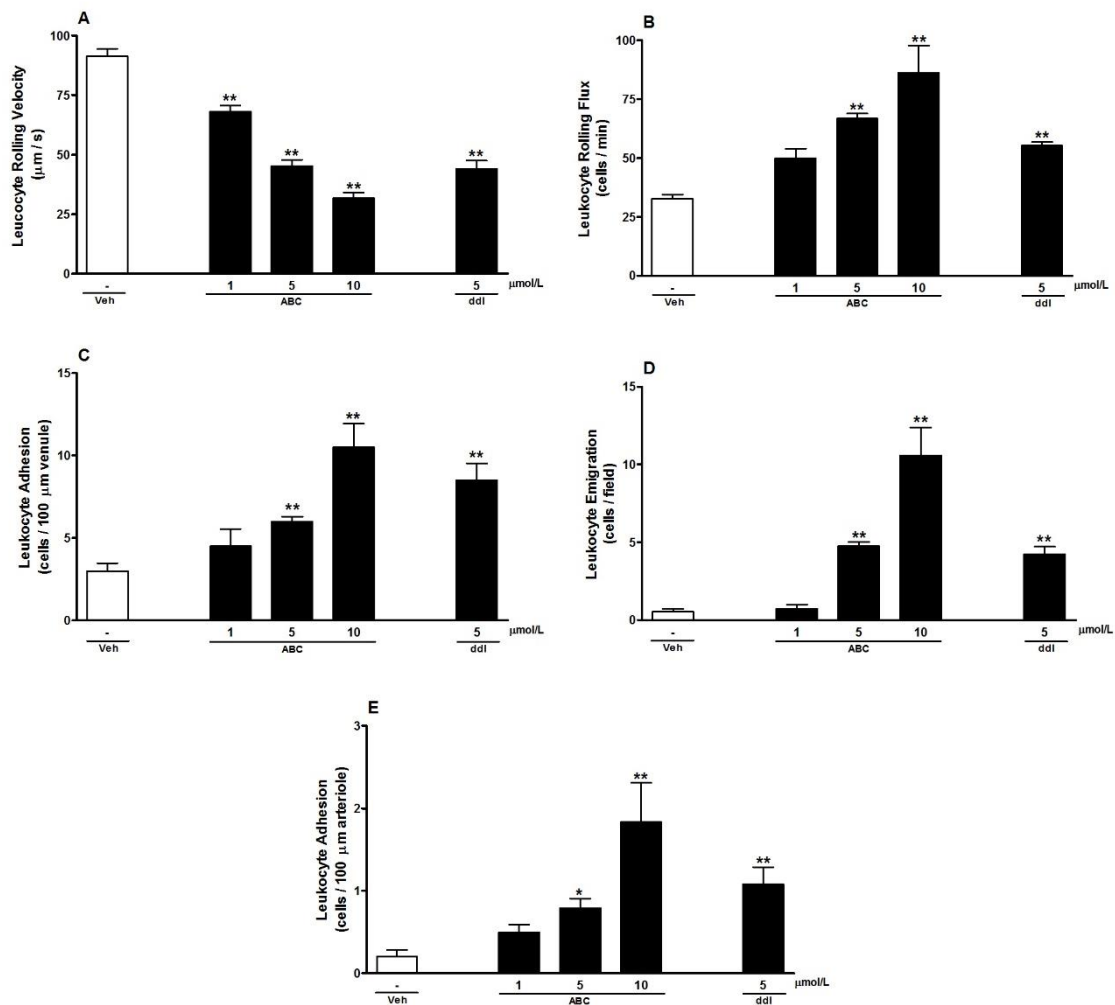
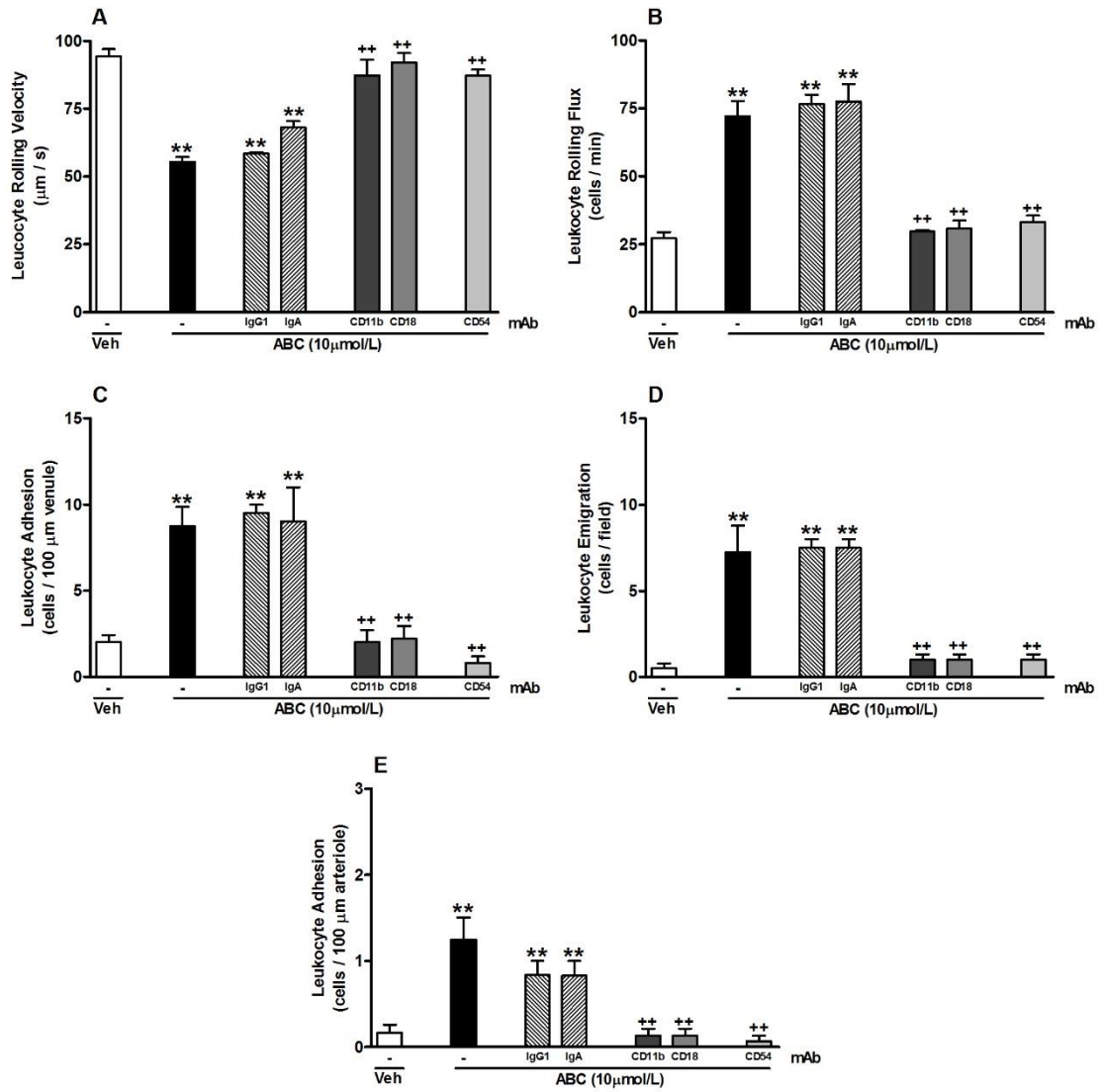
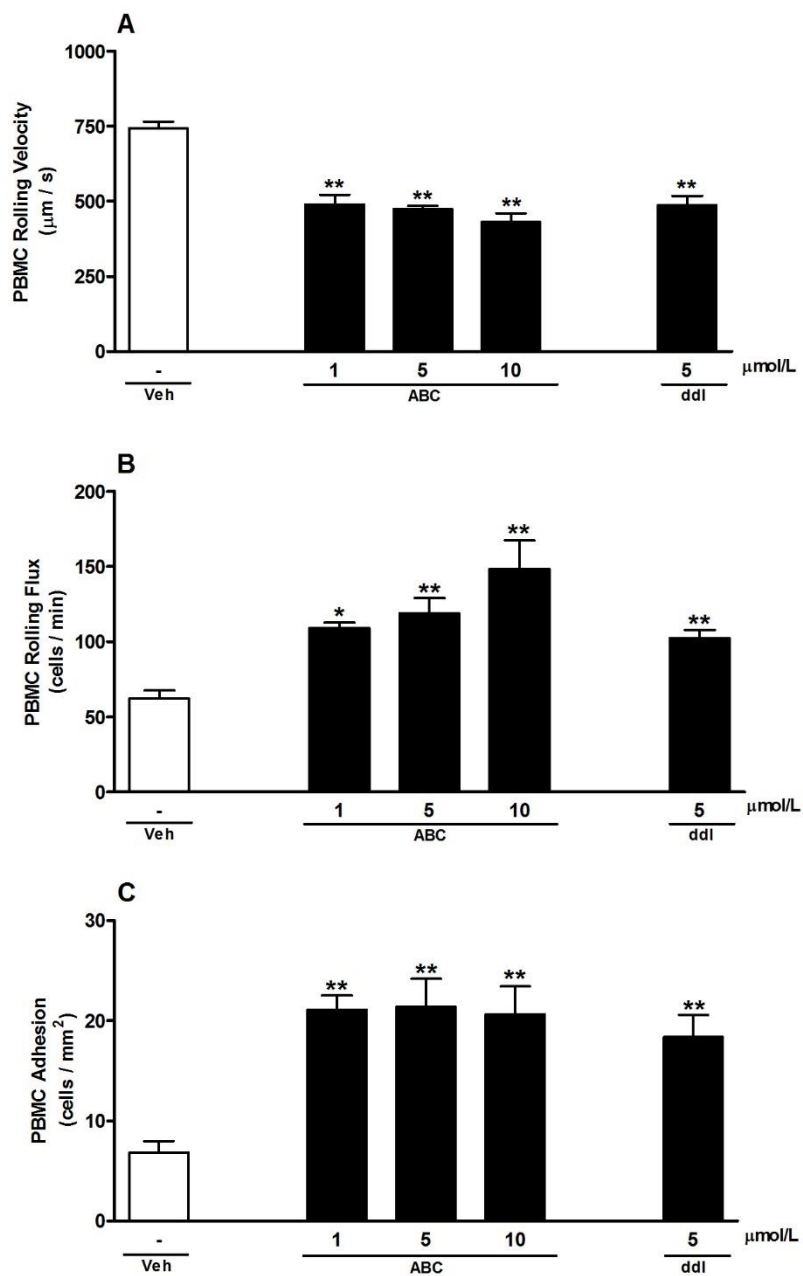


Figure 2



## Supplementary Figure 1



## Supplementary Figure 2

