



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Departamento de Farmacología

**Estudio de la implicación del receptor P2X₇ en
los efectos proinflamatorios de Abacavir**

TESIS DOCTORAL

Víctor Collado Díaz

DIRECTORES

Ángeles Álvarez Ribelles

Juan V. Esplugues Mota

Valencia, Mayo de 2018



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Departamento de Farmacología

Dña. Ángeles Álvarez Ribelles, Personal Investigador Doctor Indefinido del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología 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 presentado por el Licenciado en Farmacia **D. Víctor Collado Díaz** titulado **“Estudio de la implicación del receptor P2X₇ en los efectos proinflamatorios de Abacavir”** 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. Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 22 de Mayo de 2018.

Fdo. Dra. Ángeles Álvarez Ribelles

Fdo. Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

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

PROYECTOS:

- **SAF2010-16030.** Estudio de los mecanismos celulares y vasculares que median la toxicidad vascular por la terapia antirretroviral. Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigadora Principal: Ángeles Álvarez Ribelles.
- **SAF2015-67678-R.** Estudio del mecanismo responsable de la toxicidad vascular de Abacavir: papel del sistema purinérgico sobre la interacción leucocito/endotelio/plaqueta. Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigadores Principales: Juan V. Esplugues Mota y Ángeles Álvarez Ribelles.
- **PROMETEOII/2014/035.** Programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia. Farmacología experimental del tracto digestivo. Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana. Investigador Principal: Juan V. Esplugues Mota.
- **IN-ES-164-1621.** Experimental analysis of the implication of the purinergic system in the vascular actions of abacavir and other purine analogues. GILEAD SCIENCE. Investigadores Principales: Ángeles Álvarez Ribelles y Juan V. Esplugues Mota.

BECAS:

- **ACIF/2015/316.** Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral, Vali+D. Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana.
- **BEFPI/2017/053.** Ayudas para la realización de estancias predoctorales fuera de la Comunidad Valenciana. Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana.
- Beca de Técnico de laboratorio en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).

“He fallado una y otra vez en mi vida, por eso he conseguido el éxito”

“Michael Jordan”

A mi familia

I will never be alone because you are in my soul

AGRADECIMIENTOS

Lo primero agradecer a mis directores de tesis Ángeles Álvarez Ribelles y Juan Vicente Esplugues Mota por confiar en mi para la realización de esta tesis doctoral. Ángeles, por tu guía todos estos años, por tu apoyo, comprensión y toda tu ayuda, especialmente en los momentos más duros. Juan Vicente, por tu confianza y exigencia, por el Valencia Basket y por nuestra primera y no última liga, espero haber aportado científicamente lo mismo que baloncestísticamente.

A mi pajuelo favorito, porque sin tu llamada jamás hubiese llegado aquí y eso se olvida, tuvo que ser difícil ayudar a un flipado así ¿eh, Punset?. A Fer, al puto Fer, porque esta tesis es en parte tuya, y es que detrás de esa barba hay una persona increíble...mente fea. Al retrasado de mi cari, por tus lamentables ganks y porque nadie te tomará el pelo nunca; y a su minion, por todos los escritos por escrotos. Ttxt y olé. A mis madres mexicana (ándale güey) y española, por darme todo vuestro apoyo cuando más lo necesite. A nuestra rubia veintetreinñera. A la exjovenzuela Merystop, Mariparo o María Amparo. A la madre de ratones, porque tu ayuda culmina esta tesis. Al Señor Cosin y sus consejos. A Brian por tu ayuda. A Mamen, mil gracias por todo, espero recompensarte ya que perdí la cuenta de las botellas de vino que te debo. A M^a Ángeles, gracias por tu ayuda y por lograr que me aprenda las concentraciones de memoria. Al resto de jefes y compañeros del departamento durante todos estos años.

To all my labmates in Uli's lab. Thanks Uli, it has been an honor to be a member of your lab. Gracias Monada, por tu ayuda, apoyo y porque jamás encontraré un guía mejor. Gracias Olga, por tu confianza desde el primer momento, por abrirme los ojos, por tu apoyo tanto personal como científico y porque me cuesta imaginar una estancia tan provechosa sin tu ayuda.

M&M, mil gracias, por hacerme sentir como en casa durante 5 meses, por vuestra inestimable ayuda, por el Thortons, por los Ice tea, por las lagunitas IPA, por el funnel, por esos detalles que tuvisteis conmigo y nunca olvidaré, evidentemente.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros de Farmacología en Farmacia, donde empezó esto. Gracias Marisa, por permitirme entrar en este mundo, los comienzos nunca se olvidan. Gracias pichón, te has convertido en un gran amigo y referente científico, eres muy glande. A mis vecinas favoritas por todas nuestras reuniones.

A OCR, por Kaunas, Karlsruhe, Estocolmo, Munich, Sydney, Leonberg, el Puig, Bolsería y Walkabout.

A mis padres y hermano, porque sois el pilar sobre el que me he construido, tanto personal como profesionalmente, porque os necesito siempre y porque es imposible tener una familia mejor. A mis abuelos, a los que están y a los que nos dejaron, mil gracias, para mí siempre seréis inmortales. A mi tía y a mis primos. A mis maestros paellers y reposteros.

A ti, por todo, por darme mucho más de lo que jamás llegué a imaginarme y merecer, por y para siempre.

Y...me voy, aprovechemos que mañana me voy!

ABREVIATURAS

3TC: Lamivudina
ABC: Abacavir
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Adenosina difosfato
AK: Adenilato quinasa
Antagonistas CCR5: Antagonistas del co-receptor CCR5
APCP: α,β -methylene ADP
APV: Amprenavir
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosin trifosfato
ATV: Atazanavir
AZT: Zidovudina
BCA: Ácido bicinconínico
BBG: Brilliant Blue G pure
BSA: Albúmina sérica bovina
cART: Terapia antiretroviral combinada
CBV: Carbovir
CBV-TP: Carbovir trifosfato
CD39: Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa
CD73: Ecto-5'-nucleotidasa
COBI: Cobicistat
CRP: Proteína C reactiva
CX: Conexina
CV: Carga Viral
Da: Diámetro arteriolar
ddC: Zalcitabina
ddl: Didanosina
dGTP: 2'-desoxiguanosina trifosfato
DLV: Delavirdina
DPBS: "Dulbecco's Phosphate Buffered Saline"

ABREVIATURAS

DRV: Darunavir

DTG: Dolutegravir

Dv: Diámetro venular

d4T: Estavudina

E-Ado: 1,N⁶Etheno-adenosin

E-AMP: 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-monofosfato

E-ADP: 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-difosfato

E-ATP: 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-trifosfato

EBM-2: "Endothelial cell basal Medium-2"

ECL: "Enhanced luminol-based chemoluminiscent"

EEM: Error estándar de la media

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

E-NDP-K: Ecto-nucleósido difosfato quinasa

E-NPP: Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa

EFV: Efavirenz

ELV: Elvitegravir

ENF: Enfuvirtida

ERO: Especies reactivas del oxígeno

ESL-1: "E-Selectin Ligand-1"

ETR: Etravirina

EVG: Elvitegravir

Factor Xa: Factor X activado

FECL₃: Cloruro ferrico

FDA: "Food and Drug Administration"

fAPV: Fosamprenavir

FITC: Fluoresceína isotiocianato

FT: Factor Tisular

FTC: Emtricitabina

GA: "Gentamicine sulfate amphotericine B"

GESIDA: Grupo de Estudio de SIDA

gp120: "Glycoprotein 120"

gp150,95: "Integrin Alpha-X"

GP1b α : "Platelet Glycoprotein 1b Alpha"

gp41: "Glycoprotein 41"

HBSS: "Hanks Balanced Salt Solution"

HDL: "High-Density Lipoprotein"

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

HRP: "Horseradish peroxidase"

HSA: "Human Serum Albumin"

HUVEC: "Human Umbilical Vein Endothelial Cell"

ICAM-1: "Intercellular Cell Adhesion Molecule-1"

ICAM-2: "Intercellular Cell Adhesion Molecule-2"

KO: "Knockout"

IDV: Indinavir

IF: Inhibidores de la fusión

IL: Interleucina

INI: Inhibidores de la integrasa

IP: Inhibidores de la proteasa

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

ITINN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

LFA-1: "Lymphocyte-Function-Associated-1"

LPV: Lopinavir

Mac-1: "Macrophage 1 Antigen"

MAdCAM-1: "Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1"

MCP-1: "Monocyte chemotactic protein-1"

MRV: Maraviroc

NF-KB: Factor nuclear kappa B

NFV: Nelfinavir

NVP: Nevirapina

OMS: Organización mundial de la salud

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

PAF: "Platelet Activating Factor"

PAM: Presión arterial media

PANX: Panexina

ABREVIATURAS

- PBMC:** "Peripheral Blood Mononuclear Cell"
- PBS:** "Phosphate buffered saline"
- PE:** Ficoeritrina
- PECAM-1:** "Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1"
- PMN:** "Polymorphonuclear Cell"
- PSGL-1:** "P-Selectin Glycoprotein Ligand-1"
- R3-IGF-1:** "Recombinant long R3 Insuline-like growth factor-1"
- RAL:** Raltegravir
- rhEGF:** "Recombinant human epidermal growth factor"
- RPV:** Rilpivirina
- RTV:** Ritonavir
- SIDA:** Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
- SQV:** Saquinavir
- TAR:** Terapia antiretroviral
- TDF:** Tenofovir
- TNF- α :** "Tumor Necrosis Factor- α "
- TPV:** Tipranavir
- T-20:** Enfuvirtida
- UHPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia
- VCAM-1:** "Vascular Cell Adhesion Molecule-1"
- VEGF:** "Vascular endotelial growth factor"
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana
- VLA-4:** "Very Late Antigen-4"
- Vmean:** Flujo de los eritrocitos
- Vrbc:** Velocidad de los eritrocitos
- vWF:** Factor de von Willebrand
- WT:** "Wild type"
- γ : "Shear Rate"

RESUMEN/ABSTRACT

ABC, inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido (ITIAN), es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento del VIH y se ha asociado con un aumento del riesgo cardiovascular en estos pacientes. Hoy en día existe controversia acerca de esta relación debido a la disparidad de estudios con diferentes conclusiones y a la no existencia de un mecanismo claro de acción que pudiera justificar esta toxicidad vascular.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que Abacavir era capaz de inducir acumulación leucocitaria, primer paso para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio, a través de la interacción entre Mac-1 leucocitaria e ICAM-1 endotelial. Estos efectos fueron reproducidos por otro ITIAN análogo de purina didanosina pero no por los ITIAN análogos de pirimidina, hecho que sugirió una posible relación estructura-actividad en la acción proinflamatoria de ABC que fue demostrada por la implicación del receptor P2X₇. El presente trabajo trata de corroborar la implicación del receptor P2X₇ y, la importancia de su localización, así como el mecanismo de acción mediante el cual ABC activa a dicho receptor P2X₇. Nuestros estudios confirman tanto en modelos in vitro como in vivo que el efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1 se debe a los receptores P2X₇ localizados principalmente en leucocitos.

La activación de este receptor purinérgico P2X₇ de membrana podría deberse a la acción directa de ABC, a la acción del ligando endógeno del receptor P2X₇ (ATP) o a la del CBV-TP que es el metabolito activo de ABC. Estudios de unión al receptor P2X₇ indicaron que ABC no es capaz de unirse al receptor en el sitio de unión del radioligando empleado, mientras que ATP y CBV-TP sí que estarían interaccionando en ese lugar. Tanto ATP como CBV-TP reprodujeron los efectos observados con ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y la sobre la expresión de Mac-1, sin embargo, los efectos de ATP no fueron mediados de forma específica por el receptor P2X₇ mientras que este receptor sí que participó en los efectos de CBV-TP. El hecho de que no se detectaran los niveles necesarios de CBV-TP para producir los efectos evaluados hizo que este ligando fuera descartado como responsable del efecto de ABC.

RESUMEN/ABSTRACT

El ABC no produjo cambios en los niveles de nucleótidos extracelulares (ATP, ADP, AMP, Adenosina) ni afectó al metabolismo de estos nucleótidos ni a la expresión o a la actividad enzimática de las enzimas partícipes en este proceso de degradación. Pero si se encontraron niveles de ATP endógenos en el medio extracelular de células leucocitarias y endoteliales del orden de 50-130 nM.

Por otro lado, la apirasa revirtió los efectos de ABC a pesar de no tener la capacidad de degradar a este fármaco, mientras que sí hidrolizó el ATP, apuntando a ATP como mediador responsable de los efectos proinflamatorios de ABC. Por otro lado, estudios de "docking" demostraron que ABC no es capaz de interactuar con el sitio de unión 1 (sitio de unión del ATP) pero sí que se une al sitio de unión 2. Además, ABC y ATP a concentraciones que por sí solos no producen efectos fueron capaces de producir potenciación del efecto proinflamatorio de ABC, demostrando que ABC modula el receptor P2X₇ de forma alostérica sensibilizando al receptor a la acción del ATP.

Además, el efecto proinflamatorio de ABC fue revertido por el boqueo de los canales de conexina. Este hecho junto con el dato de reducción de los niveles de ATP intracelular por parte de ABC, sugieren que este efecto sería dependiente de los canales de conexina que liberan ATP al exterior de la célula.

En conclusión, el efecto proinflamatorio de ABC se basa en la modulación alostérica del receptor de ATP P2X₇ localizado principalmente en leucocitos por parte de ABC. Este fármaco, a concentraciones clínicamente relevantes, unirse al receptor, sensibilizándolo a la acción del ATP endógeno y favoreciendo también la liberación de ATP a través de los canales de Cx43 presentes en leucocitos. Este ATP actuaría de forma extracelular sobre el propio receptor amplificando el proceso. La activación del receptor P2X₇ da lugar a la sobreexpresión de la integrina β_2 Mac-1 que interactúa con ICAM-1 endotelial provocando la adhesión de los leucocitos al endotelio y dando lugar a uno de los primeros pasos en la generación de un proceso inflamatorio que podría desencadenar efectos adversos vasculares compatibles con la asociación descrita en clínica.

ABC, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), is one of the most commonly used drugs in the treatment of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection and has been related with an increase in cardiovascular risk. There is currently a controversy surrounding the use of ABC due to discrepancies between the results and conclusions of different studies and the lack of a clear mechanism of action that could justify its putative vascular toxicity.

Different studies performed in our laboratory suggest that Abacavir is capable of inducing leukocyte accumulation, the first phase in the development of inflammatory cardiovascular diseases, and that this occurs through interaction between Mac-1 in leukocytes and endothelial ICAM-1. These effects were reproduced by didanosine - another NRTI purine analog - but not by other NRTI pyrimidine analogs, suggesting a structure-activity relationship in the proinflammatory action of ABC, further demonstrated by the implication of the P2X₇ receptor in these effects. The present project aimed to corroborate the implication of the P2X₇ receptor in the events in question, the importance of its location, and the mechanism of action by which ABC activates the receptor. The studies we have performed in “in vitro” and “in vivo” models confirm that the effect of ABC on leukocyte-endothelium interaction and the expression of Mac-1 is due to the P2X₇ receptors located mainly in leukocytes.

The activation of this membrane P2X₇ purinergic receptor could be attributable to the direct action of ABC, the action of the endogenous ligand of the P2X₇ receptor (ATP) or the action of CBV-TP, the active metabolite of ABC. Binding studies of the P2X₇ receptor indicated that ABC is not capable of binding to the receptor at the binding site of the radioligand used, while ATP and CBV-TP do interact at that site. Both ATP and CBV-TP reproduced the effects of ABC on leukocyte-endothelium interaction and Mac-1 expression; however, the effects of ATP were not mediated specifically by the P2X₇ receptor, whereas this receptor did mediate the effects of CBV-TP. The fact that we were not able to detect sufficient levels of CBV-TP to produce the evaluated effects led us to rule out this ligand as responsible for the effect of ABC. We could not exclude a role for ATP, because, although ABC did not produce changes in extracellular nucleotide levels (ATP, ADP, AMP, Adenosine), and affected neither the metabolism of these nucleotides

nor the expression or enzymatic activity of the enzymes involved in this process, we did detect extracellular levels of ATP in our system (50-130 nM).

Apirase (a compound that hydrolyzes ATP) reverted the effects of ABC without degrading it and was able to degrade ATP thus targeting ATP as the ligand responsible for the proinflammatory effects of ABC, raising the possibility that ABC was modulating the P2X₇ receptor allosterically and sensitizing it to ATP. Thus, "docking" studies were performed and showed that ABC was not capable of interacting with binding site 1 (ATP's binding site) but instead binds to binding site 2. Moreover, ABC and ATP, at concentrations that, by themselves, did not have effects, potentiated the proinflammatory effect of ABC, demonstrating that ABC sensitizes the receptor to the action of ATP.

In addition, the proinflammatory effect of ABC was reverted by blocking connexin channels. This fact, together with the data of the intracellular reduction of ATP levels by ABC, suggests that this effect is dependent on connexin channels that release ATP into the extracellular medium.

In conclusion, the proinflammatory effect of ABC is a result of the allosteric modulation of the ATP P2X₇ receptor located mainly in leukocytes. At clinically relevant concentrations, this drug can activate the receptor, sensitizing it to the binding of endogenous ATP and promoting its release through the Cx43 channels present in leukocytes. This ATP acts extracellularly on the receptor itself, amplifying the process. Activation of the P2X₇ receptor leads to overexpression of the β_2 integrin Mac-1, which interacts with endothelial ICAM-1, causing adhesion of leukocytes to the endothelium and leading to an initial phase of the generation of an inflammatory process that can trigger adverse vascular effects compatible with the clinic associations described.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	29
1. VIH, SIDA Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	31
1.1. Generalidades de la infección por VIH.	31
1.2. Ciclo biológico del virus.	32
1.3. Fármacos antirretrovirales	35
1.3.1. Antagonistas del co-receptor CCR5 (antagonistas CCR5).	36
1.3.2. Inhibidores de la fusión (IF).	37
1.3.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN).....	38
1.3.4. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINN).	39
1.3.5. Inhibidores de la integrasa (INI).....	40
1.3.6. Inhibidores de la proteasa (IP).....	41
1.4. Terapia antirretroviral y terapéutica actual.	43
1.5. Efectos adversos generales de la terapia antirretroviral.....	44
1.6. Terapia antirretroviral y enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio.	47
2. PROCESO INFLAMATORIO Y TROMBÓTICO	50
2.1. Generalidades del proceso inflamatorio.....	50
2.2. Proceso Trombótico.....	55
3. PAPEL DEL ATP EN LA INFLAMACIÓN. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y RECEPTORES P2X₇	57
3.1. Señalización purinérgica: ATP y receptores purinérgicos.....	55
3.2. Receptor P2X ₇ . Asociación con inflamación y trombosis.	59
3.3. Estructura del receptor P2X ₇ . Modulación alostérica.	60
3.4. Liberación del ATP al medio extracelular. Canales de conexina y panexina.	62
3.5. Ruta de degradación del ATP.....	64
4. RELACIÓN DE ABC CON RIESGO CARDIOVASCULAR Y SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA ...	66
4.1. ABC.	66
4.1.1. Farmacocinética.....	66
4.1.2. Farmacodinámica.....	67
4.2. Asociación de ABC con riesgo cardiovascular. Posibles mecanismos.....	68
II. OBJETIVOS	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	77
BLOQUE I "IN VITRO"	
1. AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR	79

ÍNDICE

1.1. Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano	79
1.2. Aislamiento de leucocitos.....	79
2. ADHESIÓN DINÁMICA EN CÁMARA PARALELA DE FLUJO.....	82
2.1. Parámetros leucocitarios determinados.	85
2.2. Protocolo experimental de tratamiento.....	86
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	88
3.1. Protocolo experimental.	89
4. CUANTIFICACIÓN DE ABC, CBV-TP Y NUCLEÓTIDOS.	91
4.1. Cuantificación de ABC, ATP y CBV-TP tras tratamiento con apirasa.....	91
5. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS PARTICIPES EN EL METABOLISMO EXTRACELULAR DE NUCLEÓTIDOS	92
5.1. Estudio de la velocidad de degradación del ATP en presencia de ABC.	92
5.2. Análisis de la expresión proteica.	92
5.2.1. Obtención de los extractos proteicos.	93
5.2.2. Cuantificación proteica. Ensayo del ácido bicinconínico (BCA).....	93
5.2.3. Western Blot.	94
5.2.4. Revelado: Detección por quimioluminiscencia.....	94
5.3. Evaluación de la actividad enzimática.	96
6. ESTUDIO DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS	98
6.1. Obtención de membranas	98
6.2. Ensayos de competición.....	98
7. ESTUDIOS DE DOCKING DEL RECEPTOR P2X₇.....	101
7.1. Modelado del receptor.	101
7.2. Modelado de los ligandos estudiados.	104
7.3. Docking.	105
BLOQUE II "IN VIVO"	
1. MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	106
1.1. Modelo de trombosis mediante Cloruro Férrico (FeCl ₃).	108
1.2. Parámetros leucocitarios determinados.	108
1.3. Parámetros hemodinámicos determinados.	108
1.4. Protocolo experimental.....	110
1.5. Medida de las concentraciones plasmáticas de ABC.	111

IV. RESULTADOS	115
BLOQUE I "IN VITRO"	
1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS PRODUCIDOS POR ABC	117
1.1. Efecto sobre la interacción leucocito-endotelio producida por ABC.....	117
1.2. Efecto sobre el aumento de la expresión Mac-1 (CD11b/CD18) en leucocitos humanos producida por ABC.....	119
2. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES P2X₇ IMPLICADOS EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE ABC	121
3. ESTUDIO DE LOS POSIBLES LIGANDOS DEL RECEPTOR P2X₇ RESPONSABLES DEL EFECTO PRODUCIDO POR ABC	126
3.1. Estudios de unión al receptor P2X ₇	128
3.2. Caracterización de los efectos de ATP y CBV-TP.....	128
3.2.1.Efectos de ATP y CBV-TP en la interacción leucocito-endotelio.....	131
3.2.2. Efectos de ATP y CBV-TP sobre la expresión de Mac-1.....	132
3.3. Implicación de los receptores purinérgicos en los efectos producidos por ATP y CBV-TP	132
3.3.1. Interacción leucocito-endotelio.....	132
3.3.1.1. ATP	133
3.3.1.2. CBV-TP	135
3.3.2. Expresión de Mac-1	137
3.3.2.1. ATP	137
3.3.2.2. CBV-TP	138
4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ABC, CBV-TP y ATP	140
4.1. Metabolismo celular de ABC. Cuantificación de CBV y CBV-TP.....	140
4.2. Cuantificación de nucleótidos tras tratamiento con ABC.....	142
4.2.1. Efecto de ABC sobre los niveles de nucleótidos intracelulares.	143
4.2.2. Efecto de ABC sobre los niveles extracelulares de nucleótidos.....	144
5. METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS TRAS TRATAMIENTO CON ABC	145
5.1. Estudio de la velocidad de degradación del ATP tras tratamiento con ABC.	145
5.2. Cuantificación proteica de las enzimas partícipes en la degradación de nucleótidos tras tratamiento con ABC.	146
5.3. Evaluación de la actividad enzimática.	150
6. EFECTO DE LA APIRASA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE ABC, ATP y CBV-TP	153

ÍNDICE

7. ESTUDIOS DE “DOCKING” DEL RECEPTOR P2X₇.....	155
8. MODULACIÓN ALOSTÉRICA DEL RECEPTOR P2X₇. ESTUDIOS DE POTENCIACIÓN.	163
8.1. Efectos sobre la interacción leucocito-endotelio.	163
8.2. Efectos sobre la expresión de Mac-1.....	166
9. IMPLICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓTIDOS EN EL EFECTO DE ABC.	168
9.1. Efecto sobre la interacción leucocito-endotelio.....	168
9.2. Efecto sobre la expresión de Mac-1.	170
BLOQUE II "IN VIVO"	
1. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PURINÉRGICA EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE ABC.	171
V. DISCUSIÓN	177
VIII. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	213
IX. CERTIFICADOS.....	217

I. INTRODUCCIÓN

1. VIH, SIDA Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

1.1. Generalidades de la infección por VIH.

En la década de 1980 se detectaron los primeros casos de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), cuando se diagnosticaron los primeros enfermos de la naciente pandemia, conocida actualmente como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi, 1983).

El VIH (género *Lentivirus*) pertenece a la familia *Retroviridae* y es el causante de la enfermedad del SIDA. Su estructura consta de un virión esférico dotado de una envoltura y una cápside proteica. Su genoma es de tipo cadena de ARN (Ácido Ribonucleico) monocatenario que debe copiarse provisionalmente a ADN (Ácido Desoxirribonucleico) para poder integrarse y multiplicarse en el genoma de la célula hospedadora a la cual infecta.

Se conoce la existencia de dos tipos de VIH -VIH-1 y VIH-2- identificados como agentes causales del SIDA. Los dos poseen la misma estructura genética difiriendo 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, encontrándose especialmente en los países de África occidental (Gilbert et al., 2003, Reeves et al., 2002).

La infección por VIH está asociada a una intensa replicación viral en el organismo humano que tiene lugar principalmente en los linfocitos T CD4+; ocurriendo, 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 y lograr un equilibrio entre la cantidad de virus circulante, conocida como carga viral (CV), y el sistema inmunológico, medido como recuento de linfocitos T CD4+. De este modo, la persona infectada se mantiene asintomática. Pero, pasado un tiempo, se puede romper este equilibrio, aumentando la CV y disminuyendo bruscamente el recuento de linfocitos T CD4+ (Ho et al., 1995, Wei, et al., 1995). En este

INTRODUCCIÓN

punto, se llega a lo que se conoce como fase de SIDA, produciéndose un deterioro inmunológico que permite la aparición de infecciones clásicas y oportunistas (Pantaleo et al., 1996), que pueden causar la muerte de la persona infectada por el VIH y enferma de SIDA.

Actualmente no existe una vacuna para el VIH, por lo que la prevención primaria sigue siendo el mecanismo más eficaz para combatir esta enfermedad. El tratamiento antirretroviral se basa en la inhibición de alguno de los pasos del ciclo biológico del virus, para así evitar la alta tasa de replicación del virus que se da en las células infectadas.

1.2. Ciclo biológico del virus.

El principal lugar de replicación del virus se encuentra en los órganos linfoides, concretamente en los ganglios linfáticos, aunque también se produce en diversos órganos, como el cerebro, el timo o el intestino. El VIH también está presente en muchos líquidos del organismo, como es el caso de la sangre o de las secreciones genitales.

El ciclo biológico del VIH consta de las siguientes fases (**Figura 1**):

- **FIJACIÓN:** la fase inicial de la infección se basa en el reconocimiento mutuo y acoplamiento de las proteínas de la envoltura del virión, las glicoproteínas gp120 y gp41, con los receptores celulares CD4 presentes en linfocitos T (CD4+). Para que se de este reconocimiento se requiere de co-receptores propios de las células susceptibles de ser invadidas: en el caso de los macrófagos son los CCR5, y en el caso de los linfocitos los CXCR4, que interaccionan con las proteínas superficiales del virus. Únicamente van a ser sensibles a la infección aquellas células que expresen estos receptores.
- **FUSIÓN:** consiste en la penetración del virus y la denudación de su cápside, quedando el ARN viral libre en el citoplasma de las células hospedadoras.

- **TRANSCRIPCIÓN INVERSA:** las moléculas de ARNm (Ácido ribonucleico mensajero) viral son empleadas como molde por la enzima transcriptasa inversa, procedente del virión infectante. Así se crea una doble cadena de ADN, la cual es translocada al núcleo de las células hospedadoras.
- **INTEGRACIÓN:** el ADN viral es insertado en el ADN celular de la célula hospedadora mediante la enzima integrasa, que también procede del virión infectante. En este punto, el ADN de la célula se puede replicar de manera masiva (viremias altas), hacerlo de forma controlada (viremias persistentes) o permanecer latente (presencia del virus sin replicación o provirus).
- **TRANSCRIPCIÓN:** como resultado de la transcripción del ADN vírico se va a obtener un ARNm complejo, que debe ser procesado antes de que la información que contiene pueda servir para producir las correspondientes proteínas virales. Una vez procesado, el ARNm puede salir del núcleo hacia el citoplasma a través de los poros nucleares.
- **TRADUCCIÓN:** una vez en el citoplasma, tiene lugar la traducción del ARNm a poliproteínas virales no funcionales a través de los ribosomas.
- **MADURACIÓN Y ENSAMBLAJE:** estas poliproteínas son cortadas en fragmentos y procesadas por la acción de peptidasas específicas del VIH, formando las proteínas constitutivas del virus. Éstas se ensamblan con el ARN proviral, formando los componentes de la estructura del virión, que constituye la cápside y su contenido.
- **LIBERACIÓN:** Por último, se produce la liberación de los nuevos viriones al exterior celular con el fin de infectar nuevas células.

INTRODUCCIÓN

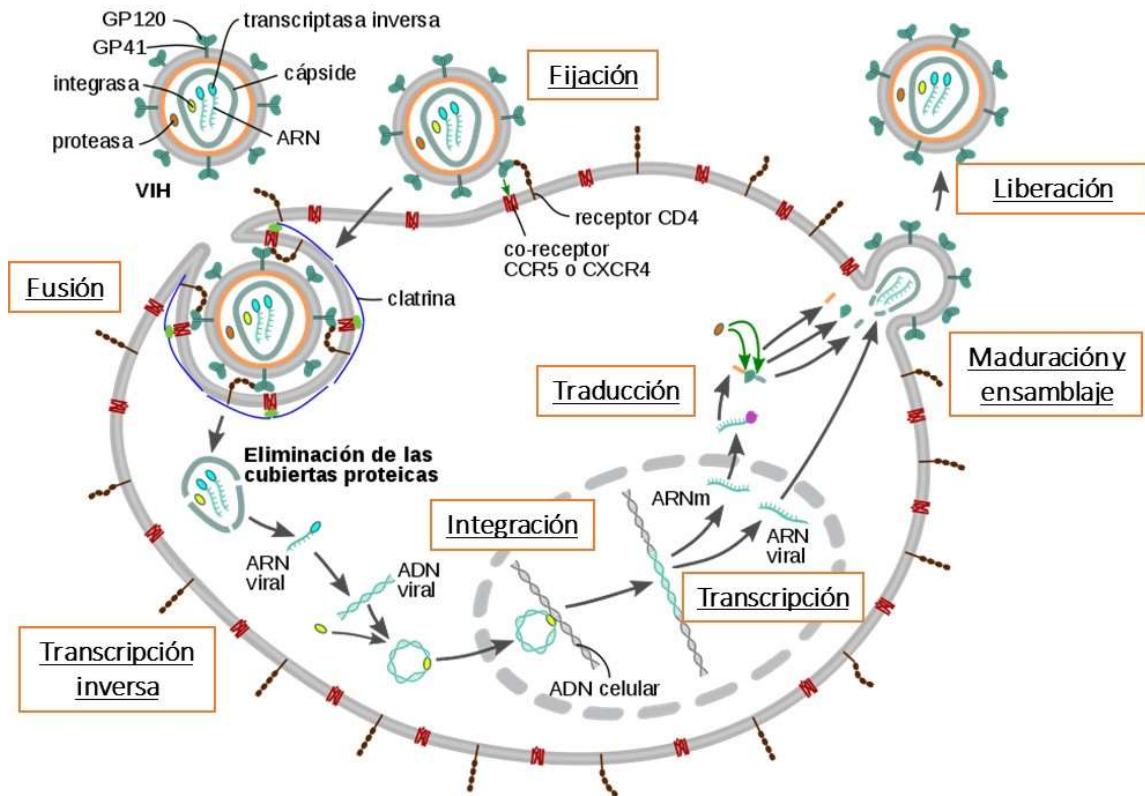


Figura 1. Ciclo vital del VIH. Etapas del ciclo replicativo del ciclo biológico del virus: fijación, fusión, transcripción inversa, integración, transcripción, traducción, maduración y liberación de los nuevos viriones formados.

Previamente se ha comentado que el tratamiento antirretroviral se basa en la inhibición de alguno de los pasos del ciclo biológico del virus, por lo cual, la actuación sobre alguna o varias de estas fases supone el tratamiento actual contra la infección por el VIH y el tratamiento contra el SIDA.

1.3. Fármacos antirretrovirales

Existen en la actualidad gran cantidad de fármacos pertenecientes a este grupo, todos ellos utilizados para el tratamiento de la infección del VIH y de la enfermedad del SIDA.

Estos fármacos surgen en la década de los años 80 cuando se reportan los primeros casos de infección por VIH y su desarrollo se prolonga hasta la actualidad. Estos supusieron un aumento de la esperanza de los pacientes infectados ya que, previo a su desarrollo, sólo existían medicamentos para paliar el deterioro inmunológico y sintomatológico causado por la infección.

Inicialmente, estos fármacos se administraban en monoterapia o en biterapia y poseían una escasa eficacia inhibiendo la replicación viral, por tanto, no suponían una mejora ni del estado de la infección ni de la sintomatología clínica asociada. Fue a partir de 1996, cuando se introdujo la Terapia Antirretroviral Combinada (cART) que consiste en la administración simultánea de varios fármacos antirretrovirales. Esto supuso un gran avance en el tratamiento de la infección del VIH y el desarrollo de SIDA, ya que su empleo continuado permite reducir la CV y recuperar progresivamente el número de linfocitos T CD4+, restaurando con el transcurso del tiempo el sistema inmune del paciente (Mocroft et al., 2003, Panos et al., 2008).

En función de la fase del ciclo biológico del VIH que inhiban se pueden distinguir 6 grupos de fármacos (Imamichi et al., 2004, de Bathune, 2010) (**Figura 2**):

1. **Antagonistas del co-receptor CCR5 (antagonistas CCR5).**
2. **Inhibidores de la fusión (IF).**
3. **Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN).**
4. **Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINN).**
5. **Inhibidores de la integrasa (INI).**
6. **Inhibidores de la proteasa (IP).**

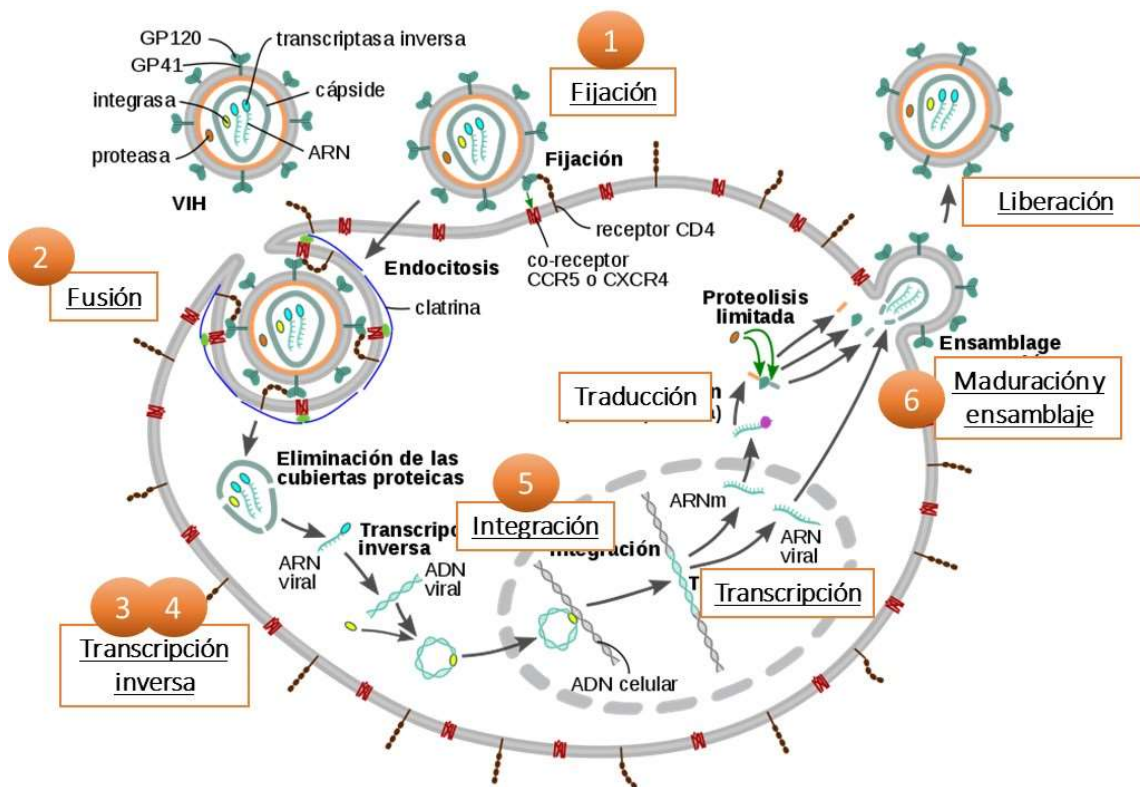


Figura 2. Lugar de acción de los distintos fármacos antirretrovirales. Etapas que inhibe cada uno de los grupos de fármacos antirretrovirales que se usan en la terapéutica actual contra el VIH y el SIDA. **(1)** Antagonistas del co-receptor CCR5 (Antagonistas CCR5), **(2)** Inhibidores de la Fusión (IF), **(3)** Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósi(t)ido (ITIAN), **(4)** Inhibidores de la Transcriptasa Inversa no Análogos de Nucleósido (ITINN), **(5)** Inhibidores de la Integrasa (INI) y **(6)** Inhibidores de la Proteasa (IP).

1.3.1. Antagonistas del co-receptor CCR5 (antagonistas CCR5).

Actúan inhibiendo el co-receptor CCR5 propio de las células a infectar por el virus del VIH (**Figura 2**). Existe un solo fármaco comercializado perteneciente a este grupo, Maraviroc (MRV) (Panel de expertos de GeSIDA 2017, Ribera et al., 2011) (**Figura 3**).

MRV está indicado únicamente para el tratamiento de pacientes infectados por el VIH-1 que presenten un tropismo CCR5, y siempre en combinación con otros fármacos (Perry et al., 2010).

1.3.2. 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 (Kilby et al., 1998) (**Figura 2**).

Únicamente se encuentra disponible comercialmente un fármaco de esta familia, la enfuvirtida (ENF o T-20) (**Figura 3**). Éste se administra por vía subcutánea y necesita ir acompañado de otros antirretrovirales; si no, aparecen rápidamente mutaciones de resistencia debido a su baja barrera genética provocando una pérdida de eficacia. Estos dos factores hacen que hoy en día el uso de este fármaco en la práctica clínica sea muy limitado (Ribera et al., 2011).

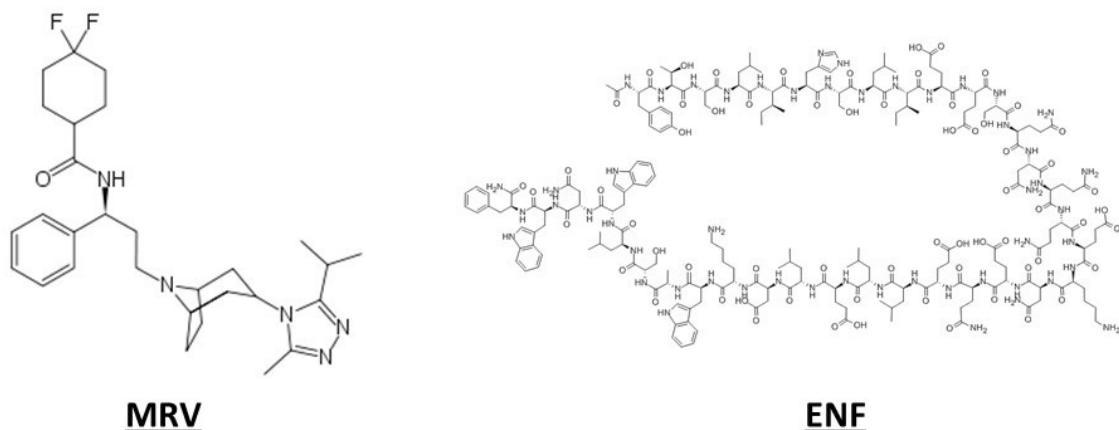


Figura 3. Fármacos antagonistas CCR5 e IF. La figura muestra las estructuras químicas de los distintos antagonistas CCR5 e IF aprobados actualmente para el tratamiento del VIH. Maraviroc (MRC) y Enfuvirtida (ENF).

1.3.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN).

A esta familia pertenece el primer fármaco antirretroviral que se desarrolló. En concreto la zidovudina (AZT) fue la pionera de todos ellos, siendo aprobada por la “Food and Drug Administration” (FDA) para el tratamiento del SIDA en 1987 (Ezzel, 1987).

Estos fármacos actúan inhibiendo de forma competitiva 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**). Esta inhibición se produce 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, se podría decir que los ITIAN actúan de “falsos” nucleósidos, impidiendo la elongación del ADN viral y su replicación (Lewis et al., 2003, Ribera et al., 2011).

Actualmente se encuentran comercializados los siguientes fármacos: Abacavir (ABC), Didanosina (ddI), Tenofovir (TDF), Zidovudina (ZDV), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC) (Günthard et al., 2016; Panel de expertos de GeSIDA 2017; Ribera et al., 2011) (**Figura 4**). Estos se dividen en función de su estructura química, en dos grupos: análogos de bases púricas y análogos de bases pirimidínicas. En el primer grupo se encuentran ddI (análogo de adenosina) y ABC (análogo de guanosina). Dentro del segundo grupo tenemos AZT y d4T que son análogos de timidina y 3TC, FTC y ddC que son análogos de citidina. Todos ellos requieren tres fosforilaciones intracelulares para ser activos, a excepción de TDF. Este fármaco es un análogo de adenina, pero se trata de un nucleótido por lo que sólo requiere de dos fosforilaciones para activarse (Piliro et al., 2004).

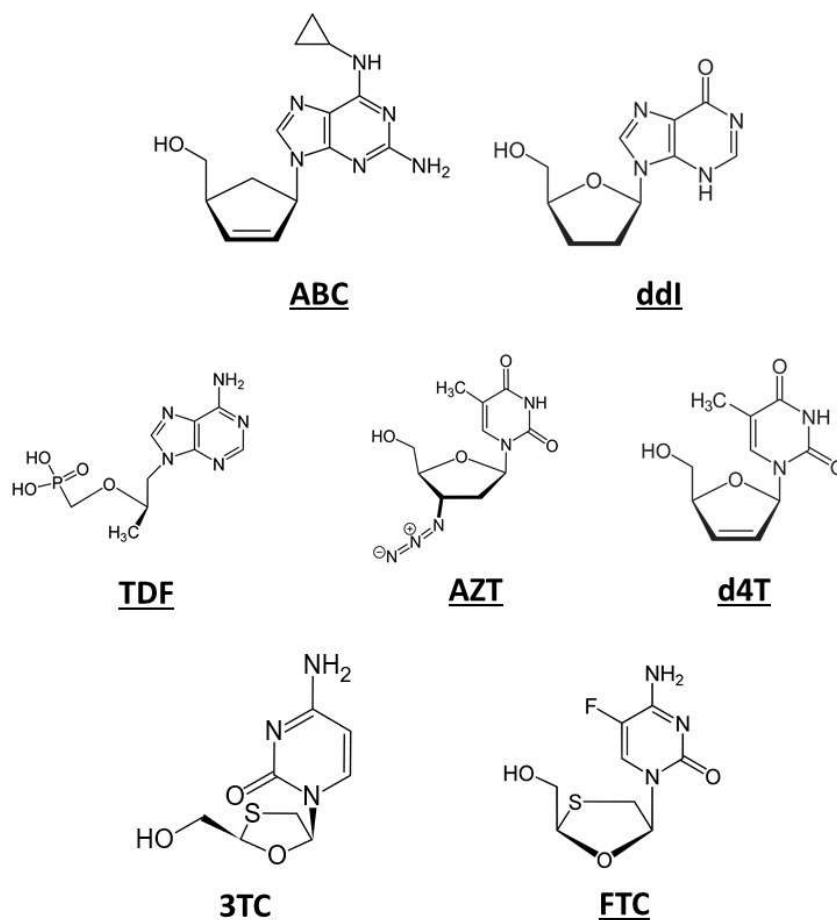


Figura 4. Fármacos ITIAN. Estructuras químicas de los distintos ITIAN aprobados para el tratamiento del VIH. Abacavir (ABC), didanosina (ddl), tenofovir (TDF), zidovudina (AZT), estavadina (d4T), lamivudina (3TC) y emtricitabina (FTC).

1.3.4. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINN).

Estos fármacos, al igual que el de los ITIAN, se caracterizan por inhibir la enzima transcriptasa inversa del VIH, pero en este caso lo hacen por un mecanismo no competitivo (**Figura 2**). Desde el punto de vista de su estructura química constituyen un grupo de fármacos muy heterogéneo. Actualmente existen comercializados cinco ITINN: efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), etravirina (ETR) y delavirdina (DLV) (**Figura 5**).

INTRODUCCIÓN

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 centro catalítico. Esta unión desencadena un cambio conformacional en la transcriptasa inversa, interrumpiendo su actividad DNA polimerasa y por tanto, inhibiendo la replicación viral (Ribera et al., 2011).

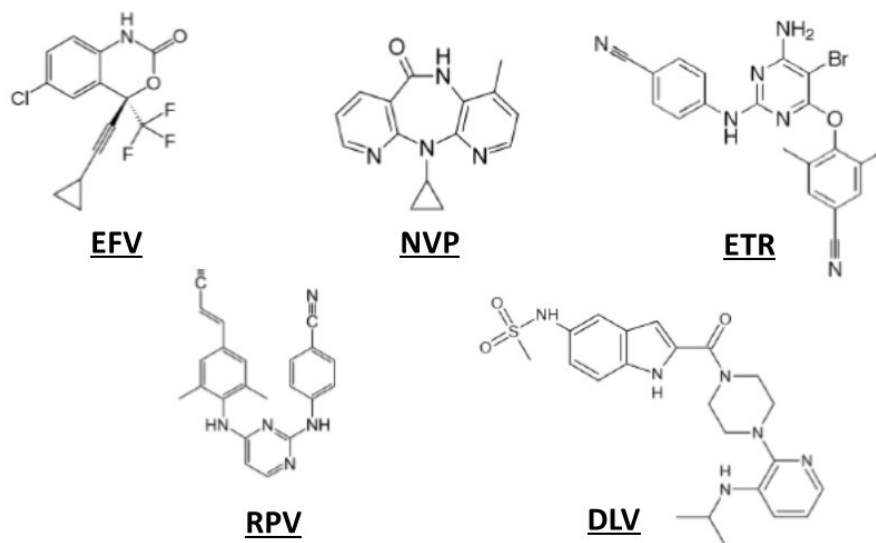


Figura 5. Fármacos ITINN. Estructuras químicas de los distintos ITINAN aprobados para el tratamiento del VIH. Efavirenz (EFV), Etravirina (ETR), Nevirapina (NVP), Etravirina (ETR) y Delavirdina (DLV)

1.3.5. Inhibidores de la integrasa (INI).

En este grupo encontramos al Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG) y Dolutegravir (DTG) (**Figura 6**). Su mecanismo de acción implica el bloqueo de la enzima integrasa impidiendo que el genoma viral se integre en el ADN de la célula hospedadora (**Figura 2**).

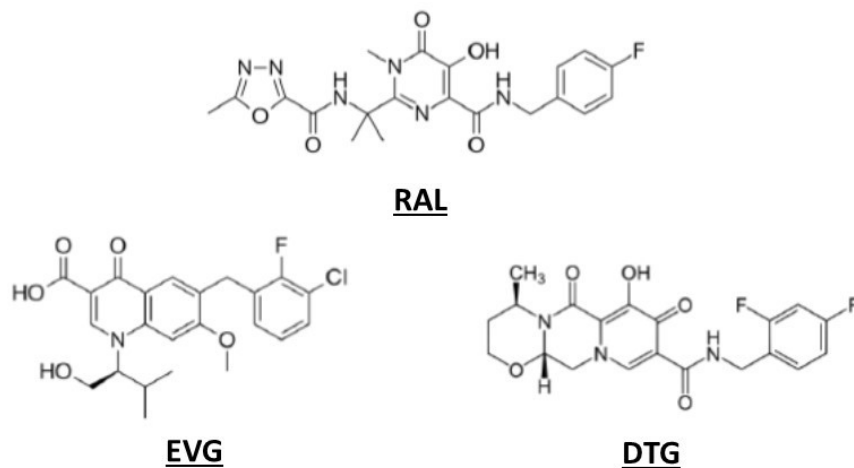


Figura 6. Fármacos INI. Estructuras químicas de los fármacos INI aprobados actualmente para el tratamiento del VIH. Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG) y Dolutegravir (DTG).

1.3.6. Inhibidores de la proteasa (IP).

Este grupo de fármacos actúa inhibiendo las peptidasas del VIH, impidiendo la maduración y el ensamblaje de las proteínas virales, no formándose así los nuevos viriones (**Figura 2**). Existe un gran número de fármacos pertenecientes a este grupo: Lopinavir (LPV), Ritonavir (RTV), Atazanavir (ATV), Indinavir (IDV), Darunavir (DRV), Saquinavir (SQV), Nelfinavir (NFV), Amprenavir (APV), Fosamprenavir (fAPV), Tipranavir (TPV), y Cobicistat (COBI) (Günthard et al., 2016; Panel de expertos de GeSIDA 2017; Ribera et al., 2011) (**Figura 7**).

Se trata de un grupo de fármacos bastante heterogéneo y directamente activos, que no necesitan modificar su estructura para actuar intracelularmente (Ribera et al., 2011). Tienen una estructura similar a los péptidos virales y una gran afinidad por el centro activo de la proteasa. Así, cuando se unen a ésta, la inhiben y no permiten que el VIH forme nuevas proteínas virales funcionales.

Fármacos como LPV, ATV, DRV, SQV, fAPV y TPV se administran en combinación con potenciadores farmacológicos, como RTV y COBI. COBI se utiliza principalmente para potenciar ATV y DRV (Günthard et al., 2016, Panel de expertos de GeSIDA 2017).

INTRODUCCIÓN

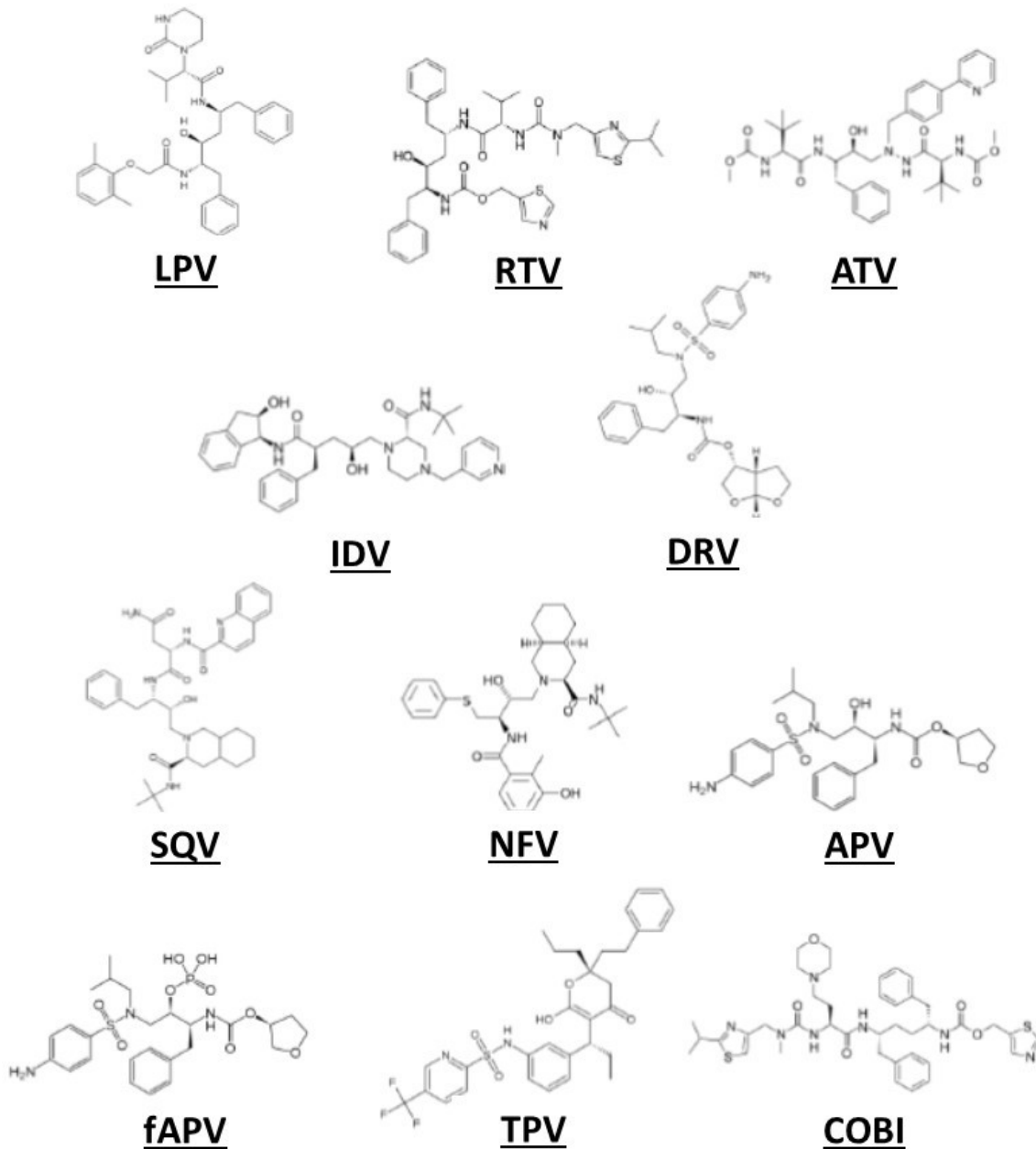


Figura 7. Fármacos IP. Estructuras químicas de los distintos fármacos IP aprobados actualmente para el tratamiento del VIH. Lopinavir (LPV), Ritonavir (RTV), Atazanavir (ATV), Indinavir (IDV), Darunavir (DRV), Saquinavir (SQV), Nelfinavir (NFV), Amprenavir (APV), Fosamprenavir (fAPV), Tipranavir (TPV) y Cobicistat (COBI).

1.4. Terapia antirretroviral y terapéutica actual.

La cART se utiliza para el tratamiento del SIDA, enfermedad causada por el VIH. En la mayoría de los casos consigue suprimir la replicación viral haciendo que sea indetectable, de esta forma se detiene el deterioro del sistema inmunológico recuperando cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune (Palella et al., 1998), permitiendo alargar y mejorar la calidad de vida de estos pacientes al evitar la fase de SIDA. Se recomienda el inicio del tratamiento cuando el recuento de linfocitos T CD4+ se encuentra por debajo de 350 células/ μ L o tras la aparición de síntomas inequívocos de la enfermedad (Mofenson et al., 2009). 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 prolongarse durante toda la vida.

Según datos recogidos en el último informe realizado a finales del 2016 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 a las nuevas infecciones contraídas cada año, al descenso en el número de muertes asociadas al VIH y al incremento en el número de personas que tienen acceso a la cART y por lo tanto a sus efectos beneficiosos los cuales prolongan la vida del enfermo (UNAIDS, 2013). 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.

Las pautas recomendadas para el tratamiento inicial de la infección por el VIH-1 en el momento actual consisten en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociado a un INI, o un ITINN, o un IP potenciado (**Tabla 1**). Con estas combinaciones se puede conseguir una carga viral inferior a 50 copias/mL en más del 80% de los casos a las 48 semanas.

Tabla 1. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendados en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

3er FÁRMACO	PAUTA	ALTERNATIVA
Pautas aplicables a la mayoría de los pacientes		
INI	ABC/3TC+DTG TDF/FTC+DTG TDG/FTC+RAL	ABC/3TC+RAL
Pautas eficaces, pero que no se consideran preferentes		
ITINN	TDF/FTC+RPV	TDF/FTC+LPV/RTV
IP	TDF/FTC+DRV	TDF/FTC+ATV/COBI
INI	TDF/FTC+EVG/COBI	ABC/3TC+RAL
Pautas eficaces, pero de evidencia insuficiente		
INI	ABC/3TC+RAL	
ITINN	TDF/FTC+EVF	ABC/3TC+NVP
IP	ABC/3TC+DRV	ABC/3TC+RAL

Combinaciones de fármacos antirretrovirales empleados en la actualidad en pacientes que inician el tratamiento contra el VIH. Estas recomendaciones son una adaptación de del 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 2017). Tenofovir (TDF), Emtricitabina (FTC), Efavirenz (EFV), Abacavir (ABC), Lamivudina (3TC), Rilpivirina (RPV), Nevirapina (NVP), Atazanavir/Ritonavir (ATV/RTV), Darunavir/Ritonavir (DRV/RTV), Lopinavir/Ritonavir (LPV/RTV), Raltegravir (RAL), Elvitegravir/Cobicistat (EVG/COBI), Dolutegravir (DTG) y Maraviroc (MVC).

1.5. Efectos adversos generales de la terapia antirretroviral.

El desarrollo de la cART se ha producido muy rápidamente, debido a la gravedad de la enfermedad. Este factor junto con el hecho de tratarse de una terapia crónica, con la reducción de la tasa de mortalidad de pacientes tratados con esta terapia o el transcurso del tiempo en la utilización de estos fármacos ha dado lugar a la aparición de efectos adversos asociados.

Como consecuencia, los objetivos actuales de la farmacología de la cART actual se encaminan hacia dos vertientes: por un lado, **buscar las combinaciones de fármacos más eficaces contra la infección de VIH**, para así mejorar la vida de los pacientes con el virus y que han desarrollado SIDA; y por otro, **buscar los mecanismos toxicológicos de**

esta terapia, para minimizar las comorbilidades asociadas a la administración de la terapia, buscando las combinaciones farmacológicas más inocuas para los pacientes.

En función de la cronología con la que aparecen estos efectos adversos, se pueden clasificar en efectos adversos inmediatos o a corto plazo y efectos adversos tardíos o a largo plazo. Los primeros se producen en los primeros días o semanas de tratamiento, mientras que los últimos aparecen al cabo de meses o incluso años después del inicio de éste.

De forma general, a corto plazo, 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.) (Reust et al., 2011). Todos estos efectos se pueden manifestar de forma transitoria.

A largo plazo, los pacientes en tratamiento pueden presentar alteraciones metabólicas, anomalías en la distribución de la grasa corporal y lipodistrofia, daño mitocondrial, nefrotoxicidad e insuficiencia renal y osteopenia, osteoporosis y necrosis ósea aséptica (Reust et al., 2011). 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.

Si bien muchos de estos efectos adversos se dan de manera general en la terapia antirretroviral, muchos de ellos son propios para cada grupo de fármacos, incluso característicos de cada fármaco antirretroviral individual.

Respecto a **MRV** no se han descrito efectos adversos graves, por lo que se considera un fármaco muy seguro (Panel de expertos de GeSIDA 2017).

Entre los efectos adversos de ENF, cabe destacar fatiga, insomnio, náuseas o diarrea, siendo las reacciones adversas en el lugar de inyección del fármaco el efecto

INTRODUCCIÓN

adverso más común (Panel de expertos de GeSIDA 2017, Mirza et al., 2012). Debido a esto, ya que es un fármaco que se administra por vía subcutánea, su uso está relegado a pacientes en los que ha fracasado más de un tratamiento antirretroviral previo.

Entre los efectos adversos del grupo de los **ITINN** cabe destacar el exantema cutáneo por hipersensibilidad y las alteraciones del perfil hepático, apareciendo también otros de menos incidencia o importancia, como es el caso de dislipemia o toxicidad en el Sistema Nervioso Central (Panel de expertos de GeSIDA 2017, Hawkins 2010; Akanbi et al., 2012. Blas-García et al., 2010).

Los efectos adversos asociados al grupo de los **ITIAN** son variados, destacando la toxicidad mitocondrial. Aunque también son muy importantes otros efectos adversos, como la hiperlactatemia y acidosis láctica, pancreatitis, miopatía, neuropatía periférica, mielotoxicidad, hepatotoxicidad, dislipemia y lipodistrofia (Panel de expertos de GeSIDA 2017, Hawkins, 2010, Akanbi et al., 2012). Los ITIAN con menos efectos secundarios son 3TC y FTC, y constituyen, por este motivo, la base de cualquier tratamiento nuevo en la actualidad en la mayoría de los casos.

En el grupo de **INI** destacan el dolor de cabeza, náuseas y diarrea, reacciones cutáneas y rabdomiolisis (Panel de expertos de GeSIDA 2017, Castagna et al., 2014).

Por último, los pacientes bajo tratamiento antirretroviral con el grupo de los IPs pueden desarrollar, principalmente, alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, es decir, dislipemia y lipodistrofia, por un lado, y resistencia a la insulina o hiperglucemia por otro. Cabe también destacar la aparición de dolor de cabeza, náuseas y diarrea, ictericia, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad e hiperbilirrubinemia. (Hawkins et al., 2010, Naggie et al., 2010, Gallant et al., 2013).

1.6. Terapia antirretroviral y enfermedades cardiovasculares con componente inflamatorio.

Como se ha mencionado anteriormente la cART reduce drásticamente la mortalidad asociada al VIH; sin embargo, se ha observado un incremento de enfermedades cardiovasculares (Marteens et al., 2014) junto con un crecimiento de la mortalidad (mayor del 10%) de estos enfermos asociado a estas patologías (Kunisaki et al., 2009), siendo la tercera causa de muerte en estos enfermos en EEUU. Existe un creciente interés en conocer si este aumento del riesgo cardiovascular es propio de la infección VIH, se deba al aumento de la esperanza de vida de estos pacientes junto los factores de riesgo cardiovascular (Colesterol, hipertensión, diabetes y tabaquismo), al tratamiento antirretroviral o a la combinación de todos estos factores.

Está descrito que la infección por VIH está asociada a enfermedades vasculares (Triant et al., 2012) y así, estudios clínicos afirman que los pacientes infectados por este virus poseen un mayor riesgo de padecer enfermedad prematura de arterias coronarias (Acevedo et al., 2002), aumento de la frecuencia de hipertensión pulmonar, así como una mayor tasa de accidentes cerebrovasculares isquémicos (Pelicelli et al., 2001). Además, se ha observado formación de depósitos de Ca^{2+} arteriales y presencia de anormalidades en el músculo liso y en el endotelio de vasos pulmonares inducidas por citoquinas proinflamatorias en estos pacientes (Acevedo et al., 2002).

Se sabe que la infección por VIH produce una respuesta inflamatoria endotelial, debido a que el virus 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 desencadenar finalmente miocardiopatías y alteraciones de la barrera hematoencefálica respectivamente (Zietz et al., 1996). Asimismo, en pacientes infectados por VIH se han encontrado alteraciones endoteliales e incrementos en la acumulación de leucocitos humanos (principalmente monocitos) en el endotelio aórtico, así como incrementos en los niveles de diversas citoquinas proinflamatorias [factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina-1 β (IL-1 β) e interleuquina-6 (IL-6), de

INTRODUCCIÓN

moléculas solubles [factor de von Willebrand (vWF), 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)] (De Larranaga et al., 2003).

Además, también hay estudios que relacionan a la terapia antirretroviral con un aumento del riesgo cardiovascular. Así, la incidencia relativa de padecer 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 (Friis-Moller et al., 2003). Adicionalmente, en un estudio realizado en el año 2002 se observó que el 75 % de los pacientes infectados por VIH bajo tratamiento con cART mostraban depósitos de Ca^{2+} a nivel arterial, indicativo de la formación de la placa aterosclerótica (Acevedo et al., 2002). La terapia antirretroviral se cree 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 la explicación 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 y a que causan un aumento en el riesgo de sufrir infarto de miocardio (Carr et al., 1999, Klein 2007). Sin embargo, no se puede descartar al grupo de los ITIAN ya que se encuentran en todas las modalidades terapéuticas de la cART y se administran en combinación con el grupo de los IP, ITINN o incluso con los INI.

Una de las grandes controversias en el área de la terapia antirretroviral es la asociación de los ITIAN, en concreto ABC, con el riesgo de enfermedad cardiovascular, encontrando numerosos estudios que avalan esta asociación y otros que la rebaten (Álvarez et al., 2017). La primera evidencia de la asociación entre ABC y riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), concretamente de infarto de miocardio, apareció en 2005 en un informe del Programa de Vigilancia Farmacéutica Internacional emitido por

la OMS (Sanz et al., 2005). En 2008 un estudio prospectivo multi-cohorte del grupo D:A:D (del inglés *Data Collection on Adverse events of Anti-HIV Drugs Study Group*) con personas infectadas con VIH reafirmó las bases para la vinculación entre la terapia con ABC y el mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio (Sabin et al., 2008). Estudios posteriores confirmaron esta relación; unos demostrando que existe un aumento del riesgo de padecer infarto de miocardio en un 90% en pacientes tratados con ABC y en un 49% en pacientes tratados con ddi respecto a pacientes tratados con otros ITIAN (Worm et al., 2010), y otros confirmando que el riesgo de sufrir infarto de miocardio se duplica tras el tratamiento con ABC (Obel et al., 2010). En el estudio D:A:D de 2010 se corroboró que estos efectos son reproducidos por otro ITIAN ddi, no hallándose estas asociaciones con el uso de AZT, d4T o 3TC -todos ellos también de tipo ITIAN, (Lewis et al., 2003)-; más recientemente, en 2016, otra cohorte del mismo grupo de estudio lo reafirmó con mayor evidencia que en el primero (Lang et al., 2010; Ribera et al., 2011). Sin embargo, otros estudios concluyeron que no hay relación alguna entre el uso de ABC y la aparición del infarto de miocardio (RR ABC = 2.09/1000/año vs. RR no ABC = 2.57/1000/año) (Brothers et al., 2009, Bedimo et al., 2011, Cutrell et al., 2008).

2. PROCESO INFLAMATORIO Y TROMBÓTICO.

2.1. Generalidades del proceso inflamatorio.

Se entiende como proceso inflamatorio a la respuesta biológica y que surge con el fin defensivo de aislar y destruir a un agente dañino, así como para reparar el tejido u órgano dañado. Este proceso consiste, en su primera fase, en la interacción de las células leucocitarias que circulan por el torrente sanguíneo con las células endoteliales que rodean la zona luminal del vaso sanguíneo implicado (Galkina et al., 2009, Carlos et al., 1994). Por tanto, en este mecanismo, juegan un papel importante tanto el endotelio vascular como las células leucocitarias.

El **endotelio vascular** es un órgano altamente especializado y metabólicamente muy activo, que regula multitud de funciones vasculares. Está formado por una monocapa continua de células endoteliales que separa la sangre del tejido subendotelial. De esta forma cuando el endotelio es dañado, se genera una respuesta inflamatoria localizada, que controla el ingreso de las células y mediadores inflamatorios al lugar dañado mediante la regulación de las propiedades adhesivas de las células partícipes.

Los **leucocitos** son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, formando parte de los mecanismos de defensa del organismo frente a sustancias patógenas. Estas células se mueven por la sangre libremente mediante pseudópodos. Frente a un estímulo inflamatorio, pueden salir de los vasos sanguíneos mediante un proceso conocido como diapédesis, prolongando su contenido citoplasmático. Esto les va a permitir poder tener contacto con diferentes tejidos u órganos donde van a ejercer sus funciones.

Existen multitud de patologías en las cuales existe un proceso inflamatorio asociado, como aterosclerosis, infarto de miocardio o procesos isquémicos. Éstas se caracterizan por una acumulación excesiva de células leucocitarias en el endotelio vascular, acumulación mediada por moléculas de adhesión presentes en las células leucocitarias y sus ligandos expresados en el endotelio vascular. Este proceso puede desencadenar la extravasación de los leucocitos hasta el foco inflamatorio (Van Buul et

al., 200; Carman et al., 2008) y puede ser producido por gran variedad de estímulos diferentes (Galkina et al., 2009; Van Buul et al., 2004).

2.2. Interacción leucocito-endotelio.

La interacción leucocito-endotelio está mediada por una cascada secuencial de reacciones reversibles entre ambos tipos celulares (Brown et al., 1997), entre las que se distinguen las siguientes fases (**Figura 8**):

El primer paso en la interacción entre los leucocitos con el endotelio se conoce como **rodamiento leucocitario**, y se caracteriza por una deceleración en el tránsito de los leucocitos (**Figura 8**). Este proceso se inicia debido a una liberación de mediadores generados en respuesta a un daño producido sobre los leucocitos o el endotelio que produce una activación de uno de estos tipos celulares o de ambos, un enlentecimiento de la velocidad de los leucocitos y por consiguiente un mayor contacto con el endotelio vascular (McEver et al., 2010, Brown et al., 1997, Ley et al., 2007). En este proceso participan fundamentalmente las moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las Selectinas (L-Selectina, P-selectina y E-selectina) (**Figura 9**).

Las selectinas, son glicoproteínas transmembrana tipo I. La L-Selectina se expresa constitutivamente en la mayoría de los leucocitos e interacciona con sus ligandos en las células endoteliales, como es el caso de PSGL-1("P-selectin Glycoco-protein Ligand-1"), mucinas y otros ligandos glicosilados, desprendiéndose de la superficie tras la activación leucocitaria (Brown et al., 1997, Alon et al., 1995). Por otro lado, P-selectina y E-selectina, se expresan en células endoteliales activadas interaccionando con sus ligandos presentes en el leucocito, que pueden ser PSGL-1, CD44, ESL-1 ("E-Selectin Ligand-1") y otros ligandos glicosilados (Brown et al., 1997, Alon et al., 1995). Además, P-selectina también se expresa en gránulos intracitoplasmáticos de plaquetas, y al activarse la plaqueta es traslocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos tanto en el endotelio como en los leucocitos (Brown et al., 1997, Alon et al., 1995).

INTRODUCCIÓN

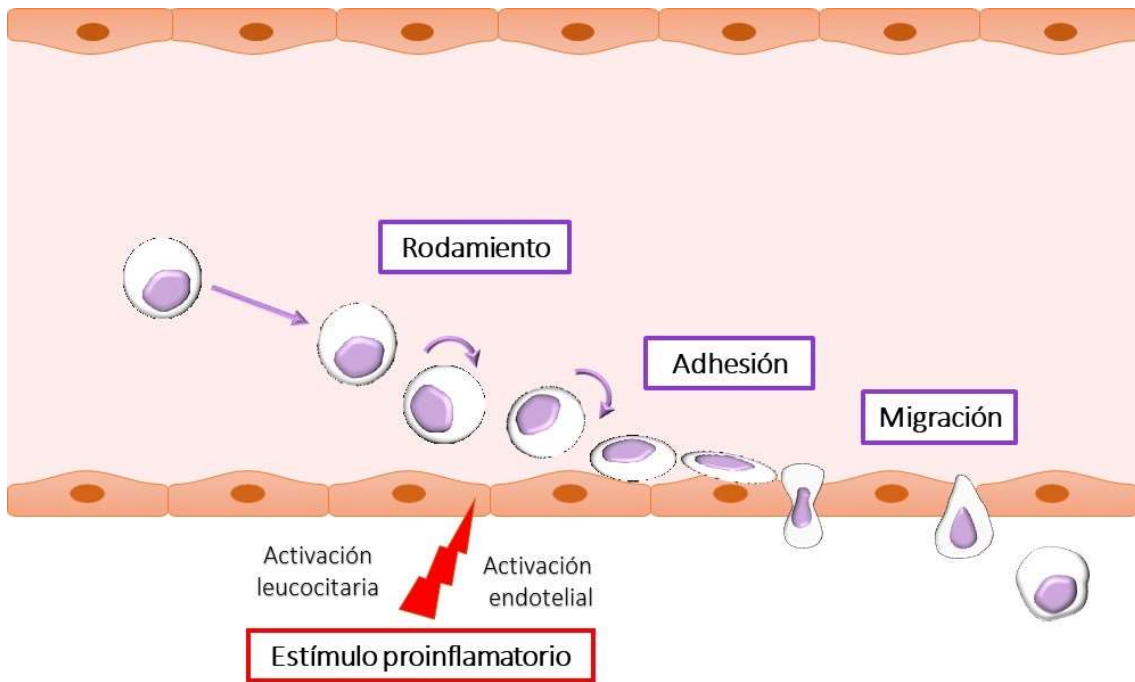


Figura 8. Etapas del proceso de interacción leucocito-endothelium. Se observan las fases de rodamiento, adhesión y migración leucocitaria.

Además, también están implicadas en el rodamiento leucocitario las integrinas $\alpha_4\beta_1$ ó VLA-4 (“Very Late Antigen-4”) y la integrina $\alpha_4\beta_7$, mediando dicho proceso en eosinófilos y linfocitos, respectivamente (Brown et al., 1997; Alon et al., 1995). Estas moléculas de adhesión se expresan en las células leucocitarias e interaccionan con sus ligandos endoteliales VCAM-1 y MAdCAM-1 (“Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1”).

Últimamente, y cada vez con más fuerza, se está relacionando a las Integrinas β_2 como participantes de este proceso de rodamiento leucocitario, describiéndose que LFA-1 (“Lymphocyte-Function-Associated-1”) y Mac-1 (“Macrophage 1 Antigen”) poseen un papel fundamental en dicho proceso (McEver et al., 2010, Ley et al., 2007).

Las Integrinas β_2 son una familia de moléculas de adhesión leucocitarias que comparten la misma subunidad común β CD18 y poseen una cadena α CD11 diferente. Son moléculas que regulan sus propiedades adhesivas mediante cambios conformacionales. De esta forma pueden existir en tres estados conformacionales que condicionan su afinidad por sus diferentes ligandos (McEver et al., 2010, Ley et al., 2007).

- **Baja afinidad:** constitutivamente las integrinas se encuentran inactivadas y no van a producir adhesión firme con las células endoteliales, aunque los ligandos de estas moléculas de adhesión se encuentren expresados en el endotelio. En este caso, las Integrinas van a tener una conformación curvada o doblada “bent” y el casco o “headpiece” cerrado.
- **Media afinidad:** tras una activación por Selectinas o por diferentes factores quimiotácticos pasan a una conformación extendida, pero continuando con el casco cerrado.
- **Alta afinidad:** si el estímulo sigue persistiendo y amplificándose, va aumentando la afinidad de las Integrinas por sus ligandos endoteliales. Esto es debido a que estas moléculas de adhesión mantienen su conformación extendida y se produce la apertura del casco.

Esta familia incluye 4 tipos conocidos de integrinas β_2 : α L (CD11a, LFA-1), α M (CD11b, Mac-1), α X (CD11c, gp150,95) y α D (CD11d) (Carlos et al., 1994). La expresión de CD11b en linfocitos es limitada, sin embargo, estas moléculas son movilizadas de vesículas secretoras intracelulares a la superficie de neutrófilos y monocitos tras pocos minutos de estimulación (Carlos et al., 1994).

Una vez los leucocitos establecen contacto con el endotelio, y siempre y cuando el estímulo inflamatorio persista, se pasa a la etapa de **adhesión**, donde los leucocitos en fase de rodamiento activados se adhieren firmemente al endotelio vascular (**Figura 8**).

En este proceso van a participar, mayoritariamente, las integrinas α_4 (VLA-4 y $\alpha_4\beta_7$) que interaccionan principalmente con VCAM-1 y MAdCAM-1 y las Integrinas β_2 Mac-1, LFA-1 y gp150,95 que interaccionan en mayor medida con ICAM-1 (Ley et al., 2007). A nivel endotelial, los ligandos de estas integrinas van a aumentar su expresión cuando el endotelio se active, aunque estas moléculas se encuentran expresadas de forma constitutiva en el endotelio y pueden interaccionar con sus ligandos leucocitarios sin que se produzca una activación endotelial previa. Tras producirse la unión, las integrinas van a generar multitud de señales intracelulares que van a iniciar gran cantidad de rutas de señalización celular, que conllevarán a una fase de post-adhesión

INTRODUCCIÓN

y estabilización, llegando a la fase conocida como fortalecimiento de la adhesión (Ley et al., 2007).

Por último, tras adherirse los leucocitos al endotelio, llega la etapa de **migración**. Este último paso también necesita 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 movilizan 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 (Ley et al., 2007). Los leucocitos atraviesan los espacios intercelulares a través de las uniones presentes entre las células endoteliales y a través de la membrana basal perivascular (Springer et al., 1994). Este proceso va a suponer una alteración mínima de la estructura de la pared vascular (Ley et al., 2007, Springer et al., 1994).

En este proceso de extravasación leucocitaria va a tener mucha importancia el complejo formado por Mac-1/ICAM-1 (Carlos et al., 1994, Ley et al., 2007, Sadhu et al., 2007) (**Figura 9**).

Otra molécula relevante es "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1" [PECAM-1 (CD31)], la cual presenta niveles elevados en las uniones entre células que 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.

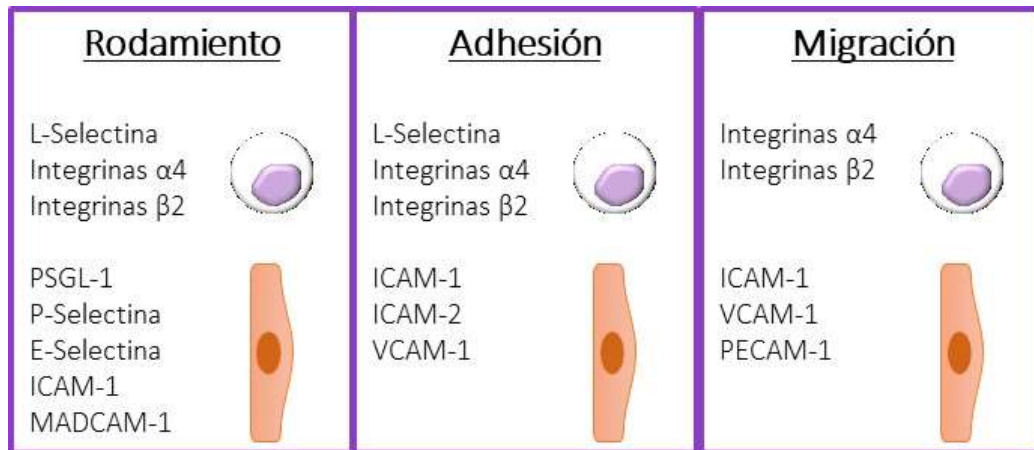


Figura 9. Etapas en el proceso de interacción leucocito-endotelio y principales moléculas de adhesión implicadas en cada una de ellas. En la figura se pueden observar las fases de rodamiento, adhesión y migración leucocitaria y las principales moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales implicadas en cada etapa del proceso.

Frente a esta situación, los leucocitos activados migran a través de la barrera endotelial y posteriormente atraviesan la matriz extracelular para así llegar al lugar donde se haya producido la inflamación, lugar en el que realizarán su función (Van Buul et al., 2004, Ley et al., 2007).

Los leucocitos también expresan otras integrinas β_1 y β_3 , aunque en niveles mucho más bajos. Estas moléculas de adhesión se van a unir a proteínas de la matriz extracelular, como por ejemplo Laminina, Fribronectina o Vitronectina.

2.2. Proceso trombótico.

La trombosis es la formación de un coágulo en el interior de un vaso sanguíneo que puede dar lugar a un infarto de miocardio. El coágulo y el trombo se forman exactamente de la misma manera; sin embargo, la formación del coágulo es una respuesta homeostática de altísimo valor biológico (evitar la muerte del individuo por hemorragia), mientras que la formación de un trombo hace referencia siempre a un estado patológico. Tras una lesión vascular, el coágulo se forma sin llegar a obstruir el vaso ni extenderse, manteniéndose en el sitio hasta ser reemplazado por tejido conectivo, estando por tanto regulado en tiempo y espacio; mientras que un trombo es

INTRODUCCIÓN

un coágulo que se forma en el lugar y tiempo equivocados dando lugar a manifestaciones clínicas de diversa gravedad y naturaleza en función del vaso obstruido.

Si un estímulo proinflamatorio persiste, se podría llegar a la trombosis y a la formación de la placa aterosclerótica (Jackson, 2011). El proceso inflamatorio vascular implica la acumulación de leucocitos y plaquetas en la pared de los vasos como consecuencia de la interacción entre las moléculas de adhesión. En una primera fase los leucocitos ruedan a lo largo de la pared de los vasos inflamados antes de detenerse, después de lo cual se adhieren y transmigran. Pero un proceso trombótico va a implicar a las plaquetas, así, en una segunda fase las plaquetas se unen al endotelio y reclutan a otras plaquetas y leucocitos en circulación, amplificando el proceso aterotrombótico (ley et al., 2007). Por un lado, la interacción con endotelio vascular se produce a través de P-selectina y E-selectina. Está demostrado que P-selectina media la adhesión de las plaquetas al endotelio venular y arterial en procesos inflamatorios agudos (Gawaz et al., 2005). Por otro lado, la unión de las plaquetas con los leucocitos se produce mediante la interacción de P-selectina y PSGL-1 leucocitaria, unión que se estabiliza gracias a la interacción entre GPIb α plaquetaria y Mac-1 leucocitaria (Projahn et al., 2012).

3. PAPEL DEL ATP EN LA INFLAMACIÓN. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y RECEPTORES P2X₇.

La inflamación engloba un complejo mecanismo que permite detectar y eliminar los antígenos dañinos. Mientras que generalmente son los mediadores extracelulares los que inician la respuesta inmune, en determinadas ocasiones, moléculas constitutivas intracelulares implicadas en distintos procesos fisiológicos como el ATP y distintos nucleótidos derivados de purina y pirimidina pueden ser liberadas al espacio extracelular regulando la respuesta inflamatoria en situaciones patológicas (Lotze et al., 2007, Khakh et al., 2006).

El ATP a nivel intracelular tiene un papel fundamental en el metabolismo energético, pero además se distribuye en el espacio extracelular (niveles basales entre 10-100 nM) participando en multitud de procesos fisiológicos como quimiotaxis, activación de células inmunitarias inflamatorias, migración, proliferación y liberación de mediadores proinflamatorios (Di Virgilio et al., 2001). El ATP puede ser liberado por mecanismos de transporte entre células inmunitarias en condiciones fisiológicas o durante la inflamación (Junger et al., 2011). Además, durante un estado proinflamatorio el ATP puede ser liberado de forma pasiva por muerte celular, activación celular o a través de gránulos como ocurre en plaquetas.

3.1. Señalización purinérgica: ATP y receptores purinérgicos.

Los nucleótidos desempeñan funciones fundamentales en el metabolismo intracelular, pero también son potentes mensajeros extracelulares. Así, el concepto de vía de señalización purinérgica hace referencia al sistema de señalización extracelular que emplea a los nucleótidos o nucleósidos de purina como mensajeros (Yegutkin, 2008).

El ATP y otros nucleótidos/nucleósidos (ADP, UTP, UDP) tienen un papel muy establecido en la señalización celular de varios tejidos, incluyendo la neurotransmisión del sistema nervioso central, la contractilidad no-adrenérgica no-colinérgica del músculo

INTRODUCCIÓN

liso, efectos inotrópicos, cronotrópicos y arritmogénicos en el miocardio, la función gastrointestinal y hepática, la regulación de 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, todos ellos constituirían eventos de señalización aguda. Por otro lado, pueden presentar funciones a largo plazo, interviniendo 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 (Yegutkin, 2008, Bours et al., 2006).

El ATP extracelular y el resto de nucleótidos ejercen su función a través de una serie de receptores selectivos de nucleótidos. Estos receptores se subdividen en dos familias: P2X y P2Y (**Figura 10**). Los receptores P2X engloban siete subtipos de receptores (P2X₁-P2X₇), siendo todos ellos trímeros que actúan como canales iónicos activados por ligando. La unión del ATP a estos receptores da lugar a un cambio conformacional del canal provocando su apertura y la entrada de cationes al interior celular. El flujo de cationes (Ca²⁺, Na⁺ y Mg²⁺ principalmente) produce una despolarización que conlleva al inicio de la señalización purinérgica. Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G. La unión del ATP a este tipo de receptores induce su cambio conformacional y a diferencia de los receptores P2X, se produce la activación de proteínas G que inician la ruta de señalización de las purinas. Estos se dividen en dos subfamilias, por un lado, los P2Y acoplados a proteína G_q que activan la enzima fosfolipasa C-β (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) y por otro lado los P2Y acoplados a proteínas G_i que inhiben la enzima adenilato ciclasa y regulan canales iónicos (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) (Yegutkin, 2008). Por último, encontramos los receptores P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃), sobre este tipo de receptores actúa la adenosina y no otras purinas endógenas (**Figura 10**). Los Receptores Purinérgicos P1 están diseminados en todo el cuerpo incluyendo los sistemas cardiovascular, respiratorio, inmune y nervioso y ejercen un efecto antiinflamatorio (**Figura 10**).

Ya sea en condiciones constitutivas o proinflamatorias, los receptores P2 se encuentran expresados en una gran variedad de tipos celulares, incluidas las células del sistema inmune (Jarvis et al., 2009, Burnstock et al., 2004). Aunque estos receptores se

encuentran implicados en una gran cantidad de procesos inflamatorios, los mecanismos que los involucran son complejos y no están completamente dilucidados (Burnstock et al., 2017).

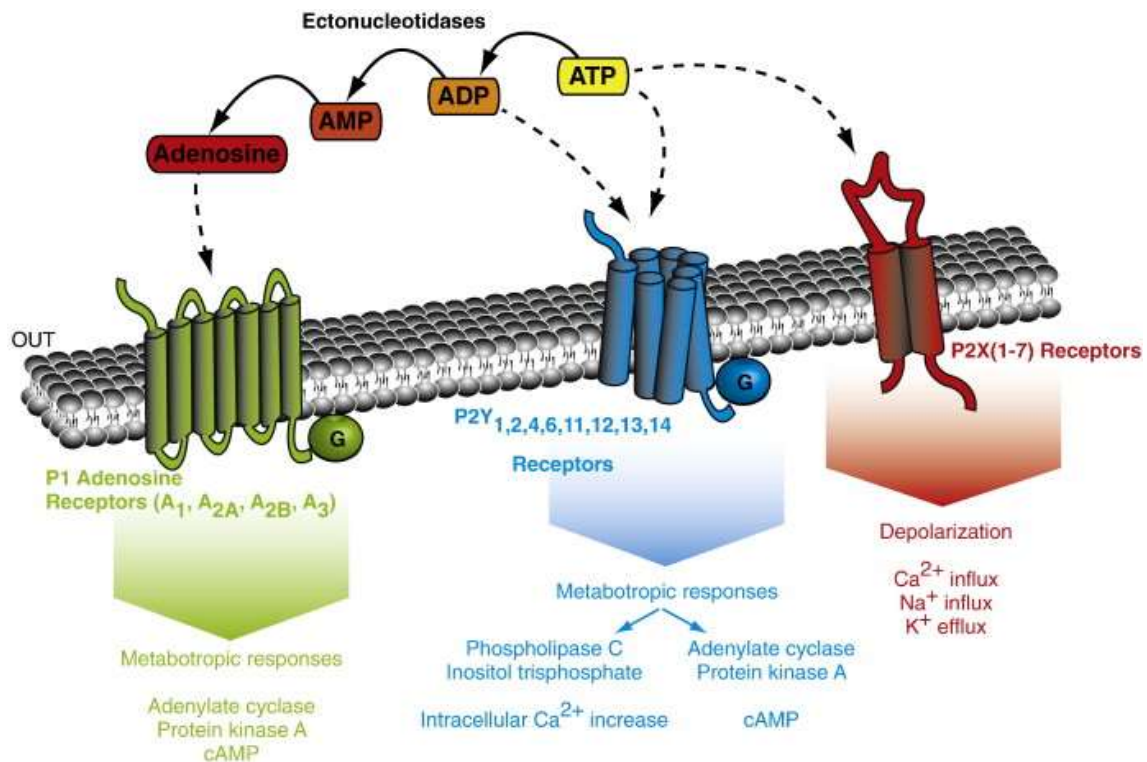


Figura 10. Familia de receptores purinérgicos. El ATP extracelular es el agonista de los receptores P2X y P2Y, así como sustrato para las ectonucleotidasas que degradan el ATP y generan ADP, el cual actúa también a través de los receptores P2Y. La adenosina es el producto final que actúa sobre los receptores P1 (Ilustración adaptada de Baroja-Mazo A et al., 2012).

3.2. Receptor P2X₇. Asociación con inflamación y trombosis.

El receptor P2X₇ ha sido el último en identificarse de la familia P2X. En un principio se describió como P2Z debido a que presenta distintas características a los receptores P2X y P2Y, por ejemplo, requiere de una concentración inusualmente alta para ser inicialmente activado ($\geq 1\text{mM}$) y su activación prolongada por ATP provoca la apertura de un poro de membrana que permite la entrada de moléculas de alto peso molecular ($\geq 900\text{ Da}$).

Numerosos estudios señalan a los receptores P2X₇ como los principales responsables de promover el proceso inflamatorio. Concretamente la unión ATP-P2X₇

INTRODUCCIÓN

induce una activación del NALP3 inflamasoma que activa a la enzima caspasa-1 que finalmente promueve la maduración de la citoquina proinflamatoria IL-1 β (Bours et al., 2006, Bours et al., 2011). Estos receptores también favorecen la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la transcripción del factor nuclear kappa B (NF- κ B) al núcleo (Bours et al., 2006, Bours et al., 2011, Cruz et al., 2007); así como la producción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-8, “Monocyte chemotactic protein-1” (MCP-1) y TNF- α (Bours et al., 2011, Cruz et al., 2007); y la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina, y leucocitarias como Mac-1 (Bours et al., 2006). Todos estos factores favorecen en última instancia el reclutamiento de leucocitos (Bours et al., 2011).

Además, se ha relacionado al receptor P2X₇ con la génesis de los procesos trombóticos. Estudios “in vivo” han demostrado el papel de los receptores P2X₇ en la formación del trombo en arteria carótida (Furlan et al., 2011). Además, se ha visto que después de la estimulación del receptor en macrófagos se genera a través de micropartículas la liberación de factor tisular (FT), cofactor encargado de iniciar el proceso trombótico englobando la activación del inflamasoma por parte del endotelio (Hechler et al., 2015).

3.3. Estructura del receptor P2X₇. Modulación alostérica.

El estudio de la estructura de este receptor está en auge hoy en día debido a su importancia en situaciones patológicas. A partir de la estructura del receptor P2X₄ en peces cebra (zrP2X₄) se han construido modelos homólogos del receptor P2X₇ que permiten estudiar su activación y modulación (Browne et al., 2010, Di Virgilio et al., 2018).

Los receptores purinérgicos P2X₇ se encuentran ampliamente distribuidos por todo tipo de células, destacando tejido hematopoyético y células como monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, eritrocitos, osteoclastos, mastocitos y eosinófilos (Burnstock et al., 2018). Los receptores P2X₇ son complejos triméricos que conforman canales selectivos de cationes mono y divalentes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) y son activados directamente por el ATP extracelular. Son necesarias 3 moléculas de ATP para

que se produzca la apertura del canal, lo cual supone la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior celular y la salida de K^+ intracelular. Esta despolarización activa una cascada de señalización que incluye proteínas como p38 MAPK o fosfolipasa A_2 . Por otro lado, la elevación de Ca^{2+} intracelular estimula la liberación de ERO. Cada subunidad está formada por dos dominios transmembranales, un dominio extracelular y grupos amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma celular (**Figura 11**). El sitio de unión del ligando endógeno (ATP) se encuentra en la región extracelular, además en este dominio se encuentran diferentes sitios de unión de distintos moduladores del receptor; estando la unión de varios de los agonistas del receptor P2X_7 fuertemente regulada por mecanismos de regulación alostérica tanto a nivel extra como intracelular (Coddou et al., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, una activación prolongada del receptor lleva a la formación de poros permeables a proteínas orgánicas de alto peso molecular. La apertura de éste lleva a una despolarización de membrana que puede terminar en muerte celular. Estudios de estructura y funcionalidad del receptor sugieren que el extremo carboxilo-terminal del dominio citoplasmático es necesario para la formación de este poro. Este extremo carboxilo se encuentra ausente en el resto de receptores P2X (Rassendren et al., 1997). Sin embargo, todavía no está claro si esta formación del poro se debe a la acción directa sobre el receptor o a mecanismos de regulación alostérica (Schilling et al., 1999).

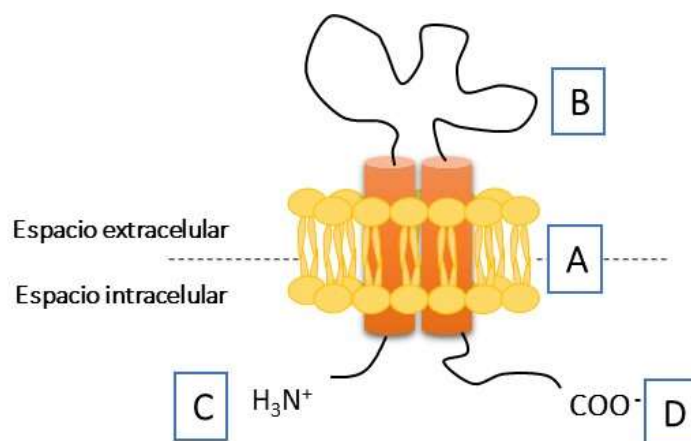


Figura 11. Estructura del receptor P2X_7 . Se observa una de las 3 subunidades de las que consta el receptor. Cada subunidad está formada por dos dominios transmembranales (A), un dominio extracelular (B) y grupos amino (C) y carboxilo (D) terminales citoplasmáticos.

3.4. Liberación del ATP al medio extracelular. Canales de conexina y panexina.

Como hemos dicho anteriormente, condiciones patológicas como inflamación o isquemia causan liberación del ATP intracelular al medio extracelular. El ATP se considera el ligando fisiológico del receptor P2X₇, son varios los mecanismos por los que este puede liberarse al medio extracelular, entre ellos se encuentran los canales de panexina y conexina (Schwiebert et al., 1999, Beigi et al., 1999).

Los **canales de conexina (Cx)** son hemicanales que permiten la salida de pequeñas moléculas como nucleótidos e iones al medio extracelular. Estos canales también pueden interaccionar con ellos mismos para formar uniones entre las células (uniones gap) y permitir el tráfico de moléculas intracelulares (Vinken et al, 2010). Los canales de Cx se clasifican en varios subtipos en función de su peso molecular, siendo los canales de conexina Cx43 los involucrados en la liberación de ATP extracelular (Fortes et al., 2004) (**Figura 12**).

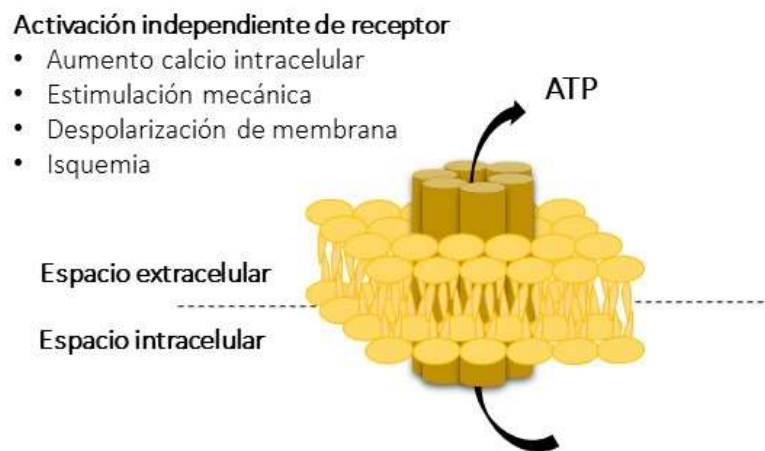


Figura 12. Canal de conexina. En la figura se representa un canal de conexina compuesto por 6 subunidades y sus vías de activación.

Los canales de Cx43 son los principales responsables de la liberación de ATP en leucocitos, estos pueden activarse por aumento de calcio intracelular, estimulación mecánica, despolarización de membrana e isquemia (**Figura 12**) (Eltzsching et al., 2006). Además, en macrófagos se ha descrito que los canales de Cx43 se encuentran próximos al receptor P2X₇ y que junto con estos median la comunicación intracelular entre células (Fortes et al., 2004).

Los **canales de pannexina (panx)** se dividen en 3 tipos: Panx1 se encuentra en la mayoría de tejidos de mamíferos, Panx2 se encuentra a nivel del sistema nervioso central y por último panx3 en piel y cartílago (Baranova et al., 2004). Estos canales de panx, a diferencia de los canales de Cx, no forman uniones entre ellos. El papel de estos canales en la liberación de ATP extracelular se ha descrito recientemente, pudiendo producirse su apertura para la liberación del ATP de forma dependiente de la activación de receptores purinérgicos o de forma independiente mediante estimulación mecánica, despolarización de membrana o isquemia (Locovei et al., 2006) (**Figura 13**).

El subtipo panx¹ es el que generalmente se asocia a liberación de ATP tras activación de los receptores P2X₁, P2X₄ y P2X₇ que median la entrada de calcio intracelular (Riteau et al., 2010).

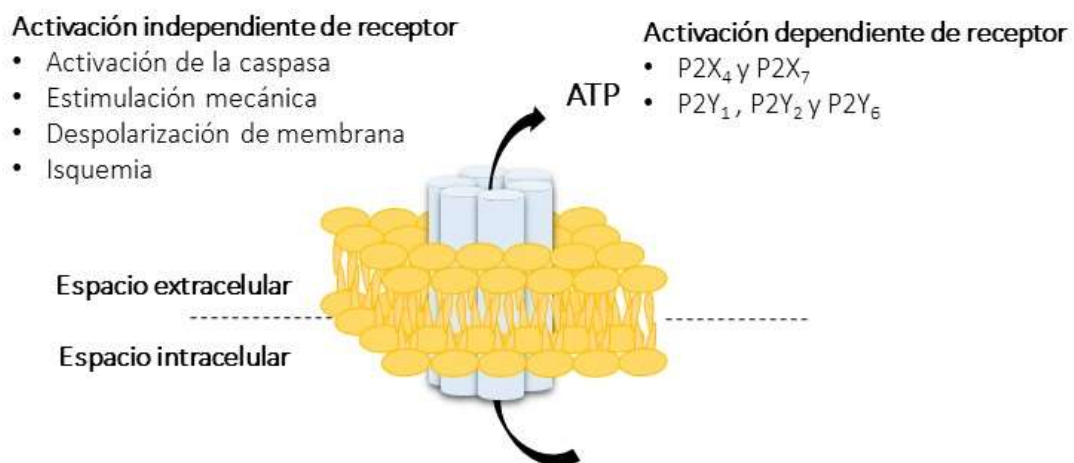


Figura 13. Canal de pannexina. En la figura se representa un canal de pannexina compuesto por 6 subunidades y sus vías de activación que independiente o dependiente de receptor.

INTRODUCCIÓN

En líneas generales, el consenso es que el ATP se puede liberar a través de los canales panx¹ y Cx43 y actuar de forma paracrina y/o autocrina sobre los receptores P2X₇ de la propia célula y células cercanas dando lugar a una respuesta proinflamatoria (Burnstock et al., 2018) (Figura 14).

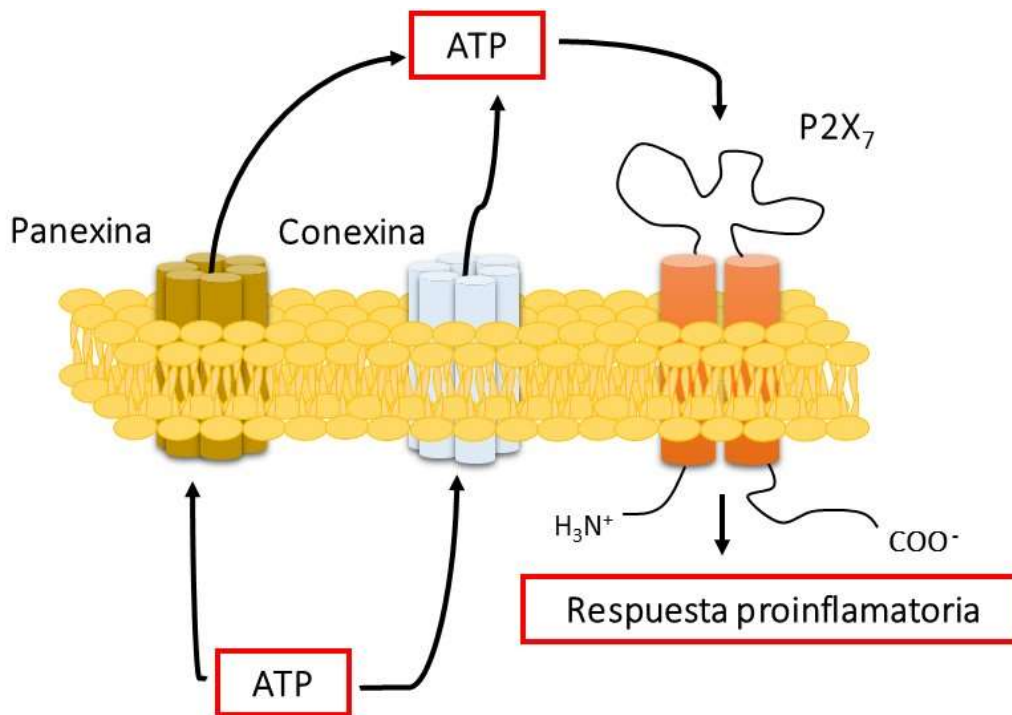


Figura 14. Relación entre los canales de conexina y panexina y el receptor P2X₇. En la figura se representa la propuesta de relación entre los canales de panexina, conexina y el receptor P2X₇. La liberación de ATP por estos canales permite que este actúe de forma autocrina o paracrina sobre los receptores P2X₇ cercanos.

3.5. Ruta de degradación del ATP.

La degradación de los nucleótidos extracelulares ocurre de forma rápida a través de la ruta de degradación del ATP con el fin de dar lugar a la formación de Adenosina. Encontramos una gran variedad de ecto-enzimas que son co-expresadas en un grado variable en los tejidos de mamíferos y comparten similitudes en la especificidad de sustrato. Existen dos rutas opuestas: la de degradación y la de generación de ATP que regulan la duración y magnitud de la señalización purinérgica a través de distintos enzimas. Así, la ruptura secuencial de nucleótidos a adenosina se produce a través de las siguientes enzimas: ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39),

ecto-nucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP) y ecto-5'-nucleotidasa (CD73). Esta ruptura de nucleótidos se contrarresta con la re-síntesis de fosforilos de alta energía a través de reacciones en sentido opuesto, en las que intervienen la enzima adenilato quinasa (AK) y la enzima ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K) (**Figura 15**) (Yegutkin 2008). La interferencia sobre estas enzimas llevaría a una ruptura del equilibrio homeostático con el consiguiente aumento de los niveles de ATP y ADP y la reducción de los niveles de adenosina, dando lugar por tanto a un ambiente proinflamatorio.

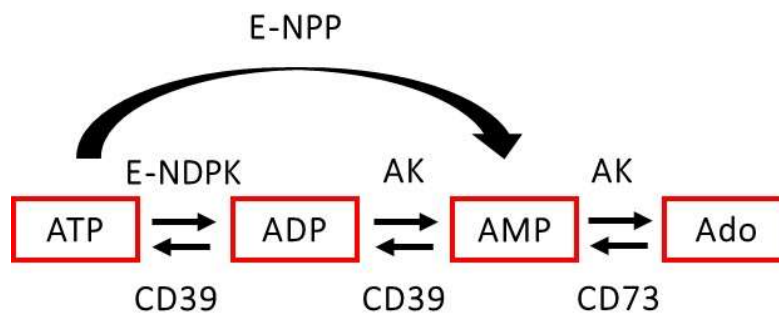


Figura 15. Esquema representativo de la ruta de degradación/formación del ATP y las enzimas partícipes en el proceso. La figura muestra la conversión del ATP a adenosina y viceversa. Las enzimas que participan en dicha ruta: Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39), ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), ecto-5'-nucleotidasa (CD73), adenilato quinasa (AK) y ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K).

4. RELACIÓN DE ABC CON RIESGO CARDIOVASCULAR Y SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA.

4.1. ABC.

ABC es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido, en concreto de la guanosina, activo frente al VIH-1 y VIH-2.

La posología recomendada es de 300 mg/12 h o de 600 mg/24 h, pudiendo llegar a una concentración plasmática máxima (C_{max}) de 5 µg/mL (equivalente a 20 µM); y se encuentra comercializado con el nombre de Ziagen® y en coformulación en Kivexa® (ABC+3TC), Triumeq (ABC+DTG+3TC) y Trizivir® (ABC+AZT+3TC). Un aspecto importante de ABC es que es un profármaco que debe ser metabolizado intracelularmente a su metabolito activo, Carbovir 5'-trifosfato (CBV-TP) (EMA, 2016).

4.1.1. Farmacocinética.

La absorción de ABC tras administración oral es rápida, siendo su biodisponibilidad de un 83%. Tras su absorción se metaboliza principalmente en el hígado excretándose un 2% de forma inalterada por vía renal. La fracción inalterada del fármaco accede a las células infectadas por el virus donde se produce su biotransformación a CBV-TP mediante enzimas intracelulares (**Figura 16**).

La bioactivación de ABC se inicia con su conversión a abacavir 5'-monofosfato mediante la enzima adenosina fosfotransferasa, a continuación, a través de la acción de una enzima citosólica desconocida hasta el momento sufre un proceso de desaminación formando el carbovir 5'-monofosfato. Por último, la enzima guanilato quinasa lo transforma en carbovir 5'-difosfato que sufre una última fosforilación por parte de varias quinasas a CBV-TP (Barbarino et al., 2014) (**Figura et al., 2014**).

4.1.2. Farmacodinámica.

CBV-TP es un análogo del nucleótido 2'-desoxiguanosina trifosfato (dGTP) que actúa bloqueando la transcriptasa inversa del VIH (Figura 18). CBV-TP compite con dGTP por su incorporación a la cadena de nucleótidos sintetizada por la transcriptasa inversa a partir del ARN viral, interrumpiendo el ciclo replicativo viral (Barbarino et al., 2014).

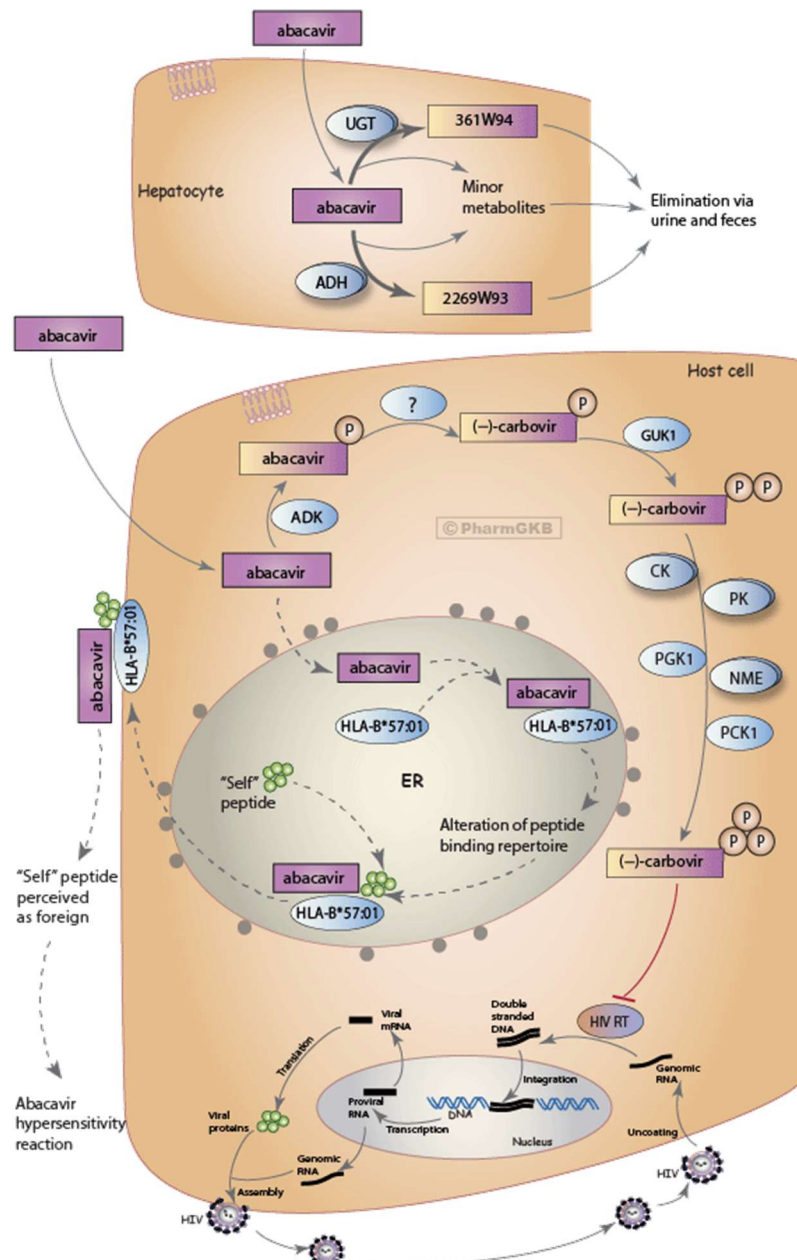


Figura 16. Representación de la farmacocinética y la farmacodinámica de abacavir. En la figura se muestra la biotransformación del profármaco abacavir en su metabolito activo, carbovir 5'-trifosfato, así como también su mecanismo de acción consistente en la inhibición de la enzima viral transcriptasa inversa (Adaptación de de Barbarino et al., 2014).

4.2. Asociación de ABC con riesgo cardiovascular. Posibles mecanismos.

Como hemos mencionado anteriormente, distintos estudios relacionan a los ITIAN análogos de purina (ABC y en menor medida ddl) con un aumento del riesgo cardiovascular.

El debate en torno a ABC ha sido impulsado por la falta de un mecanismo claro de acción que explique su toxicidad a nivel cardiovascular. Hasta el momento se han propuesto diversos mecanismos que pudieran explicar su acción. Uno de ellos apunta a un mecanismo directo y agudo de inflamación vascular, ya que se ha descrito que una vez interrumpida la terapia el riesgo a desarrollar infarto de miocardio disminuye (Sabin et al., 2008). Además, otros autores relacionan ABC con una regulación negativa de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial estimulando la producción de ERO en células endoteliales, situaciones ambas que pueden dar lugar a disfunción vascular y acumulación leucocitaria (Wang X et al., 2009). Otro mecanismo propuesto se basa en la inhibición competitiva de la guanilil ciclasa en plaquetas provocando un aumento de la expresión de P-selectina (Baum et al., 2011). Por último, se ha descrito un aumento de niveles de IL-6 y de la proteína C reactiva (CRP), ambos marcadores inflamatorios, en los pacientes tratados con ABC (SMART/INSIGHT & DAD study groups, 2008).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que ABC induce interacciones leucocito-endotelio, “in vitro” (utilizando leucocitos polimorfonucleares y mononucleares extraídos de sangre humana y células endoteliales) (de Pablo et al., 2010) e “in vivo” en vénulas y arteriolas de mesenterio de rata (de Pablo et al., 2013); efectos que fueron reproducidos por ddl (análogo de purina), pero no se reprodujeron con el resto de fármacos del grupo (análogos de pirimidina o de nucleótido). Estos resultados además se han corroborado utilizando “in vitro” las combinaciones de ITIAN más empleadas en la terapéutica actual, que son TDF/FTC o ABC/3TC, observando que únicamente la combinación que contiene ABC induce dicha interacción (de Pablo et al., 2012). Todos estos efectos son característicos de patologías vasculares con componente inflamatorio y están relacionados con las etapas iniciales del proceso aterosclerótico y formación del trombo.

Las moléculas de adhesión implicadas en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC son Mac-1 (CD11b/CD18) leucocitaria e ICAM-1 endotelial, así pues, ABC aumenta la expresión de las subunidades CD11b y CD18 en leucocitos de sangre entera (neutrófilos y monocitos), no afectando al resto de moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales (de Pablo et al., 2010). Además, el bloqueo de Mac-1 o de ICAM-1 revirtió los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio tanto “in vitro” como “in vivo” (de Pablo et al., 2010), demostrando por tanto que son las moléculas participes en la interacción leucocito-endotelio producida por ABC.

Nuestro grupo de investigación mediante el estudio de la relación estructura actividad de ABC con ATP (**Figura 17**) ha demostrado que los efectos de ABC sobre la acumulación leucocitaria vascular “in vitro” están mediados por el receptor P2X₇ (efectos de ABC revertidos por OxATP y BGG) y son dependientes de ATP -ligando del receptor P2X₇- al ser revertidos por apirasa, compuesto que hidroliza el ATP (**Figura 18**).

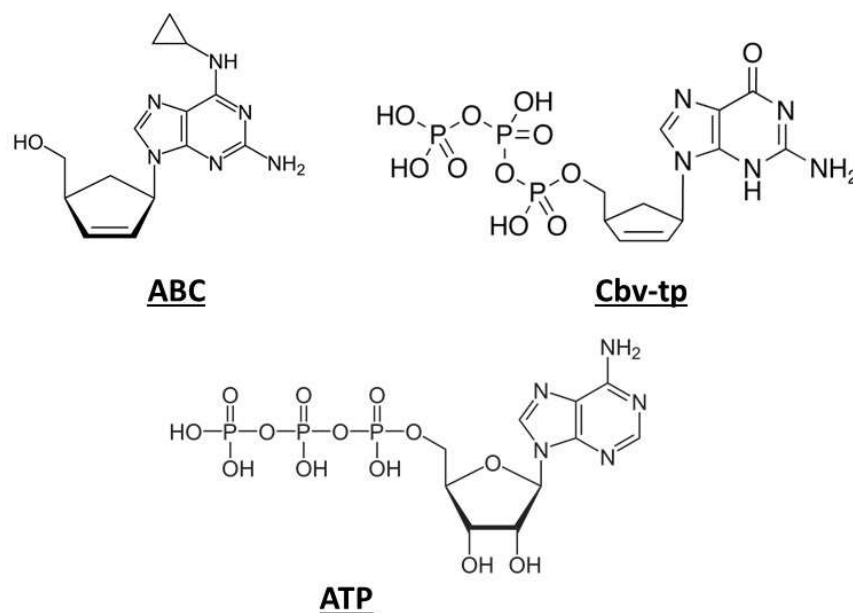


Figura 17. Similitud química entre las estructuras de ABC, su metabolito activo CBV-TP y el ATP. La figura representa las estructuras químicas de abacavir (ABC), carbovir 5'-trifosfato (CBV-TP) y ATP.

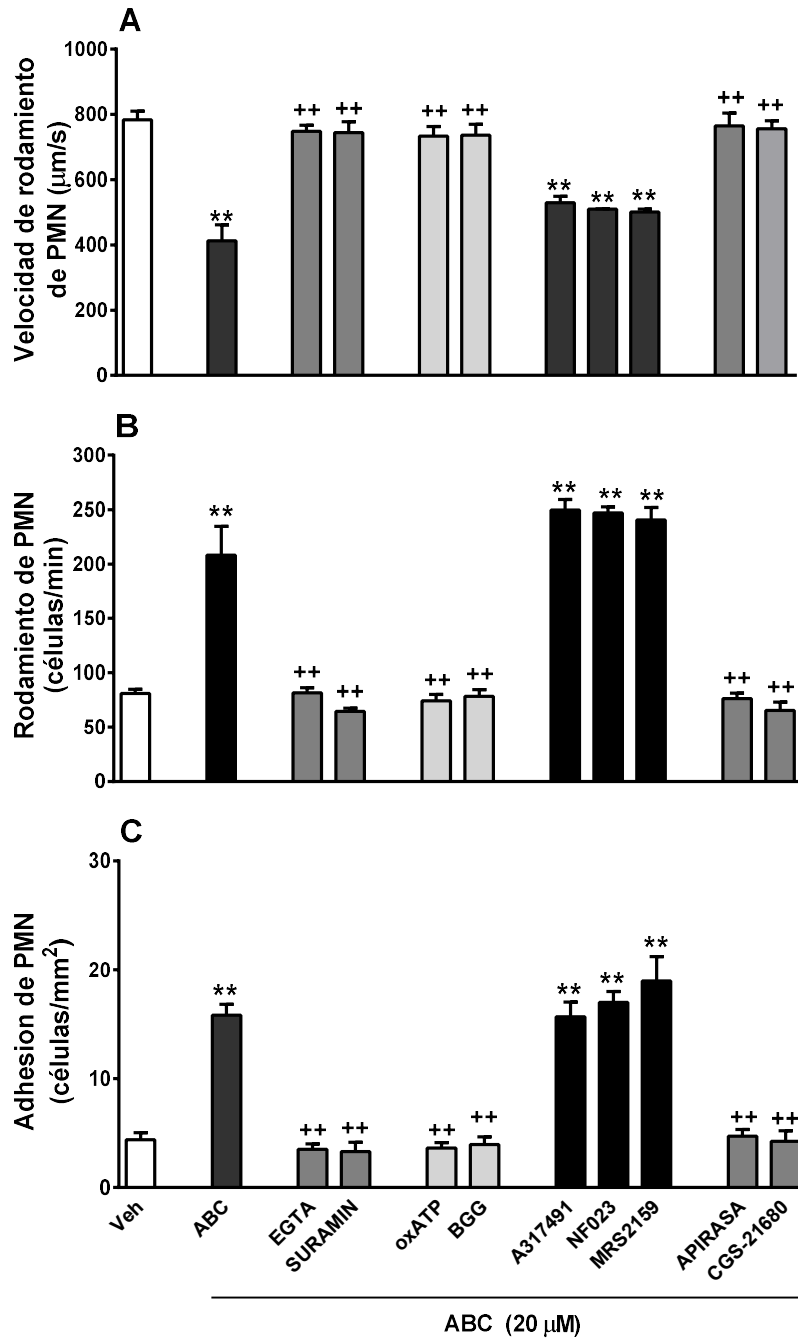


Figura 18. Análisis de los receptores P2X-Y en los efectos producidos por ABC sobre la interacción PMN-endotelio. La figura muestra la velocidad de rodamiento (a), rodamiento (B) y adhesión (C) de ABC sobre el endotelio en presencia de distintos antagonistas de los receptores purinérgicos o compuestos que participan en la señalización purinérgica; EGTA (Quelante de Ca²⁺), suramin (Antagonista inespecífico de los receptores P2X-Y), OxATP y BGG (Antagonistas específicos del receptor P2X₇), A317491 (Antagonista específico de los receptores P2X_{2/3}), NF023 (Antagonista específico del receptor P2X₁₋₄), MRS2159 (Antagonista específico del receptor P2X₁), apirasa (compuesto hidroliza ATP) y CGS-21680 (Agonista de los receptores adenosina A_{2A}) (Figura adaptada de la tesis doctoral de de Pablo, 2013).

Estos resultados, junto con la similitud estructural del ATP, ligando natural del receptor P2X₇, con ABC y su metabolito activo CBV-TP (**Figura 17**), nos lleva a pensar que los efectos proinflamatorios producidos por el tratamiento con ABC pudieran ser debidos a la acción directa de ABC sobre dicho receptor, pero también podrían deberse a la activación del receptor por CBV-TP o ATP. Además, “in vivo” todavía existe una falta de evidencia sobre la mediación del receptor P2X₇ en el efecto proinflamatorio de ABC. Todo esto forma la base de estudio de la presente tesis doctoral (**Figura 19**).

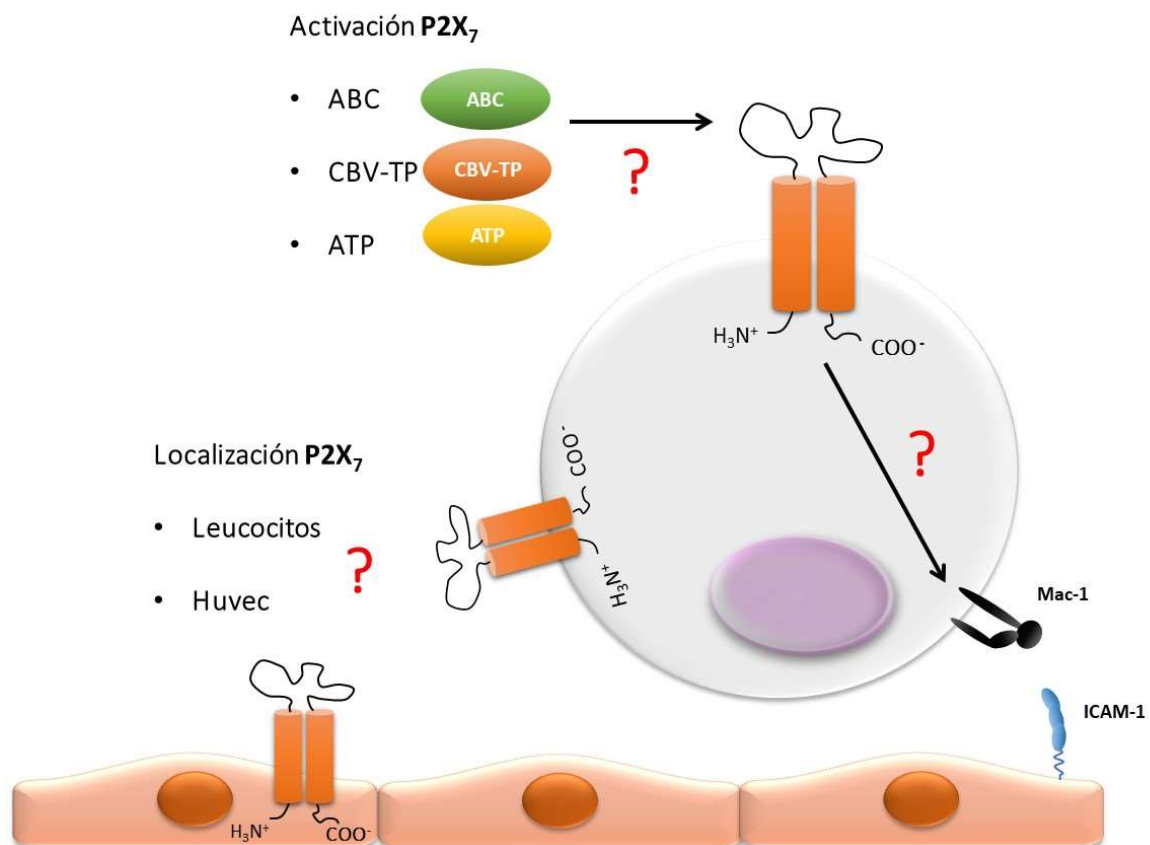


Figura 19. Esquema representativo del posible mecanismo de acción de ABC a nivel cardiovascular. Actualmente no se conoce la vía de activación del receptor P2X₇ por parte de ABC. La interacción leucocito-endotelio inducida por ABC está mediada por el receptor P2X₇, pero se desconoce el grado de implicación de los distintos tipos celulares, así como su relación con la expresión de Mac-1.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral fue explorar el posible mecanismo de acción por el que el ITIAN análogo de purina ABC posee un efecto proinflamatorio. Para ello, se estudió la implicación de la vía de señalización purinérgica, especialmente del receptor P2X₇.

En particular, abordaremos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la implicación funcional del receptor P2X₇ en los efectos proinflamatorios de ABC (Interacción leucocito-endotelio y expresión de Mac-1), así como la importancia de la localización celular de dichos receptores.
2. Estudiar el ligando (ABC, ATP o CBV-TP) que actúa sobre los receptores de ATP P2X₇ dando lugar al efecto proinflamatorio de ABC
 - 2.1. Caracterizar los efectos proinflamatorios (interacción leucocito-endotelio y expresión de Mac-1) de los potenciales ligandos (ATP, CBV-TP) y la implicación del receptor P2X₇ en estas respuestas.
 - 2.2. Evaluar las acciones de ABC sobre los niveles de CBV-TP y de los distintos nucleótidos (ATP/ADP/AMP/adenosina) en células endoteliales y leucocitarias.
 - 2.3. Determinar las acciones de ABC sobre la velocidad de degradación del ATP y sobre la expresión y actividad enzimática de las enzimas responsables de la degradación del ATP (CD39 y CD73).
 - 2.4. Dilucidar las acciones de apirasa sobre los niveles de ABC, ATP y CBV-TP.
 - 2.5. Estudiar la unión de los potenciales ligandos al receptor P2X₇.
3. Analizar la potencial modulación alostérica del receptor P2X₇ por ABC.
4. Evaluar la acción proinflamatoria de ABC "in vivo" así como la implicación del receptor P2X₇ en esta respuesta con el fin de dar relevancia fisiológica a los resultados obtenidos "in vitro".

III. MATERIAL Y MÉTODOS

BLOQUE I. ESTUDIOS IN VITRO

1. AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR.

1.1. Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

La extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) se realizó mediante tratamiento con colagenasa. Estas células se extrajeron de la única vena presente en cordones umbilicales humanos frescos procedentes de donantes del Hospital Clínico Universitario de Valencia, trabajando con el cordón umbilical completo sin disecar (**Figura 20**).



Figura 20. Cordón umbilical humano con colagenasa preparado para la extracción de células endoteliales (HUVEC). La vena umbilical está siendo tratada con una solución de colagenasa con el fin de obtener las células endoteliales (*Ilustración obtenida de la Tesis Doctoral de Samuel Orden, 2016*).

La vena del cordón umbilical se lavó con PBS (“Phosphate Buffered Saline”) a 37°C y; a continuación, se añadió colagenasa (1 mg/ml), manteniendo el cordón umbilical en

MATERIAL Y MÉTODOS

el incubador durante 17 minutos a 37°C (Jaffe et al., 1973; Ibiza et al., 2009). Posteriormente, se masajeó el cordón umbilical para garantizar la extracción de las células endoteliales de la pared del vaso, se recogió el contenido y se centrifugó a 259 xg. El precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo EBM-2 (“Endothelial Cell Growth Medium-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” (VEFG, 0.1% v/v), “Recombinant Long R3 Insulin-Like Growth Factor” (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), estreptomina (50 µg/ml) y fungizona (2.5 µg/ml). El contenido se depositó en un frasco de cultivo celular T-25 donde las células, tras varios días alcanzaron el 100 % de confluencia, almacenándose en el incubador a 37°C en una atmósfera húmeda de 95 % de aire y 5 % de CO₂.

Finalmente, los cultivos primarios se despegaron con tripsina y las células se plantaron en las placas de cultivo adecuadas. Se utilizaron células del primer pase de los cultivos primarios de HUVEC en todos los experimentos.

1.2. Aislamiento de leucocitos.

Para la extracción de células leucocitarias se utilizó sangre procedente de donantes sanos y no infectados con el virus del VIH del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana o del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Esta sangre se recogió en tubos que contienen citrato sódico como anticoagulante (de Pablo et al., 2010).

El proceso de extracción leucocitaria se inició con la adición de 20 mL de Sangre sobre 10 mL de dextrano 3 % (en suero fisiológico), incubando durante 45 min a T^a ambiente, consiguiendo el depósito de gran parte de los eritrocitos en la parte inferior. A continuación, se recogió la parte superior y se adicionó sobre medio Ficoll-Paque Plus evitando su mezclado y centrifugando a 259xg, 25 minutos. Tras la centrifugación las

células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica (PMN) se separaron por gradiente de densidad, quedando los primeros en la interfase formando un anillo blanquecino y los segundos en el precipitado (Figura 21).

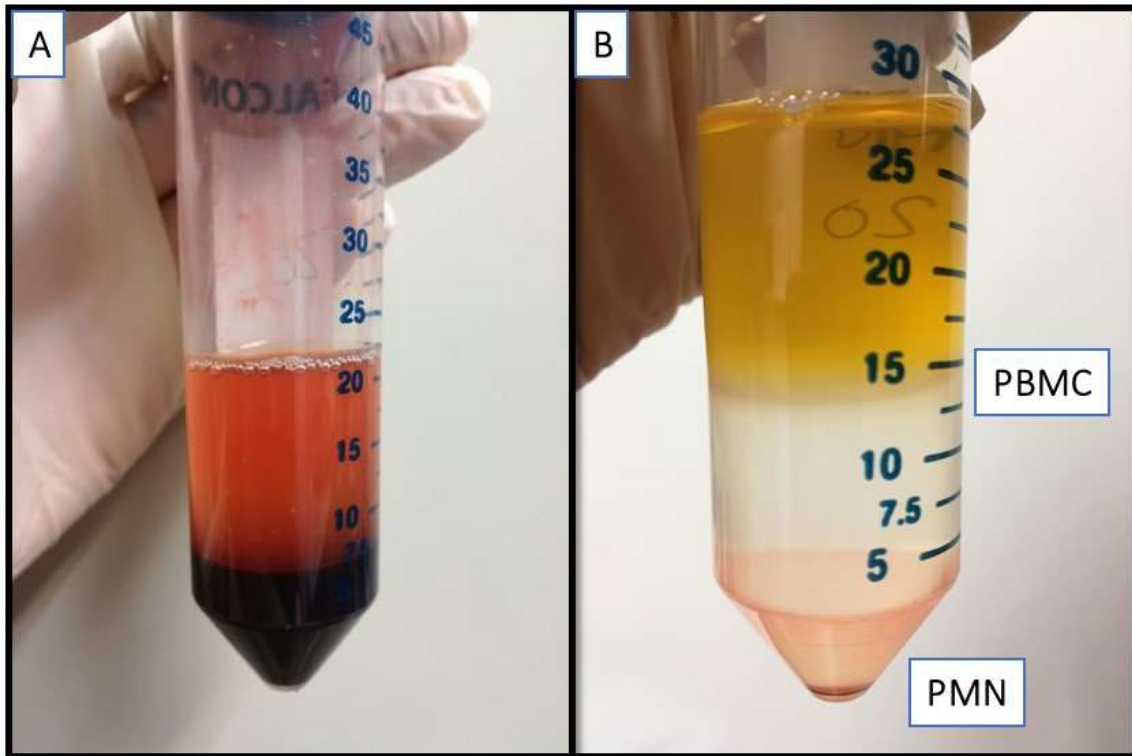


Figura 21. Separación de PBMC y PMN con dextrano y el posterior gradiente de densidad en medio “Ficoll-Paque Plus”. A) Deposito de eritrocitos tras adición del dextrano. B) Separación mediante Ficoll observando el precipitado de PMN y la Interfase con PBMC.

Para el aislamiento de los **PMN** el precipitado obtenido se lisó y se centrifugó de nuevo a 259 xg durante 5 minutos con el fin de eliminar los eritrocitos restantes. Los PMN se lavaron con HBSS (“Hanks Balanced Salt Solution”) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} y se resuspendieron en medio RPMI completo (suplementado con suero fetal bovino inactivado (10 % v/v), penicilina/estreptomicina (1% v/v), glutamina (1% v/v) y piruvato sódico (1% v/v)) (de Pablo et al., 2010)

El aislamiento de los **PBMC** se realizó recogiendo el anillo blanquecino que se centrifugó de nuevo a 583 xg durante 10 minutos. Los PBMC se lavaron con HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y se resuspendieron en medio RPMI completo.

2. ADHESIÓN DINÁMICA EN CÁMARA PARALELA DE FLUJO.

Se utilizaron células endoteliales (HUVEC) y poblaciones leucocitarias aisladas (PMN y PBMC) provenientes de donantes sanos descritas previamente. Las células endoteliales se sembraron en cubreobjetos circulares de plástico de 25 mm de diámetro pretratados con Fibronectina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Esta técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo ("Flow Chamber") ya ha sido descrita previamente (de Pablo et al., 2010). La cámara de flujo utilizada para la realización de estos experimentos posee una hendidura en la que se inserta el cubreobjetos circular que contiene la monocapa de células endoteliales confluentes (Goetz et al., 1999, Cai et al., 2006, Alvarez et al., 2004). Una vez montada la cámara, una porción de 5 x 25 mm fue expuesta al flujo (**Figura 22**). Todo el proceso se realizó a 37° ya que una de las placas que forma parte de esta cámara de flujo es calefactora.

Ambas poblaciones leucocitarias (PMN o PBMC) se resuspendieron en el tampón DPBS⁺ ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline"), con Ca²⁺ y Mg²⁺ y con HSA ("Human Serum Albumin", 0.1 %) y se perfundieron 1 x 10⁶ células/mL de PMN ó 0.5 x 10⁶ células/mL de PBMC sobre la monocapa de células endoteliales a un flujo controlado de 0.36 mL/min (0.7 dinas/cm²) gracias a una bomba de infusión.

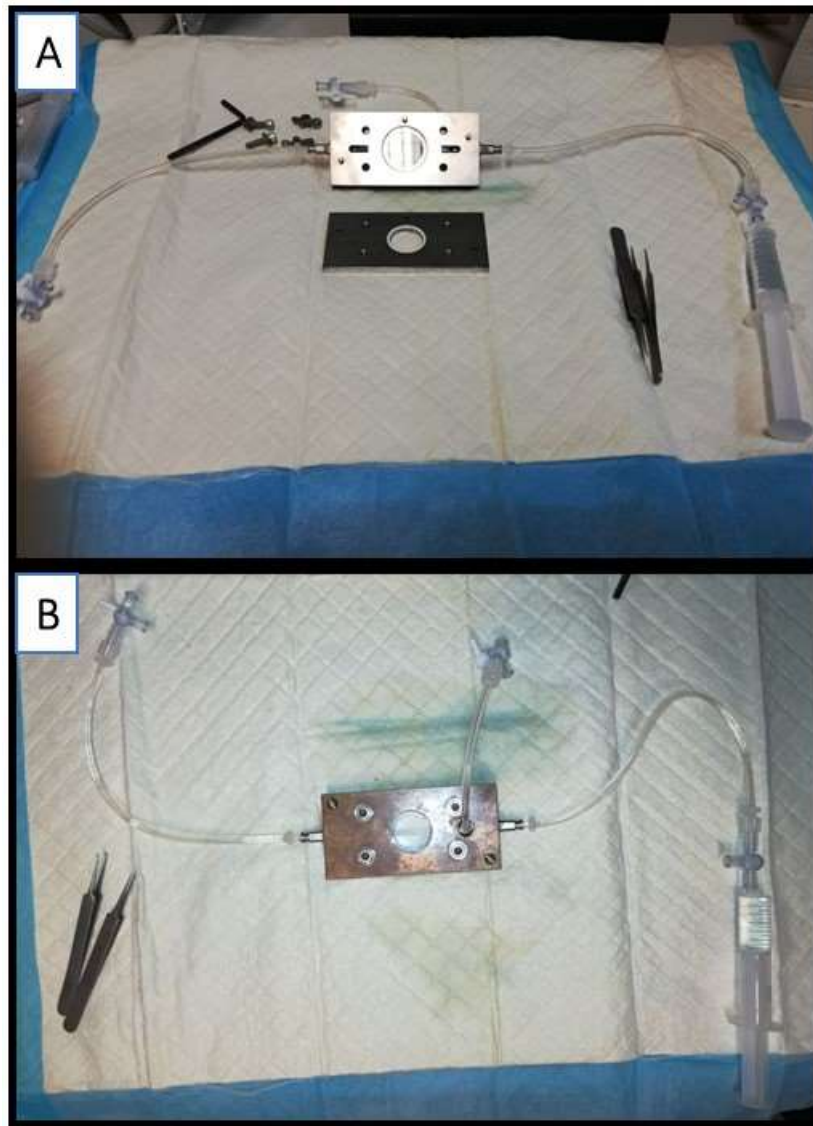


Figura 22 Montaje de la cámara paralela de flujo. (A) Cámara abierta. (B) Cámara cerrada. En el centro de la cámara se encuentra una hendidura donde se inserta el cubreobjetos circular con las células endoteliales confluentes. En los extremos vemos las conexiones que permiten que se perfundan las poblaciones leucocitarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta cámara se colocó sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) conectado a una videocámara (Sony Exware HAD) permitiéndonos la grabación de las imágenes (**Figura 23**).

Para observar el flujo de leucocitos y su interacción con las células endoteliales se utilizó un objetivo 40x. La grabación se inició cuando se empezó a ver el paso de los leucocitos sobre la monocapa de células endoteliales y las imágenes fueron recogidas con el programa informático “NIS Elements AR program”. La grabación se realizó durante 5 minutos en el mismo campo en el que se analizaron los parámetros de rodamiento y velocidad de rodamiento leucocitario. Posteriormente se grabaron 5 campos adicionales donde se analizó la adhesión leucocitaria al endotelio.

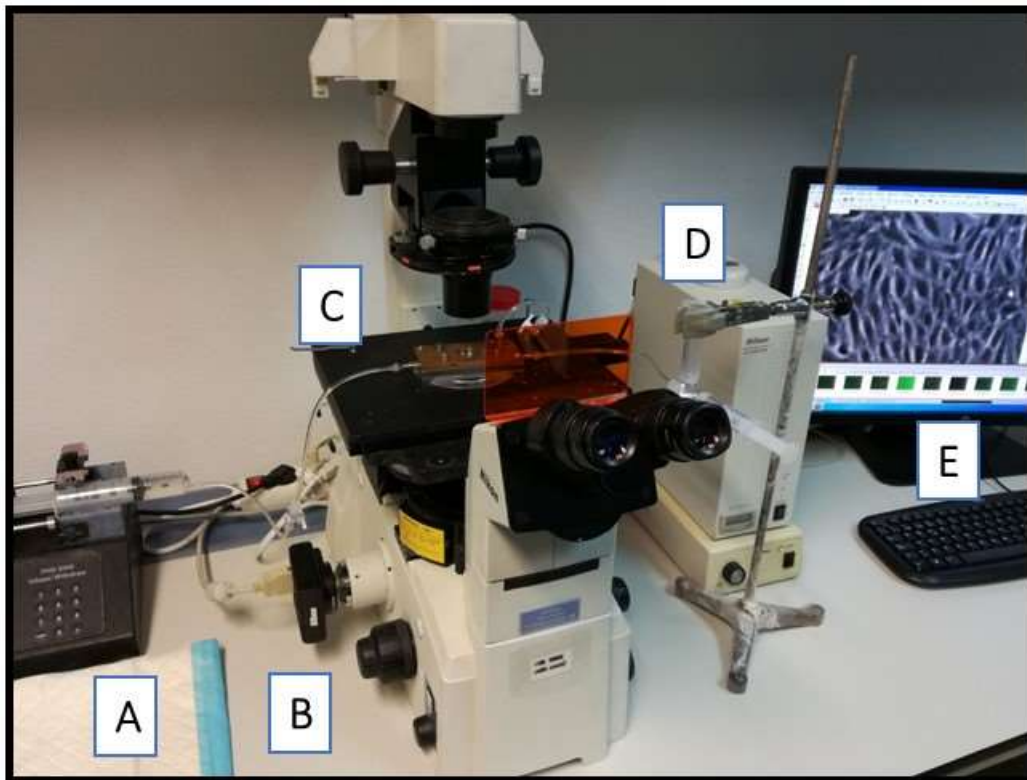


Figura 23. Montaje del sistema de cámara paralela de flujo en el microscopio. En la imagen observamos los distintos componentes que forman parte del ensayo. (A) Bomba de infusión/succión (B) Videocámara, C) Cámara paralela de flujo (D) Jeringa invertida con una suspensión de leucocitos (PMN o PBMC) y (E) Ordenador conectado a la videocámara.

2.1. Parámetros leucocitarios determinados.

Se analizaron los siguientes parámetros leucocitarios (**Figura 8**).

- **Velocidad de rodamiento leucocitario:** es el tiempo que tarda un leucocito en fase de rodamiento en recorrer 100 μm de endotelio. Se calcula haciendo la media de la velocidad de 20 leucocitos consecutivos. Se expresa en $\mu\text{m/s}$ (**Figura 8**).
- **Rodamiento leucocitario:** es el número de leucocitos que circulan a una velocidad inferior a la de los eritrocitos ya que están interaccionando con el endotelio vascular. Se analiza una zona fija de 100 μm durante 1 minuto. Se expresa en *células/min* (**Figura 8**).
- **Adhesión leucocitaria:** es el número de leucocitos que permanecen estacionados o tienen contacto estable con el endotelio durante un periodo igual a superior a 30 segundos en 100 μm . Se expresa en *células/mm²* (**Figura 8 y 24**).

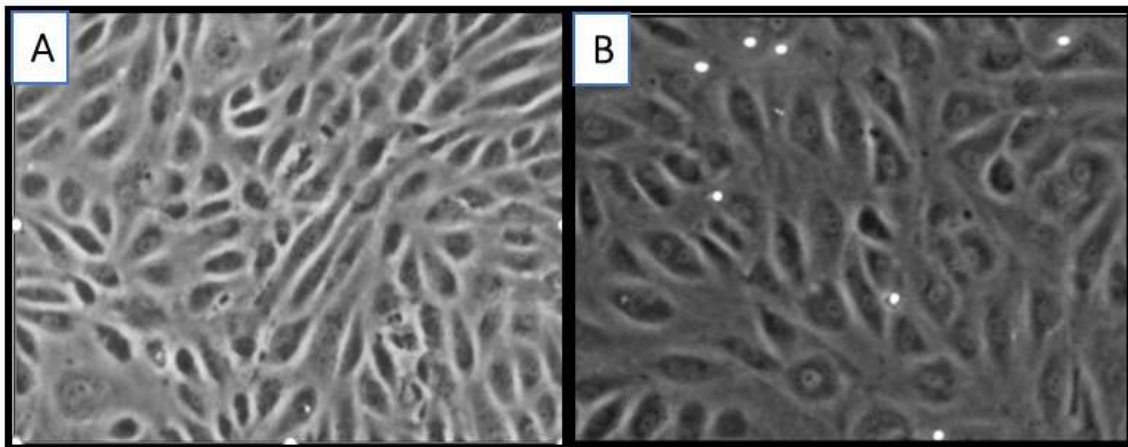


Figura 24. Imágenes representativas de la interacción leucocito-endotelio. A) Monocapa de células HUVEC. B) Leucocitos (PMN) adheridos a la monocapa de HUVEC tras tratamiento de ambos tipos celulares con ABC 20 μM .

2.2. Protocolo experimental de tratamiento.

Para los estudios de los efectos individuales de ABC, ATP y CBV-TP tanto los leucocitos aislados (PMN y PBMC) como las células endoteliales (HUVEC) se trataron independientemente con ABC (20 μM), ATP (0.01–10 μM), CBV-TP (0.1–50 μM) o agua estéril (vehículo) durante 4 horas. Se consideran como concentraciones de ABC clínicamente relevantes de 1 a 20 μM (de Pablo et al., 2010) (**Figura 25**).



Figura 25. Protocolo experimental de tratamiento con ABC, ATP y CBV-TP. La figura muestra el protocolo experimental de tratamiento de forma independiente de células endoteliales (HUVEC) y de leucocitos (PMN o PBMC) con vehículo (agua estéril), Abacavir (ABC), Adenosin trifosfato (ATP) o Carbovir trifosfato (CBV-TP).

Para analizar la implicación de la vía purinérgica en los efectos producidos por ABC, ATP y CBV-TP, pretratamos tanto las células endoteliales como los leucocitos con distintos compuestos que actúan sobre la ruta de señalización purinérgica (Coddou et al., 2011) (**Figura 26**) previamente al tratamiento con ABC, ATP y CBV-TP. Para el estudio de la implicación de los transportadores de ATP sobre el efecto de ABC, se pretrataron ambos tipos celulares con distintos bloqueantes de estos canales de modo previo al tratamiento con ABC (**Figura 26**). Con el fin de estudiar la importancia de la localización (HUVEC o leucocitos) de los receptores purinérgicos implicados en los efectos de ABC se realizó un pretratamiento con los distintos antagonistas solo en uno de los tipos celulares, leucocitos o HUVEC, previo al tratamiento de ambos tipos celulares con ABC (20 μM) (**Figura 26**).

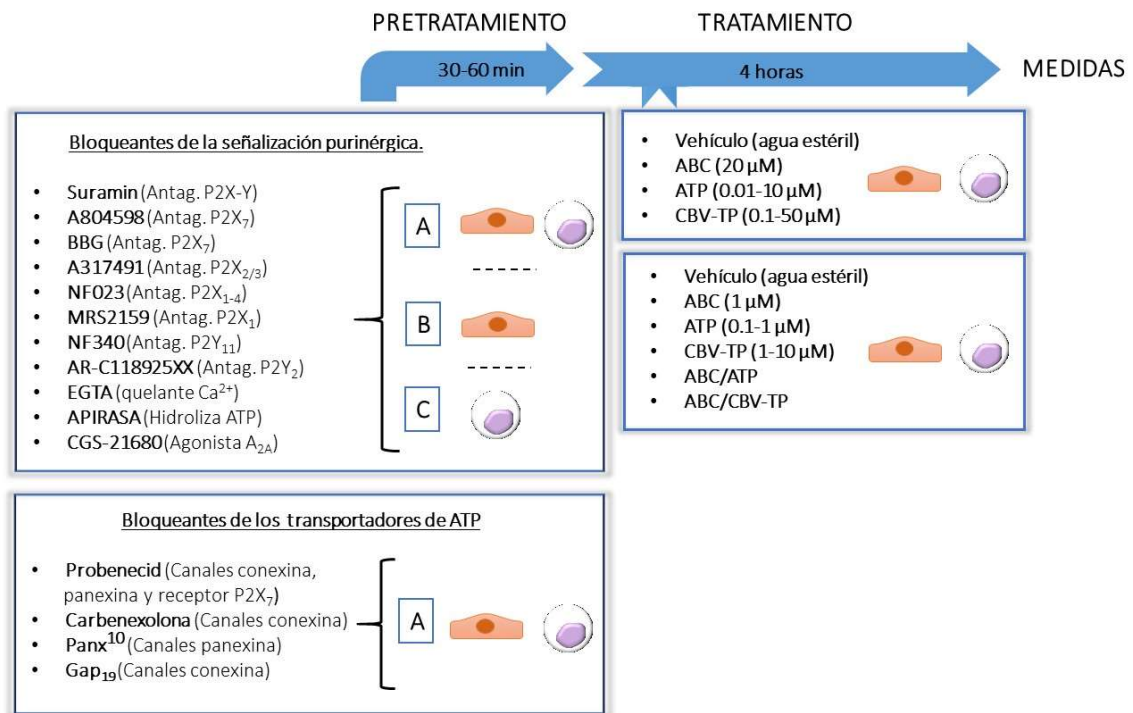


Figura 26. Protocolo experimental de pretratamiento con distintos compuestos que interfieren en la ruta de degradación/generación/transporte de ATP previo al tratamiento con ABC, ATP, CBV-TP o sus distintas combinaciones. La figura muestra el pretratamiento de las células endoteliales y de los leucocitos, de forma conjunta (A) o solo un tipo celular (B y C), con distintos compuestos que interfieren en la ruta de degradación/generación de ATP (Suramin, A804598, BBG, A317491, NF023, MRS2459, NF340, AR-C118925XX, EGTA, apirasa, CGS-21680) y en el transporte de ATP (Probenecid, Carbenexolona, Panx¹⁰ y Gap₁₉) (30-60 min), así como el posterior tratamiento de ambos tipos celulares con vehículo (agua estéril), (ABC), Adenosin trifosfato (ATP), Carbovir trifosfato (CBV-TP) o sus distintas combinaciones (4 h).

Además, también se analizó el efecto de las combinaciones de ABC, ATP y CBV-TP. Para ello, se trataron ambos tipos celulares con las concentraciones individuales de dichos compuestos que no produjeron una diferencia significativa en el estudio de sus efectos individuales sobre la interacción leucocito-endotelio (ABC 1 μM, ATP 0.1 μM y CBV-TP 1-10 μM). En algunos casos se realizó el pretratamiento de ambos tipos celulares con distintos bloqueantes de la señalización purinérgica -antagonista inespecífico de los receptores P2X-Y (Suramin) y un antagonista específico de los receptores P2X₇ (A804598)- previo al tratamiento con las distintas combinaciones (**Figura 26**). Transcurrido el período de incubación con los diferentes tratamientos se procedió a realizar la técnica de adhesión dinámica en cámara de flujo descrita anteriormente.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La determinación de la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias se realizó mediante un citómetro de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences) utilizando muestras de sangre entera (**Figura 27**).

Las poblaciones leucocitarias se identificaron en función de sus características de tamaño y granulosidad (“forward scatter” -FS- and “side scatter” -SS-, respectivamente). Se utilizó la mediana de la intensidad de la fluorescencia como marcador de la expresión de las diferentes moléculas de adhesión analizadas. Se analizaron 10.000 eventos por muestra (Alvarez et al., 2004, Alvarez et al., 2007) (**Figura 28**).

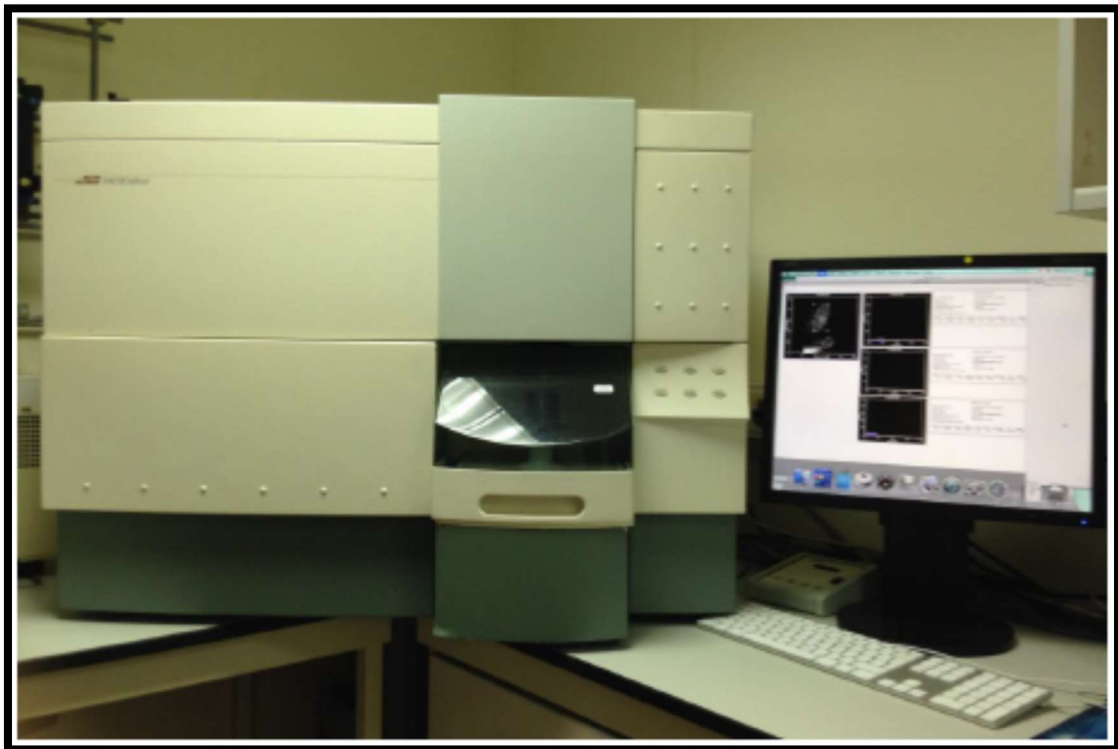


Figura 27. Citómetro de flujo FACS Calibur.

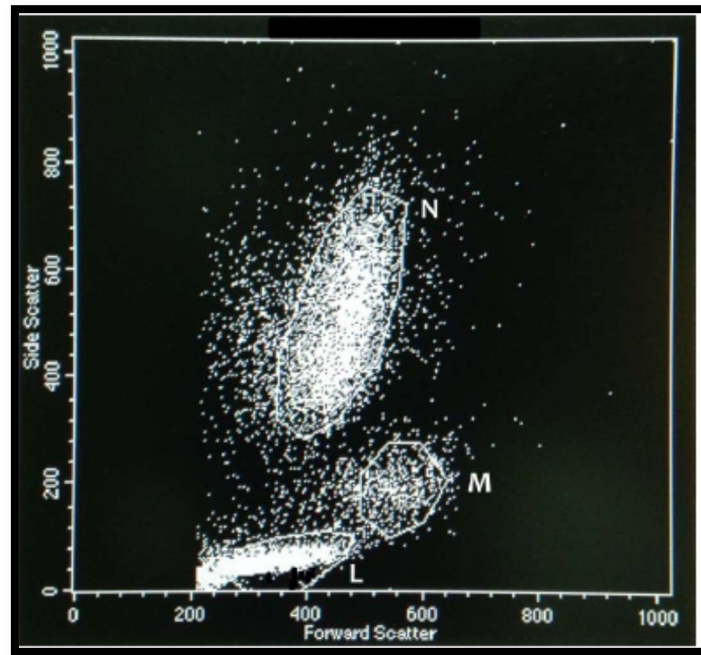


Figura 28. Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias. La figura muestra un histograma representativo de las diferentes poblaciones leucocitarias separadas en función de sus características de tamaño (“forward scatter”) y granulosidad (“side scatter”) por el citómetro de flujo FACS calibur. L (linfocitos), M (monocitos) y N (neutrófilos).

3.1. Protocolo experimental.

Para los estudios de los efectos individuales de ABC, CBV-TP y ATP, 40 μL de sangre se trataron con ABC (20 μM), CBV-TP (1–50 μM) o ATP (0.1–10 μM). En algunos casos, para analizar la implicación de la vía purinérgica en los efectos producidos por ABC, CBV-TP y ATP, pretratamos la sangre con distintos compuestos que actúan sobre la vía de señalización purinérgica y sobre el transporte de ATP (**Figura 29**).

MATERIAL Y MÉTODOS

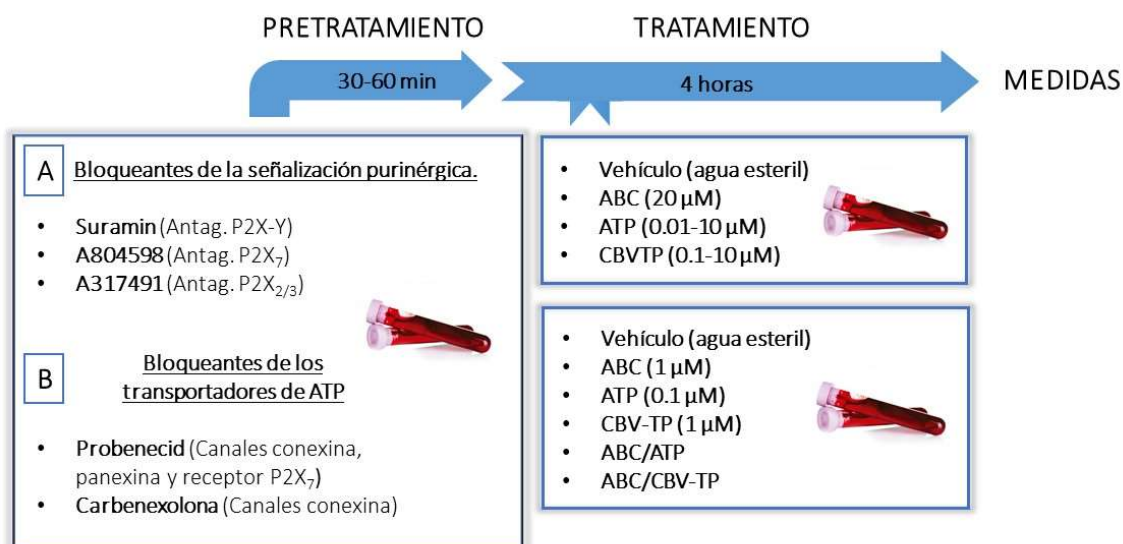


Figura 29. Protocolo experimental de pretratamiento con distintos compuestos que interfieren en la ruta de degradación/generación/transporte de ATP previo al tratamiento con ABC, ATP, CBV-TP o sus distintas combinaciones. La figura muestra el pretratamiento de la sangre con bloqueantes de la ruta de señalización purinérgica; Suramin, A804598 y A317491 (A) o bloqueantes de los transportadores de ATP; Probenecid y Carbenexolona (B) durante (30-60 min), así como el posterior tratamiento de la sangre con vehículo (agua estéril), Abacavir (ABC), Adenosin trifosfato (ATP), Carbovir trifosfato (CBV-TP) o sus distintas combinaciones (4 h).

Asimismo, se ensayaron asociaciones de ABC, ATP y CBV-TP. Para ello, se combinaron concentraciones individuales de dichas moléculas que no produjeron una diferencia significativa en el estudio de la expresión de las moléculas de adhesión analizadas (ABC 1 μM, ATP 1 μM y CBV-TP 1 μM). En algunos casos se realizó el pretratamiento de la sangre con distintos bloqueantes de la señalización purinérgica previo al tratamiento con las distintas combinaciones (**Figura 29**).

Una vez concluidos los tratamientos, la sangre se incubó con los correspondientes anticuerpos a saturación: Mac-1 (CD11b), integrina β₂ (CD18) o con el anticuerpo control (IgG1) conjugados con FITC (fluoresceína isotiocianato) o PE (Ficoeritrina) durante 20 minutos, en oscuridad y a 4°C.

Posteriormente, las muestras se lisaron, lavaron y fijaron con la solución de lisis ("FACS Lysing Solution", BD Biosciences) y se analizó la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias mediante el citómetro de flujo (**Figura 27**).

4. CUANTIFICACIÓN DE ABC, CBV-TP Y NUCLEÓTIDOS.

La cuantificación absoluta de ABC, CBV-TP y de los nucleótidos (ATP, ADP, AMP y Adenosina) extracelulares e intracelulares se realizó por cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de triple quádrupolo (QqQ/MS) (Chen P et al., 2009, Zhang et al., 2014).

Las células HUVEC, PMN y PBMC (Ver material y métodos, 1. Aislamiento y cultivo celular) se trataron con ABC (20 μ M, 4h). A continuación, el pellet se extrajo con un volumen de H₂O/MeOH 40:60 (v/v), se agitó durante 20 seg con vórtex e incubó a -20°C durante 30 min. Después se homogeneizó por ultrasonidos en hielo durante 30 min, se centrifugó 10 min a 15000 rpm y 4°C; y se llevó a sequedad mediante un flujo de N₂, reconstituyéndose en H₂O y analizándose por LC-MS (Chen et al., 2009, Zhang et al., 2014).

En el caso de las muestras de sobrenadante, se extrajo un volumen de 100 μ L de muestra recién descongelada con 200 μ L de MeOH a 4°C y se procesó de igual forma que las muestras de pellet hasta su análisis por LC-QqQ (Chen P et al., 2009, Zhang et al., 2014).

En ambos casos el CBV-TP se mide como Carbovir (CBV) total (CBV-TP+CBV), debido a la dificultad de detección que presenta el CBV-TP, y requiere de tratamiento con fosfatasas (10 min) para degradarlo a CBV previo a su cuantificación.

4.1. Cuantificación de ABC, ATP y CBV-TP tras tratamiento con apirasa.

Para evaluar el efecto de la apirasa sobre los niveles de ABC, ATP y CBV-TP las células HUVEC, PMN o PBMC se trataron con ABC (20 μ M), ATP (20 μ M) o CBV-TP (20 μ M) y posteriormente con apirasa (1 U/l) durante 4 horas. A continuación, se recogieron muestras de sobrenadante a distintos tiempos (0, 1, 10, 60 y 240 min) para su posterior cuantificación por LC-QqQ (Ver material y métodos, 4. Cuantificación de nucleótidos extracelulares) (Chen et al., 2009, Zhang et al., 2014).

5. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS PARTICÍPES EN EL METABOLISMO EXTRACELULAR DE NUCLEÓTIDOS.

5.1. Estudio de la velocidad de degradación del ATP en presencia de ABC.

Para estudiar si ABC afecta a la degradación de nucleótidos extracelulares, las células HUVEC, PMN o PBMC se trataron con ABC (20 μ M, 4h) o con vehículo (agua estéril). A continuación, se eliminó el medio y añadió nuevo medio con ATP (20 μ M) y se recogieron muestras de sobrenadante a distintos tiempos (0,3,5,10,15 y 60 min) para la posterior cuantificación de nucleótidos por HPLC (Ver material y métodos. 4. Cuantificación de nucleótidos extracelulares).

5.2. Análisis de la expresión proteica.

El análisis de la expresión proteica de las diferentes enzimas partícipes en la degradación de nucleótidos a nivel extracelular -CD73, CD39, AK y NDPK- (**Figura 15**), se realizó mediante Western Blot y posterior análisis densitométrico.

Las **células HUVEC** cultivadas en placas redondas de 100 mm de diámetro, se trataron con ABC (1-30 μ M). Transcurrido este periodo, las células se disgregaron de forma mecánica para su recolección (Ver material y métodos, 1.1. Aislamiento células endoteliales).

Los **leucocitos (PMN o PBMC)** se aislaron como se ha indicado, obteniendo los precipitados de PMN o de PBMC tras centrifugación de las muestras (Ver material y métodos, 1.2. Aislamiento de leucocitos) que se trataron con ABC (1-30 μ M).

5.2.1. Obtención de los extractos proteicos.

Los precipitados de HUVEC, PMNs o PBMCs obtenidos se resuspendieron en 70 μ 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, 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. El sobrenadante obtenido fue alicuotado para su posterior utilización.

5.2.2. Cuantificación proteica. Ensayo del ácido bicinonínico (BCA).

Se basa en la reacción de reducción de iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuprosos (Cu^+) producida por las proteínas en condiciones alcalinas. Estos iones cuprosos formados reaccionan con el BCA (Ácido bicinonínico) observándose una coloración morada en los pocillos, la cual se puede medir por absorbancia (562 nm) y será proporcional al contenido proteico de las muestras.

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 μ L de las muestras diluidas o de la curva estándar de BSA con 200 μ L del reactivo de cuantificación proteica por pocillo, realizándose duplicados de cada una. 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).

5.2.3. Western Blot.

La primera fase es la **Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**, que se realizó utilizando el sistema “Mini-PROTEAN 3 Cell” (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los extractos citosólicos se mezclaron con tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8, glicerol 25 % v/v, SDS 10 %, β -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 30-50 μ 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 difundieron por la fase de concentración del gel y posteriormente a 120–140 V en la fase de resolución.

A continuación, se realizó la **transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE** desde el gel de poliacrilamida (10-15 %, según el tamaño de la proteína a analizar) a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m 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.

Tras realizar varios lavados en tampón TBS-T la membrana de nitrocelulosa se **incubó con el anticuerpo primario (Tabla 2)**, preparado en solución de bloqueo (BSA 5 % p/v o leche 5 % p/v) suplementada con azida sódica 0.02 % v/v (conservante), durante 2-3 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 conjugado con peroxidasa apropiado en cada caso **(Tabla 3)** durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en el análisis de proteínas por western blot.

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kDa)	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Actina	42	Conejo	1:1000	Sigma
CD39	58	Ratón	1:2000	Abcam
CD73	63	Conejo	1:2000	Abcam
E-NDP-K	18	Conejo	1:4000	Abcam
AK	23	Ratón	1:2000	Abcam

Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados en el análisis de proteínas por western blot.

ANTICUERPO	ESPECIE	REACTIVIDAD	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
ANTI-IGG1 conjugado con HRP	Cabra	Ratón	1:2000	Thermo Fisher
ANTI-IGG1 conjugado con HRP	Cabra	Conejo	1:5000	Vector Laboratories

5.2.4. 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.

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”.

5.3. Evaluación de la actividad enzimática.

Para el estudio de la actividad enzimática de CD73 y CD39 (**Figura 15**) en presencia de ABC, se emplearon derivados de eteno, en particular 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-monofosfato (E-AMP), 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-difosfato (E-ADP), 1,N⁶Etheno-adenosin-5'-trifosfato (E-ATP) y 1,N⁶Etheno-adenosin (E-ADO). Estos derivados de eteno se degradan de igual forma que sus derivados endógenos (ATP, ADP y AMP) a través de las enzimas que participan en la degradación de estos nucleótidos extracelulares, permitiendo evaluar la actividad específica de estas enzimas mediante la conversión de E-AMP a E-ADO para CD73 y de E-ATP a E-AMP para CD39 (Synnestvedt K et al., 2002).

Las células HUVEC, PMN o PBMC obtenidos (Ver material y métodos, 1. Aislamiento y cultivo celular) fueron tratados con ABC (20 µM). A su vez, se adicionó al medio E-AMP para medir la actividad de CD73 o E-ATP para medir la actividad de CD39 (concentración final de 5 µM) y se recogió el sobrenadante a distintos tiempos (0,10,30

y 60 minutos). Este se acidificó a pH 3.5 con HCL, centrifugó (10.000xg, 20 seg, 4°C) y congeló a -80°C hasta su análisis por HPLC. Éste consta de una bomba HP series 1050, un inyector manual de muestra y un detector de fluorescencia HP 1046A (300 nm excitación, 415 nm emisión). La actividad de CD39 se expresó como el porcentaje de E-ATP convertido en E-AMP y la actividad de CD73 se expresó como el porcentaje de E-AMP convertido en E-Ado a los distintos tiempos medidos (Synnestvedt K et al., 2002).

6. ESTUDIO DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS.

Los estudios de unión al receptor P2X₇ se realizaron a través de extractos purificados de membrana de células HUVEC. Se utilizaron ensayos de competición del radioligando [3H]A804598 específico para los receptores P2X₇. En ellos estudiamos como ABC, ATP y CBV-TP estarían uniéndose al receptor desplazando el radioligando.

6.1. Obtención de membranas.

A partir de células HUVEC se obtuvieron las membranas para los estudios de competición. Las células obtenidas de cordón umbilical humano (Ver material y métodos, 1.1. Aislamiento células endoteliales) se cultivaron en flask T-175 cm². Las células se despegaron de forma mecánica y se recolectaron tras centrifugación a 1400 rpm durante 5 min. El pellet obtenido se disgregó mediante sonicación en tampón Tris-HCL 50 mM, pH 7.4 (3 veces durante 30 s). A continuación, se centrifugó a 20.000 rpm, 4°C, 30 min. El pellet resultante se resuspendió en tampón Tris-HCL 50 mM, pH 7.4, que contiene BSA al 0,1% a una concentración de 2 mg/mL y se almacenó a -80° (Donnelly Roberts et al., 2009). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo del BCA (Ver material y métodos, 1.5.1.2 Cuantificación proteica).

6.2. Ensayos de competición.

Los ensayos de competición se realizaron incubando 75 µg de membrana en un volumen total de 250 µL de buffer (50 mM Tris-HCL 0,1% BSA pH 7.4) a 4°C durante 60 min con una concentración saturante (2.5 nM) del radioligando antagonista específico del receptor P2X₇, [3H]A804598 (36.2 Ci/mmol) (Donnelly Roberts et al., 2009). Esta incubación se realizó en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (0.1 µM–1 mM) de los potenciales ligandos del receptor P2X₇ (ABC, CBV-TP, ATP) o del ligando específico BzATP (**Tabla 4**). Una vez realizadas las incubaciones se realizó una filtración a través de filtrador automático para múltiples muestras (M24R, Valley Research Iberica, Madrid, Spain) (**Figura 30A**), recolectándose en los filtros Whatman GF/C los extractos de membrana marcados con el radioligando. Por último, los filtros se lavaron 5 veces

con 3 mL de buffer Tris-HCl (pH 7.4) y tras su posterior secado durante 24h se colocaron en viales a los que se añadió líquido de centelleo (4 mL, BCS, Amersham). La radioactividad retenida en los filtros se midió a través de un contador de centelleo (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer, Waltham, Ma, USA) (**Figura 30B**).

Tabla 4. Protocolo experimental de incubación con radioligando en los estudios de competición del receptor P2X₇.

[M] LIGANDO	VOLUMEN	BUFFER	[3H]A804598 2.5 nM	MEMBRANA 75 µg
CONTROL	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
BZATP 10 ⁻³	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
10 ⁻³	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
10 ⁻⁴	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
10 ⁻⁵	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
10 ⁻⁶	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL
10 ⁻⁷	25 µL	100 µL	25 µL	100 µL

En la tabla se muestra el protocolo experimental de incubación de los potenciales ligandos estudiados (BzATP, ABC, ATP y CBV-TP) con [3H] A804598 y 75 µg de HUVEC en 250 µL de Buffer total. Los tubos 1,2 corresponden con el grupo control, los tubos 3,4 nos proporcionaran la unión inespecífica del radioligando y los tubos 5-14 corresponden con las distintas concentraciones de los compuestos a ensayar (BzATP, ABC, ATP o CBV-TP).

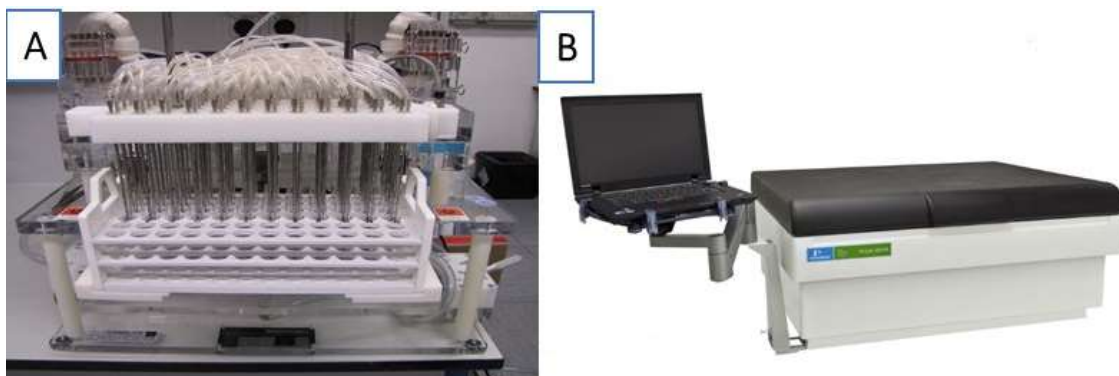


Figura 30. Sistema empleado para los estudios de unión al receptor P2X₇. (A) Filtrador automático para múltiples muestras (B) Contador de Centelleo Packard Tri-Carb.

MATERIAL Y MÉTODOS

La unión inespecífica se determinó en presencia y ausencia de BzATP (1 mM) para ABC, CBV-TP y ATP (0.1 μ M–1 mM). La radioactividad debida a uniones inespecíficas del [3H]A804598 se define como la radioactividad unida que no es desplazada por una concentración elevada de BzATP. La diferencia entre la unión total y la unión inespecífica es considerada como la unión específica del [3H]A804598 al receptor P2X₇ presente en las células HUVEC.

Los resultados se expresan como el porcentaje de unión específica de [3H]A804598 en presencia de los distintos compuestos analizados. A través de una regresión no lineal se obtuvieron los valores de pIC₅₀ (-log de la concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión del radioligando). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los resultados obtenidos en los ensayos de competición se analizaron a través del programa GraphPad 6.0 (Graphic Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

7. ESTUDIOS DE DOCKING DEL RECEPTOR P2X₇.

La metodología de “docking” nos permite el estudio de la interacción ligando-receptor mediante simulaciones computacionales. Se trata de un modelado molecular que permite predecir la conformación más favorecida de una molécula al unirse con otra para formar un complejo estable, así como la fuerza de unión de esta asociación.

7.1. Modelado del receptor.

El modelo por homología del receptor P2X₇ humano se realizó a partir del cristal del P2X₇ panda (ID: 5U2H). Las secuencias de aminoácidos del receptor P2X₇ empleadas para el estudio *in silico* son la secuencia humana y la del oso panda. Ambas secuencias se obtuvieron de la base de datos uniprot (<http://www.uniprot.org>), donde se encuentran identificadas; ID:Q99572 para el P2X₇ (P2RX7_HUMAN) humano e ID:G1M6C4 (G1M6C4_AILME) para el panda.

El primer paso corresponde con el **alineamiento de secuencia**, debido a que se tratan de especies diferentes, utilizando el programa T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat>), que permite el alineamiento de secuencias de ADN, ARN y aminoácidos para cuantificar la similitud entre las secuencias (Di Tommaso et al., 2011). El resultado de la cuantificación de la similitud entre las secuencias del receptor P2X₇ (Q99572 de humano y G1M6C4 de panda) mediante T-coffee fue de 99 sobre 100 (Di Tommaso et al., 2011) **(Figura 31)**.

MATERIAL Y MÉTODOS

Expresso alignment result

```
MSA
The multiple sequence alignment result as produced by T-coffee.
T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)
Cedric Notredame
SCORE=99
*
  BAD AVG GOOD
*
sp|Q99572|P2RX7 : 99
tr|G1M6C4|G1M6C : 99
cons : 9

sp|Q99572|P2RX7 -MPACCSQSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIFSVCYVCFALVSDKLYQRKEPVISSVHTKVKGIAEVKKEIVENGVKKL
tr|G1M6C4|G1M6C TMPACCSQSDVDFQYETNKVTRIQSTNYGTIKWIFHVLVFSYISFALISDKRYQKKEPLISSVHTKVKGIAEVKAEILENGMKKM
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 VHSVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCPEYPTRRRLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVCVVEGNGKTCVSAW
tr|G1M6C4|G1M6C VSGVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCPDFPTRRTICSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVCVYKERLTKTCVSAW
cons *

sp|Q99572|P2RX7 CPIAEVEEAPRALLNSAENFTVLKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPFRGLDIFRETGDNFSDVAIQGGI
tr|G1M6C4|G1M6C CPIDVEEDAPRALLNSAENFTVLKNNIDFPGHNYTTRNLPGVNITCTFHKTQNPQCPFRGLDIFRETGDNFSDVAIQGGI
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 MGIEIYDCNLDLRFHHCPRKYSFRRLDDKTTNVSYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVV
tr|G1M6C4|G1M6C MGIEIYDCNLDLRFHHCPRKYSFRRLDDKTTNESYPGYNFRYAKYYKENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFNVIQLAV
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 YIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSSNCCRSIYPCWCKCCQPCVVNEYRKKCESIVEPKPTLKYVSFVDESHIRMVNQQLLGR
tr|G1M6C4|G1M6C YIGSVISYFGLATVFIDILINTYSSKCCRSIYPCWCKCEYCAVNEYRKKQSEPIAEPKPTLKYVSFVDETHIRMVNDQQLLGR
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 SLQDVKGQEVPRPAMDFTDLRSLPLALHDTPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCGSCLPSQLPESHRCLEELCCRKPP
tr|G1M6C4|G1M6C SLQNVKGEKQVQPSVDFDLSRLSLSLCDPTPIPGQPEEMQLFSEVITPRSSNSPDWCQCGHCLPSQLPESHRCLEELCCRKKA
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 GACITTSSELFRKLVLSRHLVQLFLLYQEPLLDVDSNRLRHCAAYRCYATWRFSGQDMADFAILPSCCRWRIRREFPKSEGG
tr|G1M6C4|G1M6C GACITTSSEPFRLVLSRHLVQLFLLYQEPLLDVDSNRLRHCAAYRCYTTWRFSGPDLADFAILPSCCRWRIRREFPKSEGG
cons *****

sp|Q99572|P2RX7 YSGFKSPY
tr|G1M6C4|G1M6C YTGFSQPY
cons *****
```

Figura 31. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos del receptor P2X7 de humano y panda. La puntuación de satisfacción del resultado es de 99/100.

Tras este primer resultado donde se manifiesta que la similitud del receptor entre especies es casi del 100%, se puede realizar un **modelo por homología** a partir del cristal conocido del receptor P2X₇ de panda (ID: 5U2H) (**Figura 32**). Para ello se empleó el servidor SWISS-MODEL, que permite la generación de un modelo tridimensional del receptor a partir de su secuencia de aminoácidos, usando como base el cristal de panda y la secuencia proteica del receptor humano como diana (Karasawa et al., 2016).

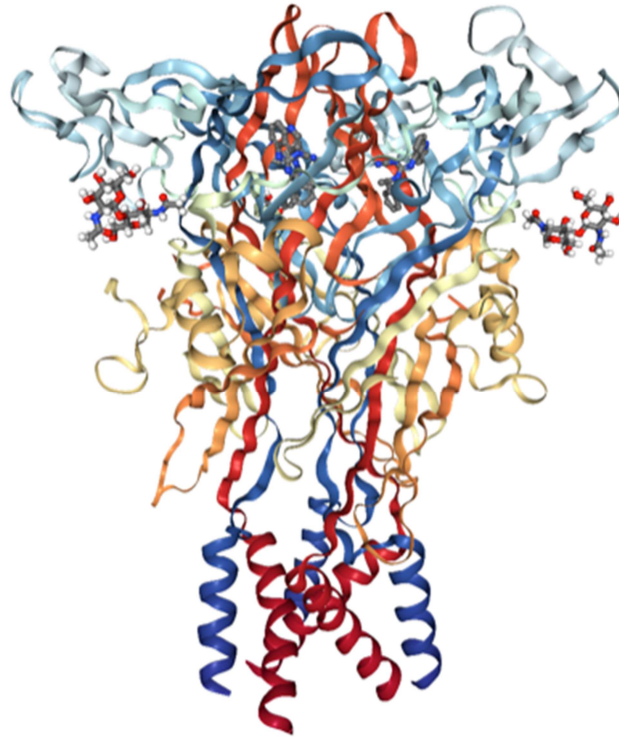


Figura 32. Imagen 3D del cristal del receptor P2X₇ (5U2H) del oso panda. Fuente original (<http://www.rcsb.org/3d-view/5U2H/1>).

El modelo generado consiste en un receptor trimérico, donde cada monómero está formado por 595 aminoácidos y consta de 5 puentes disulfuro (119-168, 129-152, 135-162, 216-226, 260-269). Además, se pueden distinguir tres regiones: citosólica, transmembrana y extracelular, siendo la región extracelular el dominio de interés implicado en la unión con el ligando, abarcando desde el aminoácido 47 al 334 (Karasawa et al., 2016) (**Figura 33**).

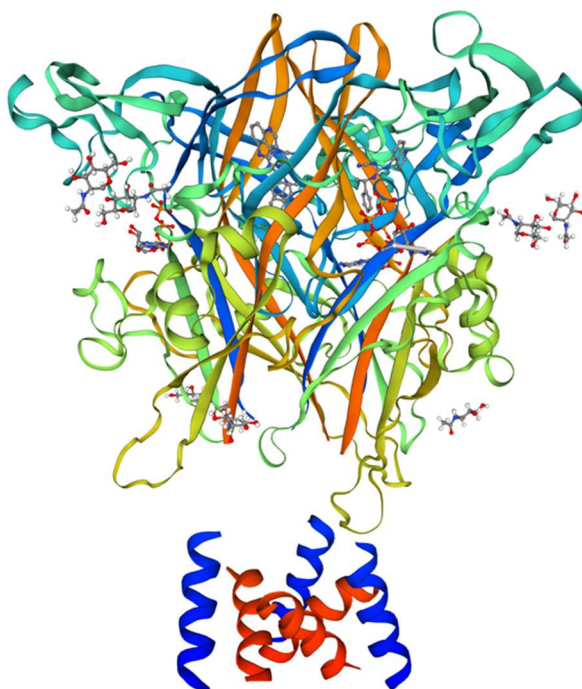


Figura 33. Modelo trimérico del Receptor P2X₇ humano generado a partir del cristal 5U2H. En la figura se aprecian las tres regiones del receptor (citósólica, transmembrana y extracelular).

7.2. Modelado de los ligandos estudiados.

La optimización de los ligandos se realizó a partir de la estructura 2D de los ligandos mediante el programa Maestro, que ofrece un entorno de modelado molecular que permite determinar la estructura tridimensional y la geometría de los ligandos. A continuación, se utilizó el campo de fuerzas MMFFs, el cual se trata de un modelo de átomos enteros. Este campo asigna una carga electrostática dieléctrica constante de $\epsilon = 1$ por defecto. Este modelo está parametrizado para un amplio abanico de grupos funcionales orgánicos y proteínas, siendo el más adecuado para estudios de receptores de fármacos.

Con el modelo generado y junto con las estructuras optimizadas de los posibles ligandos evaluados experimentalmente, que son ABC, CBV-TP, BzATP, ATP y el antagonista específico del receptor P2X₇ A804598 (**Figura 34**) se procedió a los estudios de “docking”.

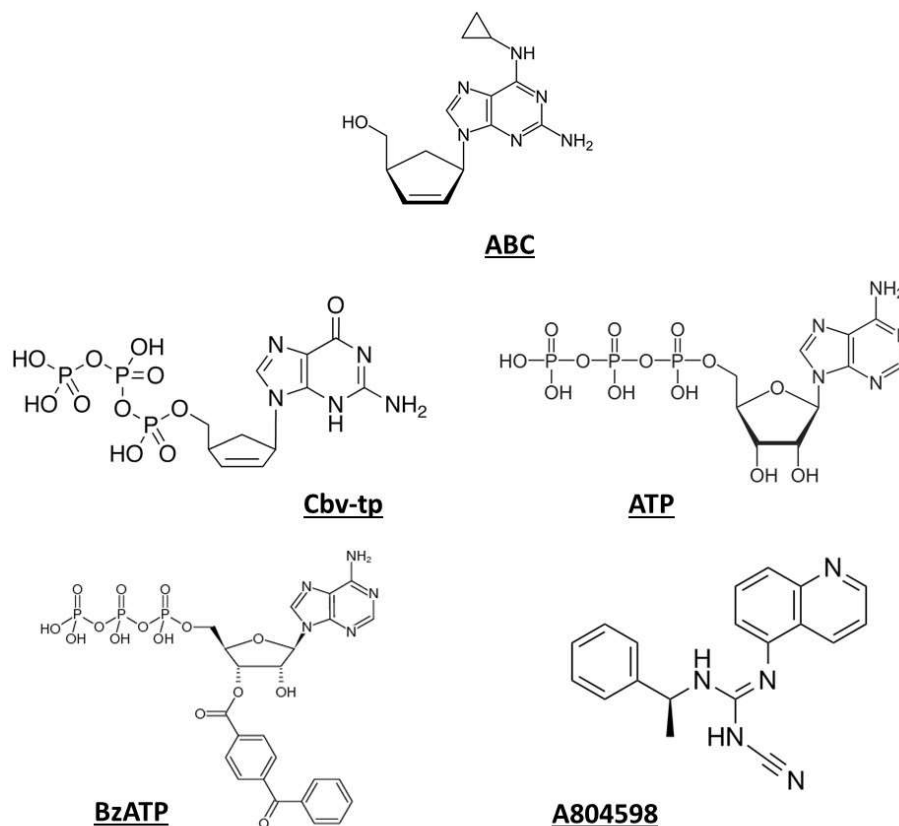


Figura 34. Estructura de los distintos ligandos empleados en los estudios de docking. Abacavir (ABC), Carbovir trifosfato (CBV-TP), Adenosin trifosfato (ATP), BzATP y A804598.

Posteriormente, se asignaron las cargas parciales Gasteiger con AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu>).

7.3. Docking.

El “Docking” consiste en un modelado molecular que permite predecir la conformación preferida de una molécula al estar en unión con otra, con el fin de formar un complejo estable, así como la fuerza de unión de esta asociación. La afinidad de los ligandos por el receptor se calcula mediante la energía libre de unión que depende de factores estéricos, hidrofóbicos y puentes de hidrogeno, computando interacciones inter e intramoleculares. Cuando un receptor y su ligando interactúan dan lugar a un complejo molecular, esta interacción se da de tal modo que forme el complejo más estable energéticamente. Cuanto más estable sea el complejo, menor será la energía libre de unión.

BLOQUE II. ESTUDIOS IN VIVO

1. MICROSCOPIA INTRAVITAL

Para los estudios de microscopía intravital se usaron ratones wild-type (WT) C57BL/6 machos (Charles River Laboratories, Spain) o knockout (KO) P2X₇ KO homocigotos (B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Estos ratones son viables, fértiles y de tamaño normal sin ninguna anomalía física (Solle et al., 2001).

Los ratones (22-30 g) de entre 8-12 semanas de edad, se anestesiaron por vía intraperitoneal (i.p) con una mezcla de xilacina clorhidrato 10 mg/kg y ketamina clorhidrato (200 mg/kg). Tras realizar una cirugía, el músculo cremáster se extendió sobre un pedestal traslúcido que permite su transiluminación (**Figura 35**). Éste se encuentra superfundido continuamente a una velocidad de flujo de 2 mL/min con una solución tampón bicarbonatada (pH 7.4 y 37°C) (de Pablo et al., 2013). Esta preparación se observó a través de un microscopio intravital ortostático (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Nikon, Holanda) que lleva incorporada una cámara (Sony SSC-C350P; Sony, Germany). Las imágenes (5 min) de las vénulas (diámetros 25 - 40 µm) o arteriolas (diámetros 20 - 35 µm) del cremáster sin ramificar (Hickey MJ et al., 1999) (medidos mediante video caliper [Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, USA]) se grabaron digitalmente mediante el programa NIS Elements AR program (de Pablo et al., 2013).



Figura 35. Zona de cremáster seleccionada para microscopía intravital. En la figura se observa el cremáster de ratón empleado para el estudio de la interacción leucocito-endotelio y la formación del trombo.

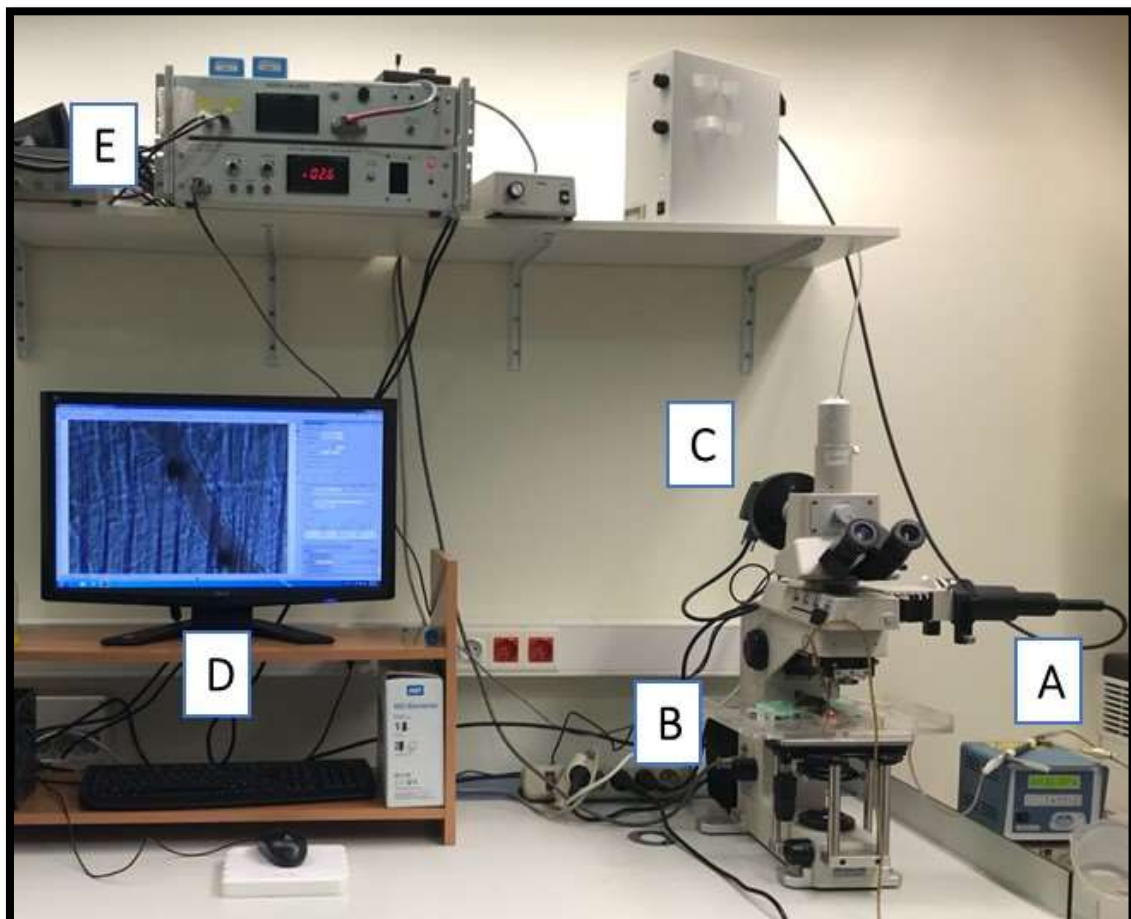


Figura 36. Sistema de microscopía intravital. A: Baño termostático, B: Pedestal translúcido, C: Videocámara, D: Monitor de ordenador, E: "Video Caliper" y "Optical Doppler Velocimeter".

1.1. Modelo de trombosis mediante Cloruro Férrico (FeCl₃).

El modelo de inducción de daño vascular por FeCl₃ es uno de los modelos de trombosis más utilizados que engloba daño endotelial junto a activación plaquetaria y leucocitaria (Westrick et al., 2007). El FeCl₃ cuando actúa sobre los vasos sanguíneos es capaz de producir un daño oxidativo en las células vasculares, dando lugar a pérdida en la función endotelial frente a leucocitos y plaquetas circulantes. A concentraciones bajas, el FeCl₃ no es capaz de producir este daño, requiriendo de factores externos para la formación del trombo. El tiempo requerido para la oclusión del vaso nos permite medir de forma cuantitativa tanto el daño vascular como la activación plaquetaria, parámetros relevantes para el desarrollo de procesos trombóticos (Projahn et al., 2012).

1.2. Parámetros leucocitarios determinados.

Se analizaron los siguientes parámetros leucocitarios (**Figura 8**):

- **Velocidad de rodamiento leucocitario:** es el tiempo que tarda un leucocito en fase de rodamiento en recorrer 100 μm de vénula. Se calcula haciendo la media de la velocidad de 10 leucocitos. Se expresa en $\mu\text{m/s}$.
- **Rodamiento leucocitario:** es el número de leucocitos que circulan a una velocidad inferior a la de los eritrocitos porque están interaccionando con el endotelio vascular. Se determina contabilizando el número de leucocitos que pueden ser visualizados en un punto de referencia preestablecido de la vénula durante 1 minuto. Se expresa en *células/min*.
- **Adhesión leucocitaria:** es el número de leucocitos que permanecen estacionados o tienen contacto estable con el endotelio venular durante un periodo igual a superior a 30 segundos en 100 μm de vaso. Se expresa en *células/mm²* (**Figura 24**).
- **Migración leucocitaria:** número de leucocitos que se extravasan de la vénula al tejido circundante. Se expresa en *células/campo*.

1.3. Parámetros hemodinámicos determinados.

Se analizaron los siguientes parámetros hemodinámicos (Orden et al., 2014):

- **Diámetro venular (Dv):** se mide con un “Video Caliper” (Microcirculation Research Institute). Se expresa en μm .
- **“Shear rate” (γ):** es la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes venulares. Se expresa en $segundos^{-1}$ y se calcula según la definición Newtoniana:

$$\gamma = 8 (V_{mean} Dv^{-1}) s^{-1}$$
 Donde:
Dv: es el diámetro de la vénula.
V_{mean}: es el 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).
- **PAM:** es la presión que ejerce la sangre sobre la pared de las arterias. Se mide mediante un transductor de presión (Spectramed Stathan P-23XL) conectado a un polígrafo (GRASS RPS7C8B, Quincy). Se expresa en $mm Hg$.
- **Tiempo de oclusión (segundos):** tiempo transcurrido desde la adición de $FeCl_3$ hasta la formación del trombo, que concluye con la parada del flujo sanguíneo medido a través del “Shear rate”.

1.4. Protocolo experimental.

Para evaluar los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio “in vivo” se administraron concentraciones clínicamente relevantes de ABC (2.5-7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalente a 10-30 μM) (Wang et al., 2009, Moyle et al., 2009) o suero fisiológico (control, 100 μL) de forma intraescrotal (i.e) durante 4h. Esta ruta de administración se seleccionó al permitir bañar de forma directa los vasos del cremáster (Hughes et al., 2010). En algunos casos, ABC se administró de forma oral a dosis descritas (100-200 mg/kg, 4h) que reproducen en ratón las concentraciones plasmáticas obtenidas en humano tras la administración de la dosis clínica (600 mg) mediante una fórmula que permite la conversión de las dosis de humanos en ratones (Reagen and Shaw et al., 2009). Con el fin de determinar la implicación de los receptores de ATP en los efectos de ABC, los animales fueron pretratados con los siguientes antagonistas de los receptores de ATP a dosis descritas para bloquear los parámetros leucocitarios (Brandely et al., Coddou et al., 2011, Díaz-Hernández et al., 2009, Neelands et al., 2003): no específico de los receptores P2 (suramin 400 mg/kg, 60 min), específico para los receptores P2X₇ (A804598 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 min o Brilliant Blue G - BBG - 45 mg/kg, 30 min) y P2X_{2/3} (A317491 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 min), previo a la administración de ABC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalente a 20 μM) por vía i.e.

A las 3.5 horas de tratamiento, los animales se anestesiaron y se realizó la técnica de microscopía intravital descrita anteriormente. Una vez concluida la cirugía y tras un periodo de estabilización de 30 minutos, se determinaron los parámetros leucocitarios y hemodinámicos descritos previamente a las 4 horas (**Figura 37**).



Figura 37. Protocolo experimental de microscopía intravital para la evaluación de los efectos de ABC en cremáster de ratón. Los ratones se trataron con vehículo (suero fisiológico) o ABC (i.e., 10-30 µM y oral, 100/200 mg/kg) durante 4h. En algunos casos los ratones se pretrataron con distintos compuestos bloqueantes de la señalización purinérgica; no específico de los receptores P2 (suramin, i.p, 400 mg/kg, 60 min), específico para el receptor P2X₇ (A804598, 1 µg/kg, 30 min o Brilliant Blue G - BBG - 45 mg/kg, 30 min) y para el receptor P2X_{2/3} (A317491, 0,1 µg/kg, 30 min). Transcurridas 3.5 h se realizó la cirugía de los animales y tras un periodo de estabilización de 30 minutos se determinaron los parámetros leucocitarios y hemodinámicos (4 h).

Para la evaluación del efecto sobre el proceso trombótico se seleccionaron las arteriolas (diámetro 20 - 35 µm) a las que se les añadió la solución de FeCl₃ sobre el cremáster. Se utilizaron distintas concentraciones de FeCl₃ (80 µL, 25-75 mM), y se seleccionó la concentración de 25 mM al no modificar los parámetros hemodinámicos en ratones que no habían sufrido un tratamiento previo. Una vez añadido el FeCl₃ se grabaron imágenes hasta que tuvo lugar la oclusión del vaso o hasta un máximo de 8 minutos si no se produce la oclusión, midiendo durante este tiempo el *shear rate*.

1.5. Medida de las concentraciones plasmáticas de ABC.

Para la determinación de los niveles de ABC en el plasma de ratón, se extrajeron muestras de sangre de aorta al final de cada experimento y se centrifugaron (12.000xg, 30 min, 4°) para la obtención del plasma, el cual se analizó mediante UHPLC 6495 acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrúpulo (QqQ/MS) (Chen et al., 2009, Zhang et al., 2014).

MATERIAL

En las tablas se muestran las casas comerciales de las cuales se obtuvieron los animales, fármacos y compuestos, anticuerpos frente a humano y reactivos utilizados, respectivamente.

Tabla 5: Animales utilizados.

Animales	CASA COMERCIAL
Ratones C57BL/6	Charles River
Ratones P2X ₇ KO homocigotos (B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J)	Jackson laboratory

Tabla 6: Fármacos y compuestos utilizados.

FÁRMACOS Y COMPUESTOS	CASA COMERCIAL
A317491	Sigma
A804598	Sigma
Abacavir	Sequoia Research
Adenosina	Sigma
Adenosin monofosfato	Sigma
Adenosin difosfato	Sigma
Adenosin trifosfato	Sigma
Apirasa	Sigma
AR-C118925XX	Sigma
BBG	Sigma
BzATP	Sigma
Carbovir trifosfato	Moravek Inc.
Carbenexolona	Tocris
CGS-21680	Tocris
EGTA	Sigma
Gap19	Tocris
MRS2159	Sigma
NF023	Sigma
NF340	Tocris
OxATP	Sigma
Panx ¹⁰	Tocris
Probenecid	Tocris
Suramin	Sigma

Tabla 7: Reactivos y material utilizados.

REACTIVOS	CASA COMERCIAL
1,N ⁶ Etheno-adenosin	Biolog
1,N ⁶ Etheno-adenosin-5'-monofosfato	Biolog
1,N ⁶ Etheno-adenosin-5'-difosfato	Biolog
1,N ⁶ Etheno-adenosin-5'-trifosfato	Biolog
[3H]A804598	Moravek Inc.
ADP	Sigma
Agua para cultivos	Sigma
Albúmina Sérica Humana (HSA, Albuminate 25 %)	Sigma
Amicon Ultra-2 Centrifual Filter Devices	Merk Milipore
APCP	Sigma
Cloruro Ferrico	Sigma
Colagenasa	Gibco
Cubre de plástico de 25 mm de diámetro	Nunc
Dextrano	Sigma
Dulbecco's PBS con Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS ⁺)	Lonza
Dulbecco's PBS sin Ca ²⁺ y Mg ²⁺ (DPBS ⁻)	Lonza
EBM-2Medio de Cultivo	Lonza
Etanol	J. T. Baker
Fibronectina	Sigma
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare
Gases	AirLiquide
HBSS	Lonza
Heparina Sódica 5 %	Mayne Pharma
Hidróxido Amónico	Sigma
KCl	Panreac
Metanol	J.T. Baker
MgSO ₄	Panreac
NaCl	Panreac
NaHCO ₃	Panreac
PBS	Gibco
RPMI 1640 suplementado con 20 mM HEPES	Sigma
Solución de Lisis	BD Biosciences
Suero Fetal Bovino	Lonza
Suero Fisiológico (NaCl 0.9 %)	Braun
Tripsina	Gibco
Trizma	Sigma
Tubos con Citrato Sódico	BD Vacutainer

Tabla 8: Anticuerpos frente a humano utilizados.

ANTICUERPOS FRENTE A HUMANO	CASA COMERCIAL
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD11b PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente a CD18 FITC	BD Biosciences

COMITÉS ÉTICOS

Tanto el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia como el de Bioseguridad de la Universitat de València aprobaron el proyecto dentro del cual se enmarca este estudio con muestras de cordón umbilical humano y sangre humana. Todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado y no se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, raza o etnia entre los diferentes grupos.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia, así como de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana aprobó los estudios con animales de experimentación realizados en este estudio. Además, estos estudios están en concordancia con las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación de laboratorio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Se realizaron un número de experimentos ≥ 4 . Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza One-Way ANOVA, con la posterior corrección de Newman-Keuls, considerándose que la diferencia entre grupos es significativa cuando $p < 0.05$. En algunos casos, los resultados se expresaron como porcentaje del control (%) considerando el vehículo como el 100%. En algunos casos que se indican el análisis estadístico se realizó utilizando un análisis t test no pareado.

IV. RESULTADOS

BLOQUE I. ESTUDIOS IN VITRO

1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS PRODUCIDOS POR ABC.

1.1. Efecto sobre la interacción leucocito-endotelio producida por ABC.

Empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo ampliamos el estudio de la implicación de los receptores purinérgicos en el efecto de ABC analizando la potencial participación de los receptores P2Y y confirmando la del receptor P2X₇. Para ello se pretrataron tanto las células endoteliales como los leucocitos con diferentes antagonistas de los receptores P2Y implicados en procesos inflamatorios y un nuevo antagonista específico del receptor P2X₇.

Como ya habíamos comentado, ABC 20 µM indujo una disminución significativa de la velocidad de rodamiento, así como un aumento significativo del rodamiento y adhesión leucocitaria al endotelio (**Figura 38**). La interacción leucocito-endotelio inducida por ABC fue completamente abolida cuando pretratamos ambos tipos celulares con un antagonista del receptor P2X₇ (A804598) tanto en PMN (**Figuras 38 A, C y E**) y en PBMC (**Figuras 38 B, D y F**). Sin embargo, no se observó ninguna modificación con el pretratamiento de las células con antagonistas de los receptores purinérgicos P2Y; antagonista del receptor P2Y₁₁ (NF340) y el antagonista del receptor P2Y₂ (AR-C118925XX).

Estos resultados confirman que el efecto de ABC sobre la interacción leucocito endotelio está mediado por el receptor P2X₇ y descartan la participación de los P2Y.

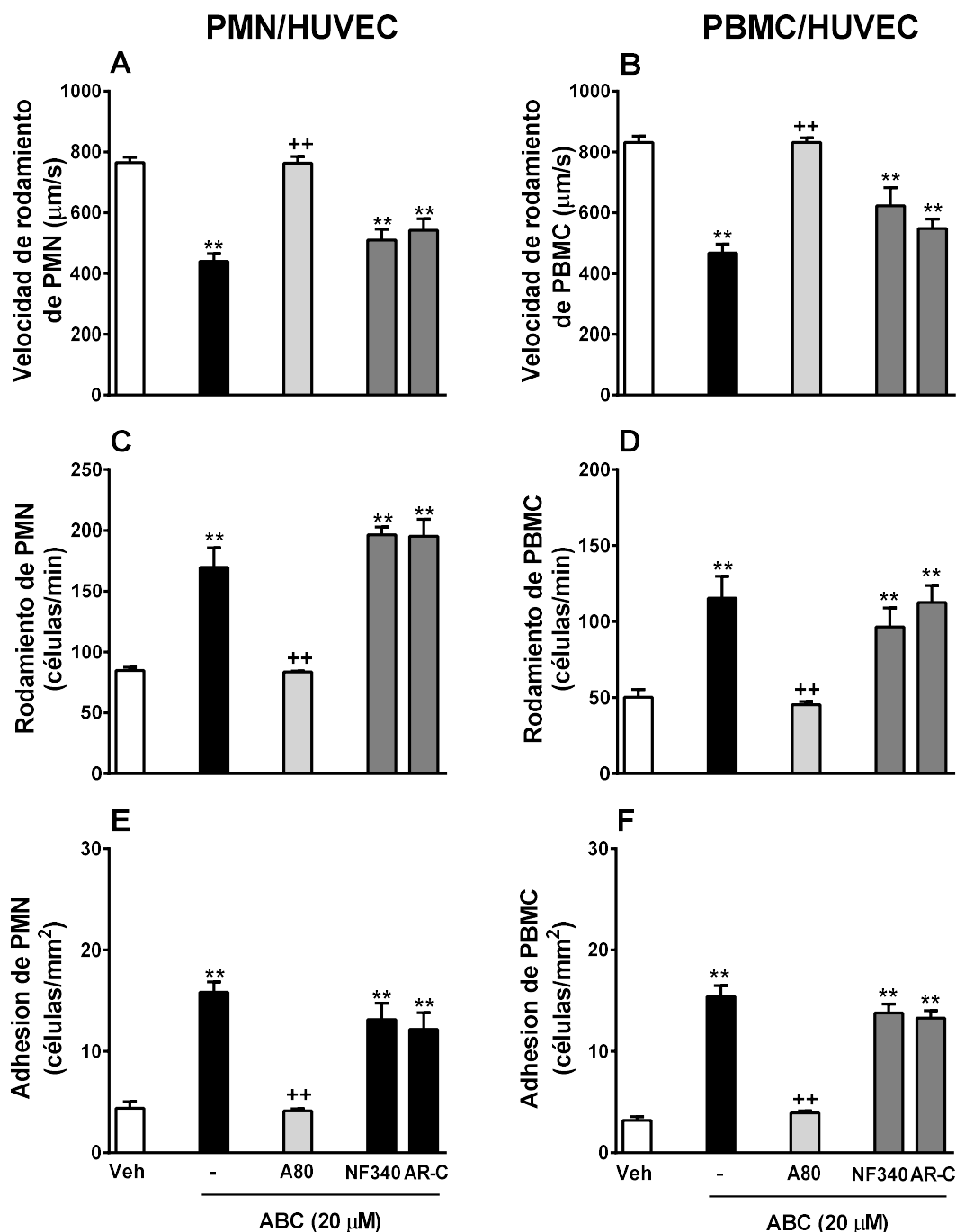


Figura 38. Análisis de la implicación de los receptores purinérgicos en los efectos producidos por ABC sobre la interacción leucocito-endothelium. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma independiente con: A804598 (antagonista específico del receptor P2X₇), NF340 (antagonista específico del receptor P2Y₁₁) y AR-C118925XX (AR-C, antagonista específico del receptor P2Y₂) 30 min previo al tratamiento con abacavir (ABC, 20 μM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PMN y PBMC al endotelio, respectivamente. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$) ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

1.2. Efecto sobre el aumento de la expresión Mac-1 (CD11b/CD18) en leucocitos humanos producida por ABC.

Mac-1 es una molécula de adhesión tipo integrina β_2 , caracterizada por poseer una subunidad específica α (CD11b) y una subunidad común a las integrinas β_2 (CD18), siendo su ligando principal en el endotelio ICAM-1 (CD54).

Como hemos comentado, la interacción leucocito-endotelio producida por ABC está mediada por la interacción entre Mac-1 (CD11b/CD18) leucocitaria e ICAM-1 endotelial (de Pablo et al., 2010). Además, ABC produce un aumento en la expresión de las dos subunidades de Mac-1 (CD11b y CD18) en leucocitos (neutrófilos y monocitos) de sangre humana (de Pablo et al., 2010) (**Figura 39**). Para determinar si el aumento de la expresión de Mac-1 está mediado por los receptores P2X₇, analizamos en sangre entera procedente de donantes sanos mediante citometría de flujo el efecto de distintos antagonistas de los receptores purinérgicos previo al tratamiento con ABC.

El antagonista no específico de los receptores P2X suramin (Sur) y el antagonista específico de los receptores P2X₇, A804598 (A80) bloquearon el aumento de la expresión de CD11b y CD18 inducido por ABC, mientras que el antagonista de los receptores P2X₂₋₃, A317491 no afectó al efecto a la expresión de CD11b/CD18 en neutrófilos (**Figuras 39 A y B**) ni en monocitos (**Figuras 39 C y D**).

Estos resultados sugieren la implicación del sistema purinérgico, en concreto de los receptores P2X₇, en la activación de la expresión de Mac-1 causada por ABC.

RESULTADOS

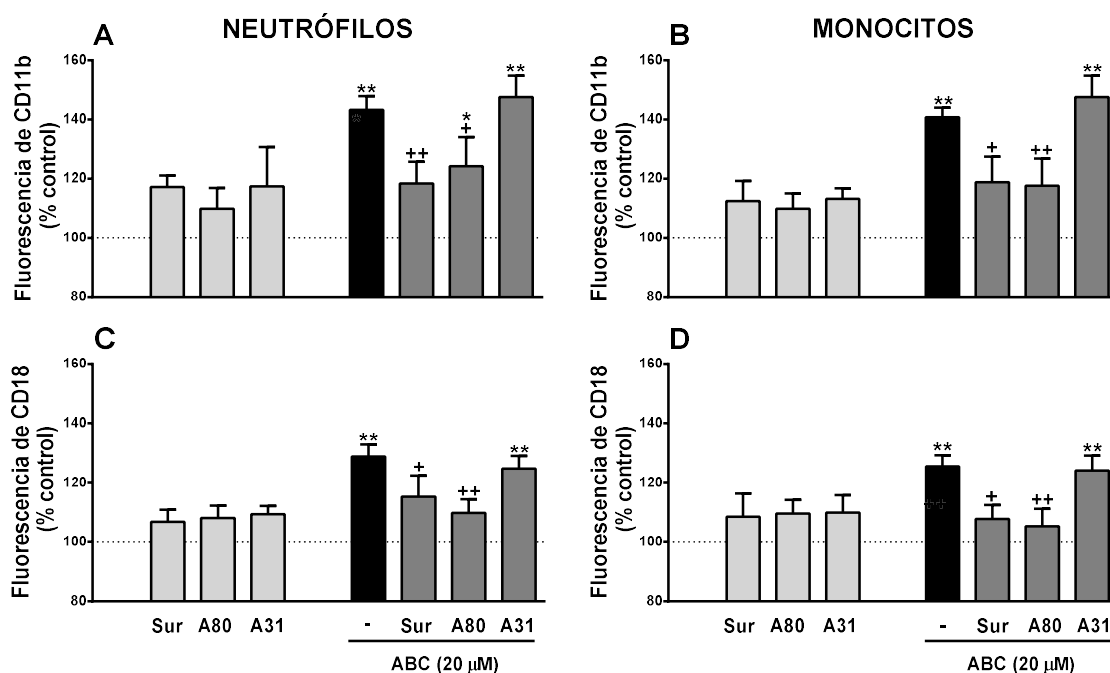


FIGURA 39. Implicación de los receptores purinérgicos en la expresión de Mac-1 leucocitaria inducida por ABC. La sangre entera se trató con abacavir (ABC, 20 μ M, 4h) y se cuantificó la expresión de las subunidades de Mac-1, CD11b (A y B) y CD18 (C y D) en neutrófilos y monocitos, respectivamente. En algunos casos, la sangre fue pretratada con suramin (Sur, antagonista inespecífico de receptores P2X/Y, 1h), A804598 (A80, antagonista específico del receptor P2X₇, 30 min) o A317491 (A31, antagonista específico de los receptores P2X₂₋₃, 30 min) antes del tratamiento con ABC. Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratados con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 6$). ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

2. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES P2X₇ IMPLICADOS EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE ABC.

El efecto producido por ABC sobre la interacción leucocito-endotelio está mediado por los receptores P2X₇ y no por otros subtipos de receptores P2X/P2Y. Por tanto, y siguiendo el mismo protocolo experimental empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo, estudiamos la importancia de la localización celular de los receptores P2X₇ en leucocitos o HUVEC.

Por ello, antes del tratamiento con ABC en ambos tipos celulares pretratamos de forma individual o de forma conjunta los leucocitos (PMN o PBMC) o las células endoteliales con antagonistas de los distintos receptores P2X y con diversos compuestos que participan en la ruta del ATP.

El pretratamiento de los leucocitos (PMN o PBMC) con A804598 y con suramin reduce significativamente el efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio de forma muy similar a cuando se pretratan ambos tipos celulares (**Figuras 40 y 41**). El pretratamiento individual de las células HUVEC con A804598 y suramin produce una disminución del efecto producido por ABC, observado un grado de inhibición del efecto menor que con el pretratamiento individual de los leucocitos, tanto de PMN (**Figura 40**) como de PBMC (**Figura 41**). Respecto al resto de antagonistas utilizados, el antagonista del receptor P2X₇ (BGG) da mayor relevancia al P2X₇ en leucocitos confirmando este resultado, mientras que los antagonistas de los receptores P2X₁₋₄ (NF023) y antagonista del receptor P2X₁ (MRS2159) no tuvieron ningún efecto sobre los parámetros evaluados (**Tabla 9 y 10**). El compuesto que hidroliza ATP (apirasa), el quelante de Ca²⁺ (EGTA) y el agonista de los receptores de Adenosina (CGS-21680) revirtieron significativamente los efectos de ABC con el pretratamiento individual de PMN y PBMC (**Tabla 10**).

Estos resultados dan una relevancia mayor a los receptores P2X₇ presentes en los leucocitos en la interacción leucocito-endotelio inducida por ABC, sin excluir a los receptores presentes en las células HUVEC.

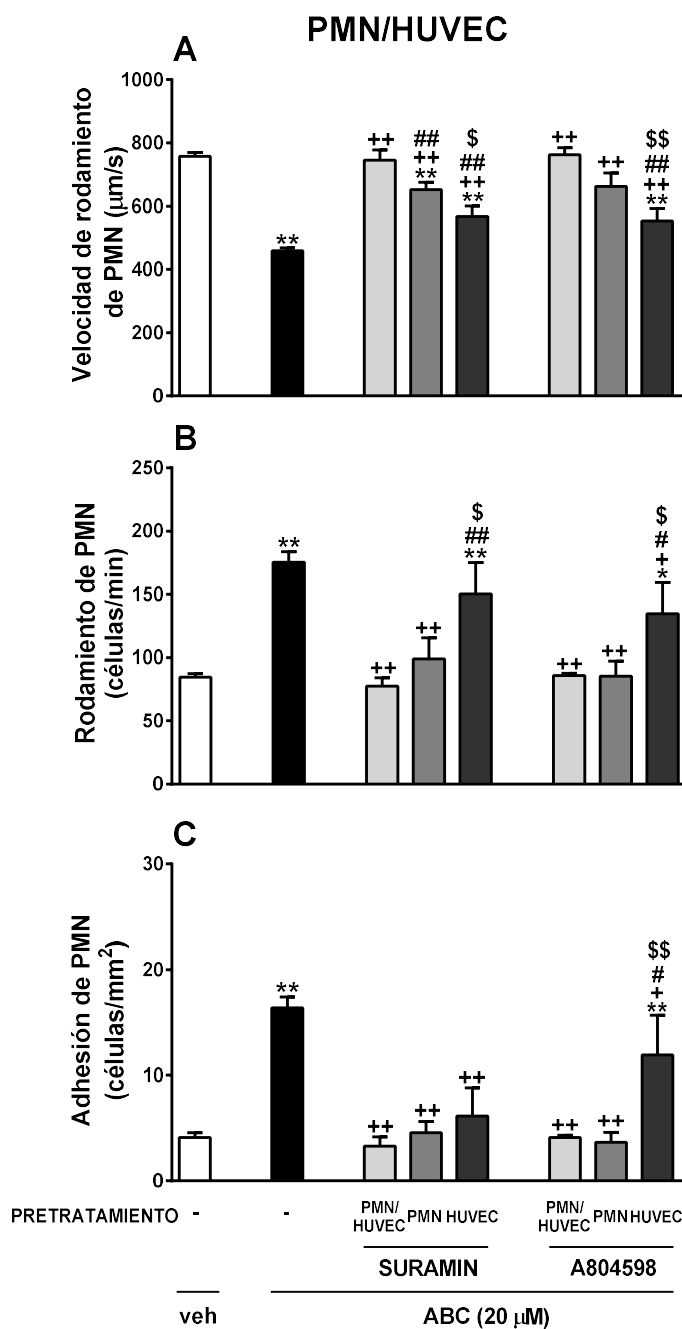


Figura 40. Relevancia de la localización celular de los receptores P2X₇ en el efecto producido por ABC sobre la interacción PMN-endothelium. HUVEC o PMN, fueron tratados conjuntamente o de forma individual con suramin (antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y, 1h) o A804598 (antagonista específico del receptor P2X₇, 30 min) previo al tratamiento con abacavir (ABC, 20 µM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de PMN al endotelio. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥4) **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. *p<0.05 o **p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. #p<0.05 o ##p<0.01 respecto al grupo pretratado con el correspondiente antagonista en ambos tipos celulares. §p<0.05 o §§p<0.01 respecto al grupo pretratado con el correspondiente antagonista en PMN. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

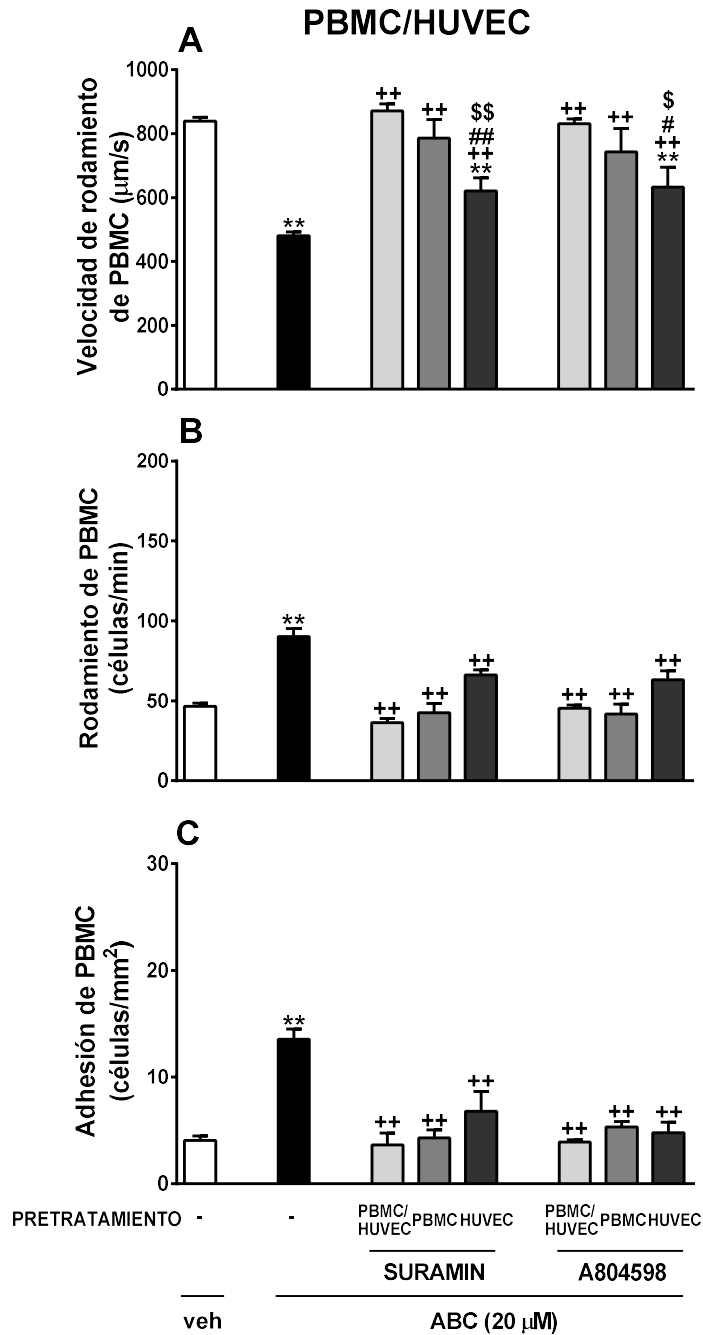


Figura 41. Relevancia de la localización celular de los receptores P2X₇ en el efecto producido por ABC sobre la interacción PBMC-endotelio. HUVEC o PBMC, fueron tratados conjuntamente o de forma individual con suramin (antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y, 1h) o A804598 (antagonista específico del receptor P2X₇, 30 min) previo al tratamiento con abacavir (ABC, 20 µM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de PMN al endotelio. 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. #p<0.05 o ##p<0.01 respecto al grupo pretratado con el correspondiente antagonista en ambos tipos celulares. \$p<0.05 o \$\$p<0.01 respecto al grupo pretratado con el correspondiente antagonista en PBMC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

Tabla 9. Implicación de los receptores purinérgicos de las células endoteliales en los efectos de ABC.**PMN**

TRATAMIENTO	VELOCIDAD DE RODAMIENTO DE PMN ($\mu\text{m/s}$)	RODAMIENTO DE PMN (células/min)	ADHESIÓN DE PMN (células/ mm^2)
VEHÍCULO	733.5 \pm 18.5	93.1 \pm 5.0	4.2 \pm 1.1
ABC	439.4 \pm 13.4**	199.1 \pm 13.9**	17.8 \pm 2.1**
ABC+BGG	483.7 \pm 39.9**	166 \pm 13.6	13.49 \pm 3.5
ABC+NF023	464.2 \pm 25.2**	178.8 \pm 25.12*	15.9 \pm 1.6*
ABC+MR2159	461.2 \pm 32.7**	196.3 \pm 27.13*	16.7 \pm 3.5*
ABC+EGTA	516.4 \pm 37.4**	159.0 \pm 22.4	9.9 \pm 2.9
ABC+APIRASA	541.6 \pm 40.1**	135.2 \pm 16.4	12.9 \pm 1.2
ABC+CGS-21680	645.2 \pm 42.3 ⁺	90.2 \pm 22.3 ⁺	3.4 \pm 0.6 ⁺⁺

PBMC

TRATAMIENTO	VELOCIDAD DE RODAMIENTO DE PBMC ($\mu\text{m/s}$)	RODAMIENTO DE PBMC (células/min)	ADHESIÓN DE PBMC (células/ mm^2)
VEHÍCULO	844.9 \pm 17.6	49.6 \pm 2	4.1 \pm 0.7
ABC	489.1 \pm 20.4**	88.5 \pm 4.2**	12.9 \pm 2*
ABC+BGG	635.5 \pm 39.7*	68.3 \pm 5.5	6.8 \pm 0.7
ABC+NF023	555.7 \pm 35.1**	73.1 \pm 3.6*	9.1 \pm 1.6
ABC+MR2159	575.0 \pm 43.4**	72.7 \pm 3.9*	6.1 \pm 1.9
ABC+EGTA	701.3 \pm 49.5 ⁺⁺	67.5 \pm 4.8	6.7 \pm 1.3
ABC+APIRASA	690.8 \pm 33.7 ⁺⁺	57.6 \pm 8.0 ⁺⁺	6.3 \pm 1.8
ABC+CGS-21680	734.1 \pm 39.2 ⁺⁺	55.9 \pm 5.2 ⁺⁺	5.1 \pm 0.9 ⁺

Los leucocitos (PMN o PBMC) y las HUVEC se trataron con ABC 20 μM o vehículo durante 4h. En algunos casos, las células HUVEC se pretrataron individualmente con distintos antagonistas de los receptores purinérgicos o distintos compuestos que participan en la ruta del ATP antes del al tratamiento de ambos tipos celulares con ABC. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión de PMN o PBMC al endotelio. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$) * $p < 0.01$ o ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. ⁺ $p < 0.05$ o ⁺⁺ $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls

Tabla 10. Implicación de los receptores purinérgicos de los leucocitos en los efectos de ABC.**PMN**

TRATAMIENTO	VELOCIDAD DE RODAMIENTO DE PMN ($\mu\text{m/s}$)	RODAMIENTO DE PMN (células/min)	ADHESIÓN DE PMN (células/ mm^2)
VEHÍCULO	771.3 \pm 29.4	77.0 \pm 5.3	3.6 \pm 0.6
ABC	441.0 \pm 13.5**	173.6 \pm 10.7**	15.2 \pm 2.1**
ABC+BGG	600.4 \pm 47.9 ⁺	119.0 \pm 10.1 ⁺	4.1 \pm 0.5 ⁺⁺
ABC+NF023	497.8 \pm 43.6**	154.0 \pm 28.8**	11.1 \pm 1.6*
ABC+MR2159	516.3 \pm 39.3**	171.8 \pm 28.8**	11.1 \pm 1.9*
ABC+EGTA	612.4 \pm 19.1 ⁺	109.9 \pm 13.4 ⁺	6.2 \pm 1.9 ⁺⁺
ABC+APIRASA	665.2 \pm 38.8 ⁺⁺	67.9 \pm 10.8 ⁺⁺	4.7 \pm 0.7 ⁺⁺
ABC+CGS-21680	708.0 \pm 63.6 ⁺⁺	93.2 \pm 15.5 ⁺	2.8 \pm 0.5 ⁺⁺

PBMC

TRATAMIENTO	VELOCIDAD DE RODAMIENTO DE PBMC ($\mu\text{m/s}$)	RODAMIENTO DE PBMC (células/min)	ADHESIÓN DE PBMC (células/ mm^2)
VEHÍCULO	838.6 \pm 26.9	38.4 \pm 2.6	4.8 \pm 0.9
ABC	479.4 \pm 16.5**	72.5 \pm 2.6**	12.5 \pm 1.5**
ABC+BGG	690.5 \pm 71.14 ⁺	49.8 \pm 7.5 ⁺⁺	6.1 \pm 1.9 ⁺⁺
ABC+NF023	491.4 \pm 31.7**	60.6 \pm 2.2*	9.3 \pm 1.3
ABC+MR2159	502.8 \pm 51.1**	63.8 \pm 5.1*	9.3 \pm 1.5
ABC+EGTA	703.1 \pm 75.5 ⁺	48.6 \pm 6.5 ⁺⁺	8.2 \pm 1.1
ABC+APIRASA	700.0 \pm 24.3 ⁺	47.3 \pm 5.1 ⁺⁺	5.7 \pm 1.1 ⁺⁺
ABC+CGS-21680	713.5 \pm 82.8 ⁺	44.8 \pm 5.2 ⁺⁺	6.3 \pm 1.2 ⁺⁺

Los leucocitos y las HUVEC se trataron con ABC 20 μM o vehículo durante 4h. En algunos casos los leucocitos (PMN o PBMC) se pretrataron individualmente con distintos antagonistas de los receptores purinérgicos o distintos compuestos que participan en la ruta del ATP previo al tratamiento de ambos tipos celulares con ABC. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión de PMN O PBMC al endotelio. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. (n \geq 4) *p<0.01 o **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. ⁺p<0.05 o ⁺⁺p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

3. ESTUDIO DE LOS POSIBLES LIGANDOS DEL RECEPTOR P2X₇ RESPONSABLES DEL EFECTO PRODUCIDO POR ABC.

3.1. Estudios de unión al receptor P2X₇.

Como hemos visto, los efectos proinflamatorios producidos por ABC son mediados a través del receptor P2X₇ fundamentalmente presente en leucocitos. Estos efectos pueden deberse a la activación directa del receptor por parte de ABC, a la activación del receptor por parte del metabolito activo del ABC, el CBV-TP, ya que posee analogía estructural con el ligando endógeno del receptor (ATP) o incluso podría deberse a la acción del propio ATP cuyos niveles podrían estar siendo alterados por el tratamiento con ABC.

Mediante estudios de unión por competición de ligandos se analizó la capacidad unión de ABC, de CBV-TP, de ATP y de BzATP (agonista específico del receptor P2X₇) al receptor P2X₇. Para ello, se empleó un antagonista específico del receptor P2X₇ marcado radiactivamente ([³H]A804598) y se analizó la capacidad de los distintos ligandos de desplazarlo de su unión al receptor. BzATP produjo un desplazamiento completo de la unión de [³H]A804598 al receptor P2X₇ y ATP y CBV-TP causaron un desplazamiento parcial del radioligando. Por el contrario, ABC no tuvo ningún efecto, no compitiendo con el [³H]A804598 por su sitio de unión (**Figura 42 y Tabla 11**).

Estos resultados sugieren que ABC no se estaría uniendo al sitio de unión del radioligando, mientras que CBV-TP y ATP sí, pudiendo ser estos últimos los ligandos responsables del efecto de ABC sobre el receptor P2X₇.

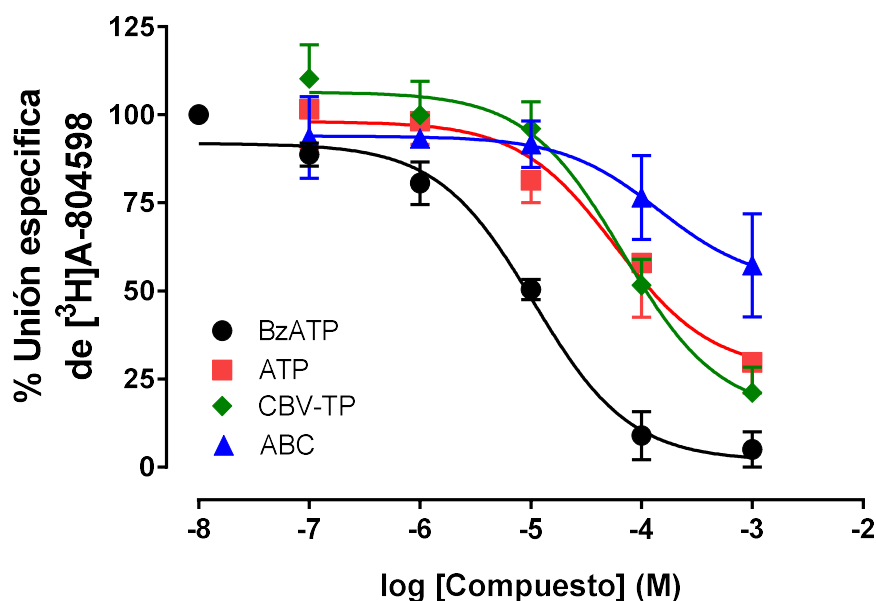


Figura 42. Estudios de unión al receptor P2X₇. La gráfica muestra la actividad de los posibles ligandos del receptor para competir con el antagonista específico [3H]A-804598 a concentración saturante (2.5 nM). Se realizan curvas concentración efecto para BzATP, ATP, CBV-TP y ABC. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 5$) de unión específica del radioligando [3H]A804598 en presencia de los distintos compuestos analizados.

Tabla 11. Potencia de unión al receptor P2X₇ de los distintos compuestos analizados.

Compuesto	Unión rP2X ₇ pIC50
BZATP	4.97 \pm 0.14
ATP	4.69 \pm 0.23
CBV-TP	4.59 \pm 0.27
ABC	>3

En la tabla se muestran los valores de pIC50 (-log de la concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión del radioligando) para BzATP, ATP, CBV-TP y ABC obtenidos en los estudios de unión al receptor P2X₇ (Figura 6). Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 5$).

3.2. Caracterización de los efectos de ATP y CBV-TP.

ATP y CBV-TP son capaces de desplazar el antagonista específico del receptor P2X₇ marcado radiactivamente ([³H]A804598) pudiendo ser responsables del efecto producido por ABC. Para evaluar esta posibilidad evaluamos las acciones de ATP y CBV-TP con el fin de observar si reproducen los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1.

3.2.1. Efecto de ATP y CBV-TP sobre la interacción leucocito-endotelio.

Analizamos el efecto de ATP y CBV-TP sobre la interacción leucocito-endotelio empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara de flujo. Para ello se incubaron las células endoteliales y los leucocitos (PMN o PBMC) de forma independiente con distintas concentraciones de los compuestos a analizar (Ver material y métodos. 2.2 protocolo experimental de tratamiento).

Tanto ATP como CBV-TP produjeron una reducción significativa y dosis dependiente de la velocidad de rodamiento de PMN sobre el endotelio venular (**Figura 43 A y B**) así como un incremento significativo y dosis dependiente de los parámetros de rodamiento de PMN (**Figuras 43 C y D**) como de adhesión de PMN (**Figuras 43 E y F**) sobre células endoteliales.

El análisis del efecto de estos mismos ligandos sobre la interacción PBMC-endotelio reprodujo los resultados obtenidos en PMN (**Figura 44**), sin embargo, las dosis requeridas para producir estos efectos fueron superiores a las que produjeron la interacción PMN-endotelio (**Figura 43**).

PMN/HUVEC

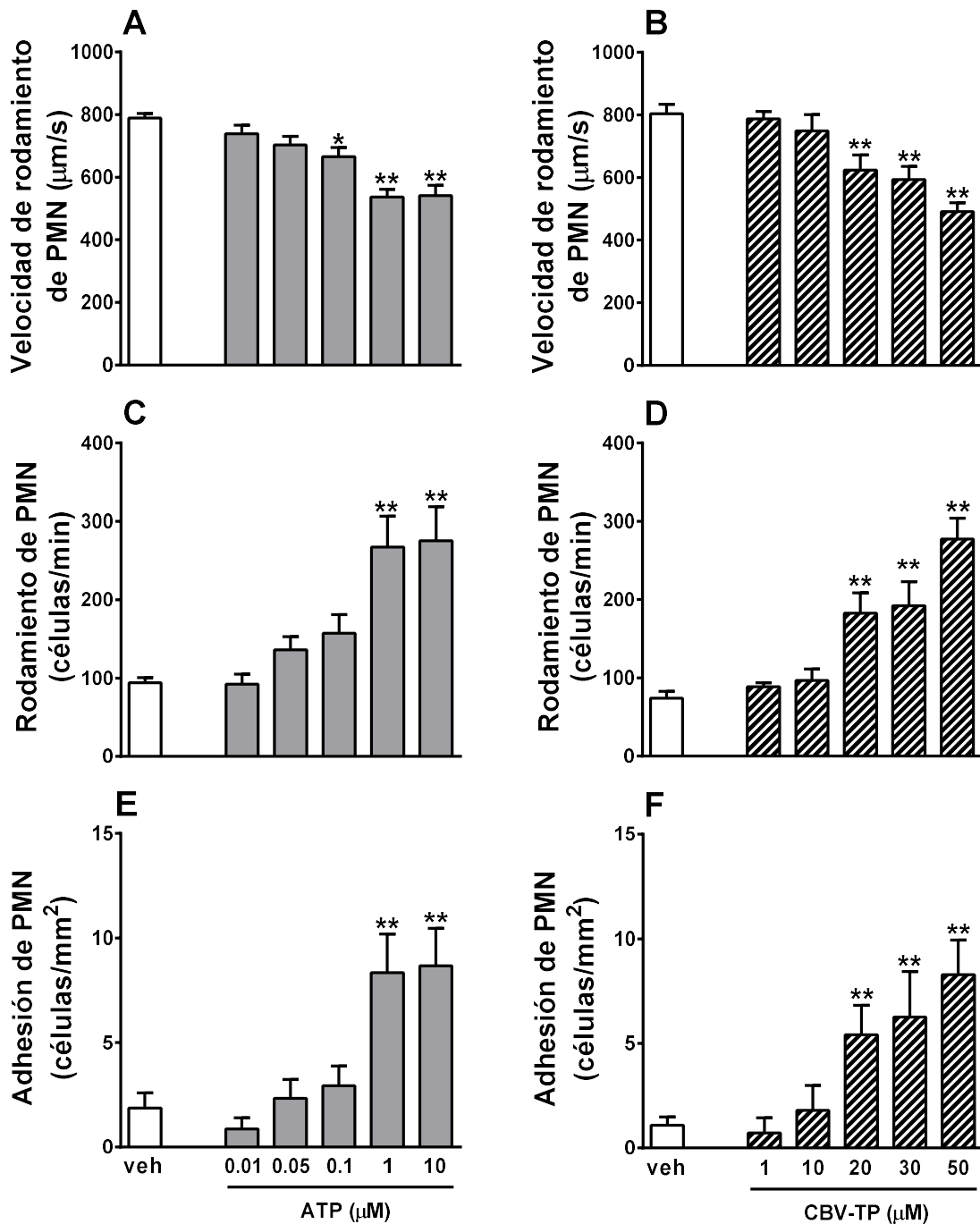


Figura 43. Efecto de ATP y CBV-TP sobre la interacción PMN-endothelio. HUVEC y PMN fueron tratados con ATP (0.01-10 μM) y CBV-TP (1-50 μM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PMN al endothelio. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$). * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. Análisis de varianza ANOVA seguidos del post-test Newman-Keuls.

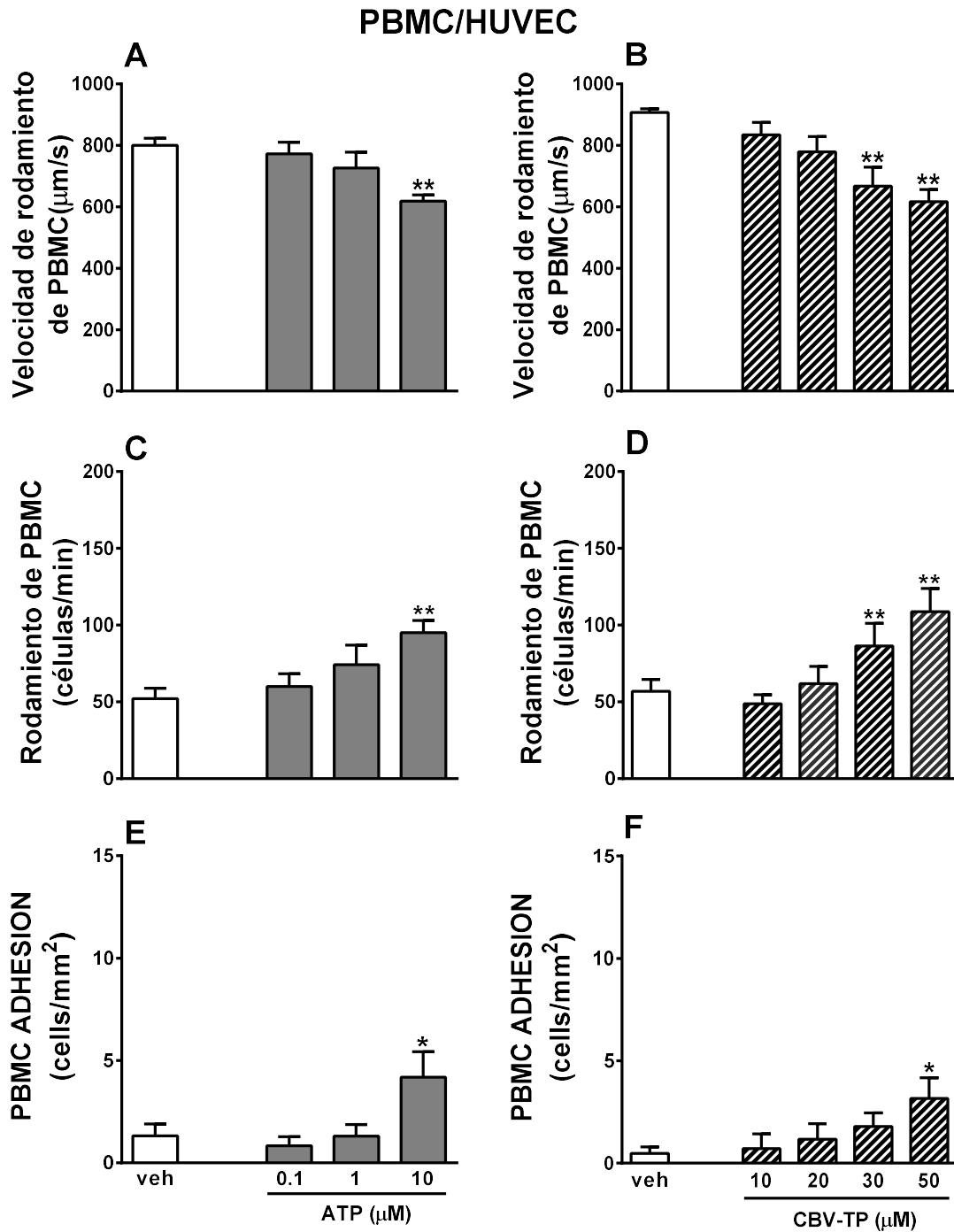


Figura 44. Efecto de ATP y CBV-TP sobre la interacción PBMC-endotelio. HUVEC y PBMC fueron tratados con ATP (0.1-10 µM) y CBV-TP (10-50 µM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PBMC al endotelio. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥4). *p<0.05 o **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. Análisis de varianza ANOVA seguidos del post-test Newman-Keuls.

3.2.2. Efecto de ATP y CBV-TP sobre la expresión de Mac-1 (CD11b/CD18).

Se analizó el efecto de ATP y CBV-TP sobre la expresión de las dos subunidades de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 (CD11b/CD18), responsable de la interacción leucocito-endotelio producida por ABC (de Pablo et al., 2010). La sangre de donantes sanos se incubó con distintas concentraciones de ATP o de CBV-TP durante 4h para su posterior análisis por citometría de flujo.

ATP y CBV-TP indujeron un incremento significativo y dosis dependiente de la subunidad CD11b (**Figura 45 A y B**) y de la subunidad CD18 (**Figura 45 C y D**) tanto en neutrófilos como en monocitos.

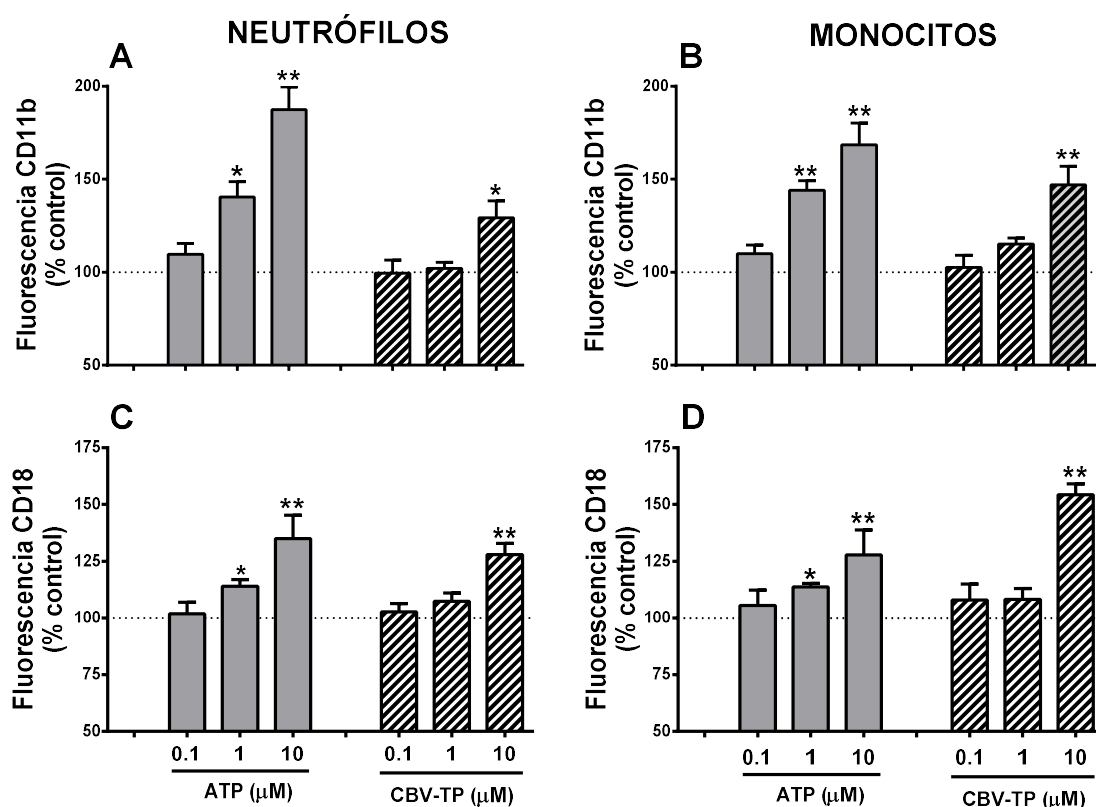


Figura 45. Efecto de ATP y CBV-TP sobre la expresión de Mac-1 en leucocitos de sangre humana. La sangre entera se trató con ATP (0.1-10 µM) o CBV-TP (0.1-10 µM) durante 4h y se cuantificó la expresión de las subunidades de Mac-1 CD11b (A y B) y CD18 (C y D) en neutrófilos y monocitos, respectivamente. Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratados con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n≥4). *p<0.05 o **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

3.3. Implicación de los receptores purinérgicos en los efectos producidos por ATP y CBV-TP.

El efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 está mediado a través del receptor P2X₇. ATP y CBV-TP son capaces de interactuar con el receptor y además reproducir los efectos de ABC en los parámetros evaluados, es por ello que si son los responsables del efecto de ABC, estos efectos deberían estar mediados por el mismo receptor.

3.3.1. Interacción leucocito-endotelio.

Empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo evaluamos la implicación funcional de los receptores purinérgicos P2X en la interacción leucocito-endotelio producida por ATP o por CBV-TP.

Para ello se pretrataron tanto las células endoteliales como los leucocitos (PMN o PBMC) con un suramin (antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y), A804598 (antagonista específico de los receptores P2X₇) y apirasa (hidroliza el ATP) antes del tratamiento con ATP o con CBV-TP.

3.3.1.1 ATP.

Los efectos de ATP sobre la interacción PMN-endotelio (**Figura 46 A, C Y E**) y sobre la interacción PBMC-endotelio (**Figura 46 B, D y F**) fueron revertidos de forma significativa con el pretratamiento con el antagonista no selectivo de los receptores de ATP (suramin) y con el compuesto que hidroliza al ATP (apirasa). El antagonista específico del receptor P2X₇ (A804598) sólo revirtió significativamente el parámetro de adhesión de PMN a las células endoteliales (**Figura 46 E**) y el de velocidad de rodamiento de PBMC (**Figura 46 D**) a las células endoteliales.

Estos resultados sugieren que el ATP a las concentraciones evaluadas no actúa de forma específica sobre el receptor y por tanto no actúa de forma similar a como lo hace el ABC. De todas formas, no se puede descartar un papel del ATP en los efectos del ABC, ya que determinados parámetros como la adhesión de PMN y la velocidad de rodamiento de PBMC sí que se ven revertidos por el antagonista específico del receptor P2X₇.

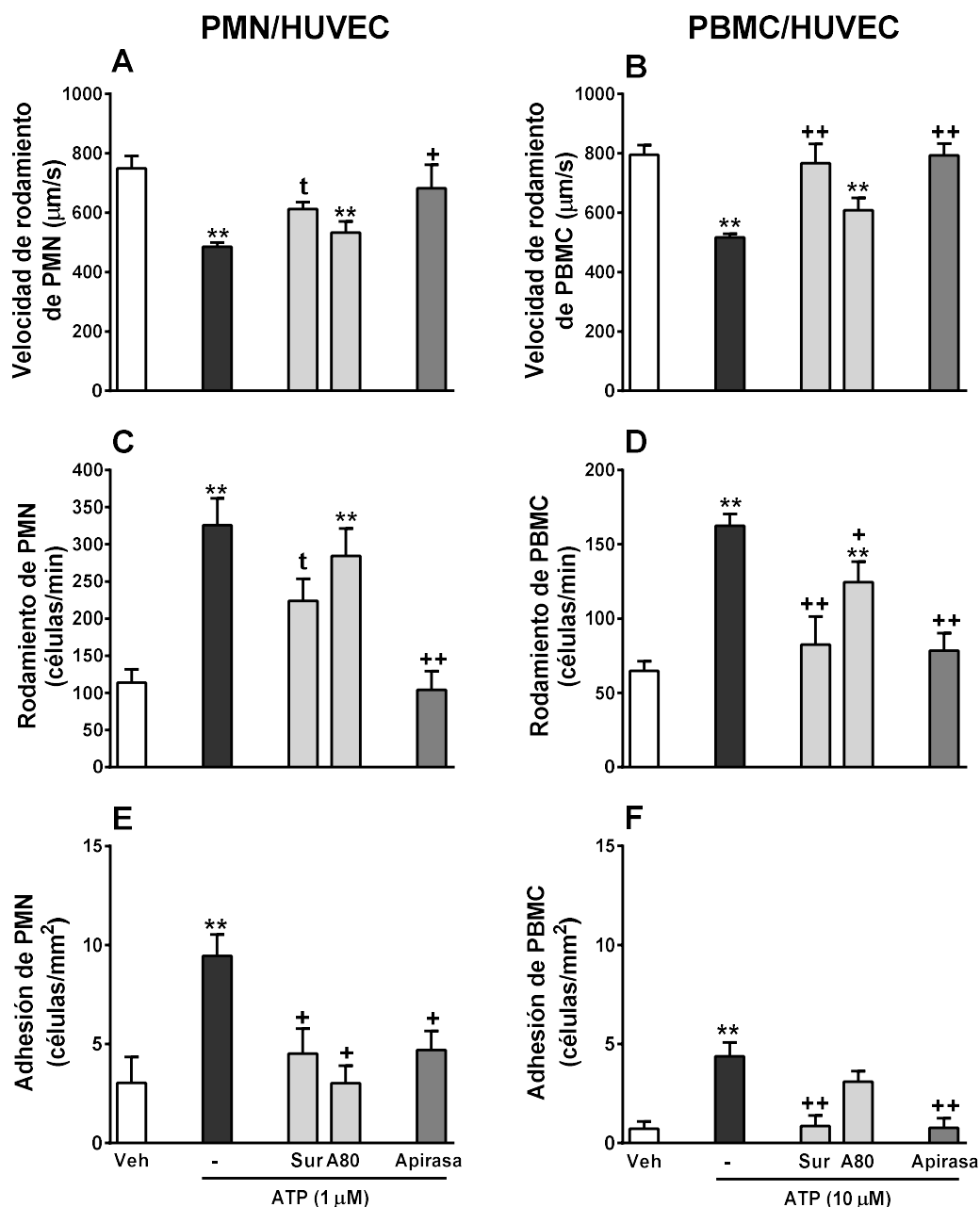


Figura 46. Análisis de la implicación de los receptores purinérgicos en los efectos producidos por ATP sobre la interacción leucocito-Endotelio. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma independiente con suramin (Sur, antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y, 1h), A804598 (A80, antagonista específico del receptor P2X₇, 30 min) o apirasa (hidroliza ATP, 30 min) antes del tratamiento con ATP (1 o 10 μM, 4h) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PMN y PBMC al Endotelio respectivamente. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥4) **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. ⁺p<0.05 o ⁺⁺p<0.01 respecto al grupo tratado con ATP. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls. ^tp<0.05 respecto al grupo tratado con ATP utilizando como análisis estadístico t test no pareado.

3.3.1.2. CBV-TP.

Los efectos de CBV-TP sobre la interacción PMN-endotelio (**Figura 47 A, C y E**) y sobre la interacción PBMC-endotelio (**Figuras 47 B, D y F**) fueron revertidos de forma significativa con el pretratamiento con apirasa, con el antagonista no selectivo de los receptores de ATP (suramin) y con el antagonista del receptor P2X₇ (A804598).

A diferencia de lo ocurrido para ATP, los efectos de efecto de CBV-TP sobre la interacción leucocito-endotelio sí que están mediados por los receptores P2X₇ y si que reproducen las acciones de ABC.

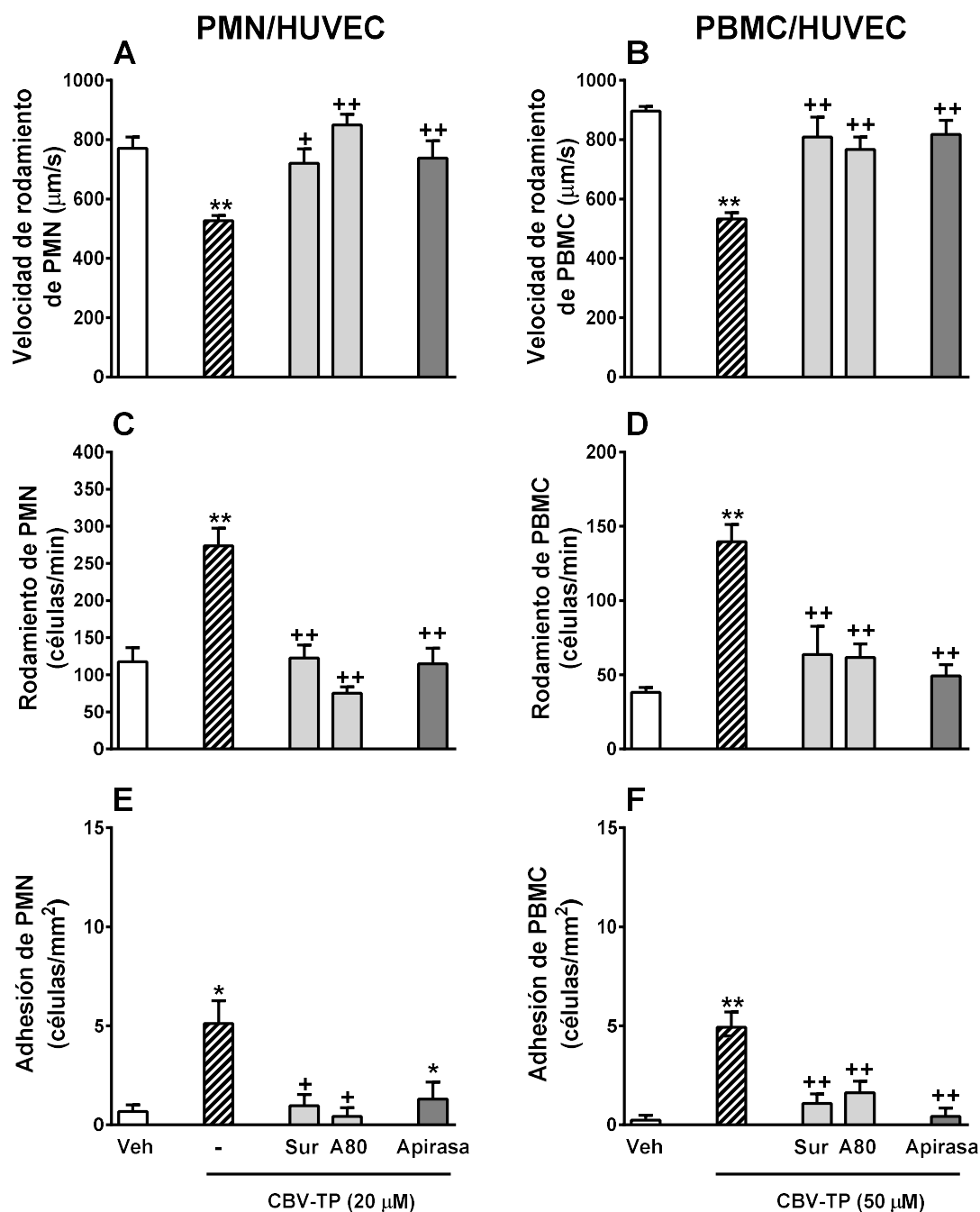


Figura 47. Análisis de la implicación de los receptores purinérgicos en los efectos producidos por CBV-TP sobre la interacción leucocito-endorotelio. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma independiente con suramin (Sur, antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y, 1h), A804598 (A80, antagonista específico del receptor P2X₇, 30 min) o apirasa (hidroliza ATP, 30 min) antes del tratamiento con CBV-TP (20 o 50 μM , 4h) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PMN y PBMC al endotelio, respectivamente. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$) * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. + $p < 0.05$ o ++ $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con CBV-TP. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

3.3.2. Expresión de Mac-1.

Mediante citometría de flujo evaluamos la implicación funcional de los receptores P2X sobre el incremento de la expresión de Mac-1 (CD11b y CD18) en leucocitos de sangre humana tratados con ATP o CBV-TP incubando previamente con distintos antagonistas de los receptores P2X con el fin de observar si estos efectos están mediados por los mismos receptores que en el caso de ABC.

3.3.2.1. ATP.

Los efectos sobre la expresión de la subunidad de CD11b en neutrófilos tras tratamiento con ATP no fueron revertidos por ninguno de los antagonistas evaluados (**Figura 48 A**), mientras que el antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y sí que disminuyó de forma significativa los efectos de ATP en monocitos (**Figura 48 B**). En lo que respecta a la subunidad común de las integrinas β_2 , CD18 se vio revertida de forma significativa tras tratamiento con suramin en neutrófilos (**Figura 48 C**) y monocitos (**Figura 48 D**).

Estos resultados sugieren que los receptores purinérgicos no están implicados en el incremento de CD11b tras tratamiento con ATP. Además, la reversión por parte de suramin de la subunidad CD18 sugiere la implicación de otras integrinas β_2 en el efecto de ATP.

RESULTADOS

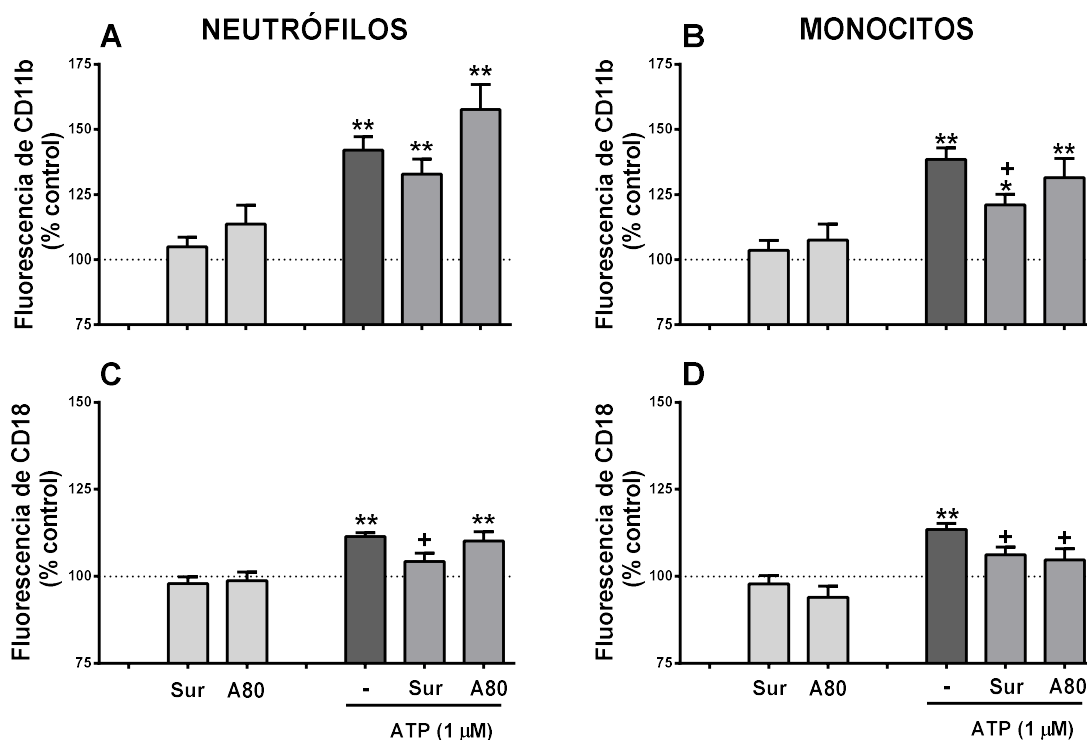


Figura 48. Implicación de los receptores purinérgicos en la expresión de Mac-1 inducida por ATP. La sangre entera se trató con ATP (1 μ M, 4h) y se cuantificó la expresión de las subunidades de Mac-1, CD11b (A y B) y CD18 (C y D) en neutrófilos y monocitos respectivamente. En algunos casos, la sangre se pretrató con suramin (Sur, 1h) o A804598 (A80, 30 min) antes del tratamiento con ATP. Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratado con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 6$). * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con el vehículo. + $p < 0.05$ o ++ $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ATP. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

3.3.2.2. CBV-TP.

El antagonista inespecífico de los receptores P2/Y (suramin) y el antagonista específico del receptor P2X₇ (A804598) revirtieron de forma significativa el efecto producido por CBV-TP sobre la expresión de la subunidad CD11b de Mac-1 en neutrófilos (**Figura 49 A**) y en monocitos (**Figura 49 B**). El efecto de CBV-TP sobre la subunidad CD18 no fue revertido por ninguno de los antagonistas utilizados (**Figuras 49 C y 49 D**).

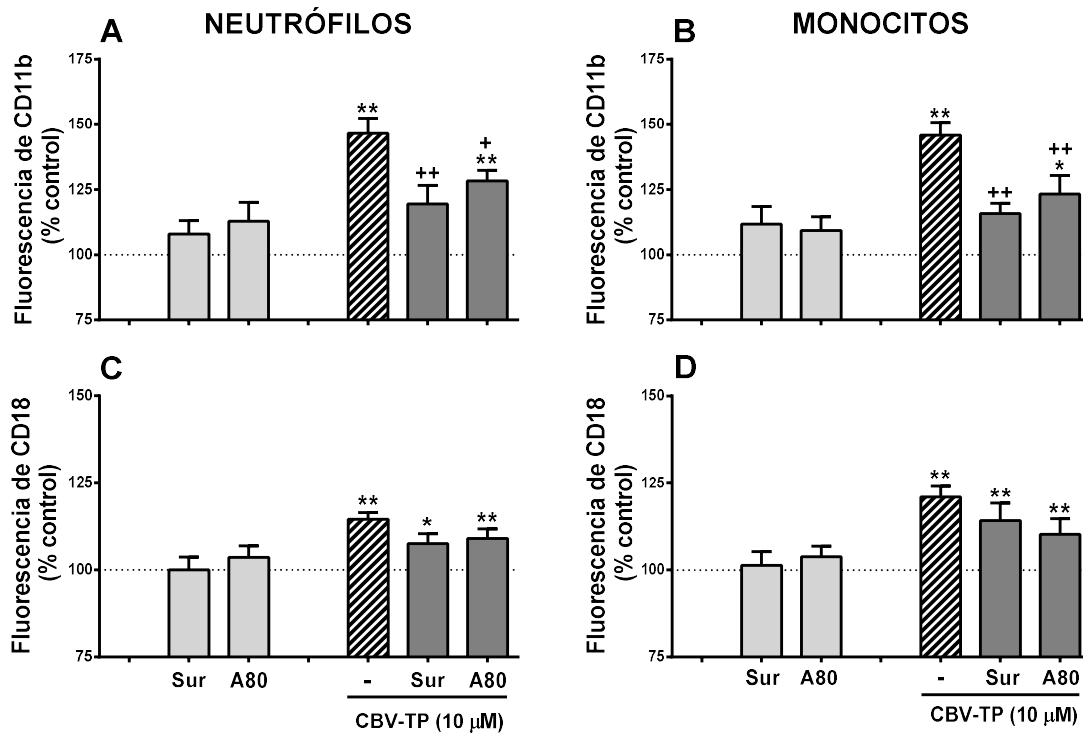


Figura 49. Implicación de los receptores P2X/Y en la expresión de Mac-1 inducida por CBV-TP. La sangre entera se trató con CBV-TP (10 μM, 4h) y se cuantificó la expresión de las subunidades de Mac-1, CD11b (A y B) y CD18 (C y D) en neutrófilos y monocitos respectivamente. En algunos casos, la sangre se pretrató con suramin (Sur, 1h) o A804598 (A80, 30 min) antes del tratamiento con CBV-TP. Los valores de fluorescencia (FITC o PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratado con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n≥6). *p<0.05 o **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. +p<0.05 o ++p<0.01 respecto al grupo tratado con CBV-TP. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

Tras evaluar los efectos de ATP y CBV-TP vemos como ATP no es capaz de reproducir completamente los efectos de ABC ni sobre la interacción leucocito-endotelio ni expresión de Mac-1, ya que su efecto no es específico del receptor P2X₇, sin embargo, CBV-TP es capaz de reproducir los efectos de ABC la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1, siendo estas acciones dependientes del receptor P2X₇.

4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ABC, CBV-TP y ATP.

ABC no se une al receptor P2X₇ mientras que CBV-TP y ATP sí. Ambos reproducen los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1. CBV-TP actúa a través de los receptores P2X₇ mientras que ATP no actúa de forma específica a través de este receptor. Con el fin de determinar si los efectos de ABC pudieran estar mediados por CBV-TP o por ATP cuantificamos sus niveles en nuestro sistema.

4.1. Metabolismo celular de ABC. Cuantificación de CBV y CBV-TP.

Si el efecto de ABC se debiera a la interacción de CBV-TP con el receptor P2X₇, ABC debería estar metabolizándose de forma intracelular a Carbovir (CBV) y CBV-TP para posteriormente ser liberado al medio extracelular e interactuar con el receptor. Por tanto, se analizó mediante HPLC la concentración extracelular e intracelular de ABC y CBV-TP en HUVEC, PMN y PBMC tras tratamiento con ABC. El CBV-TP se mide como carbovir (CBV) total (CBV+CBV-TP) debido a la dificultad de detección que presenta el CBV-TP y que requiere de tratamiento con fosfatasas para degradarlo a CBV.

Durante las 4 horas de tratamiento la concentración de ABC en el medio extracelular no varió en ninguno de los tipos celulares evaluados, HUVEC (**Figura 50 A**), PMN (**Figura 50 B**) y PBMC (**Figura 50 C**) manteniéndose en todo momento las concentraciones en torno a 20 µM. Sin embargo, a nivel extracelular no se detectó CBV o CBV-TP en ninguno de los tipos celulares analizados.

Respecto a las concentraciones intracelulares, los resultados obtenidos indican que ABC sí que entra dentro de la célula, especialmente en PMN y PBMC (**Figura 51**), sin embargo, esta cantidad de ABC es muy inferior a la detectada extracelularmente y explica que no se vean variaciones en los niveles extracelulares de ABC (**Figura 50**).

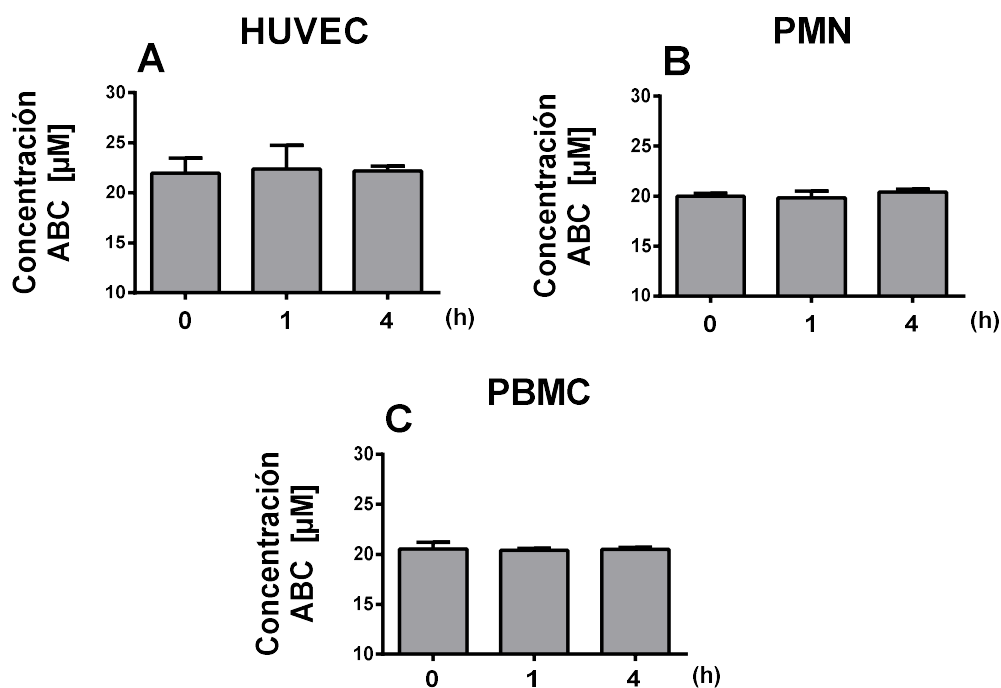


Figura 50. Concentración de ABC en el medio extracelular en los distintos tipos celulares. Las células HUVEC (A), PMN (B) o PBMC (C) se trataron con ABC (20 µM) durante 4h. Se recogieron muestras de sobrenadante a tiempo 0, 1 y 4 h y se determinó la concentración de ABC mediante HPLC EN LOS SOBRENADANTES. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$).

Los niveles de CBV total intracelular detectados en los tres tipos celulares (100-300 fmol/ 10^6 células) (**Figura 51**) entran dentro del rango clínico detectado en pacientes (Moyle et al.,2009). Estos resultados indican una lenta absorción de ABC por parte de la célula, así como un metabolismo lento a CBV detectando concentraciones intracelulares. Estos niveles son incompatibles con las concentraciones necesarias de CBV-TP para reproducir los efectos de ABC y por tanto descartan al CBV-TP como el ligando responsable de interactuar con el receptor P2X₇ y de producir los efectos de ABC.

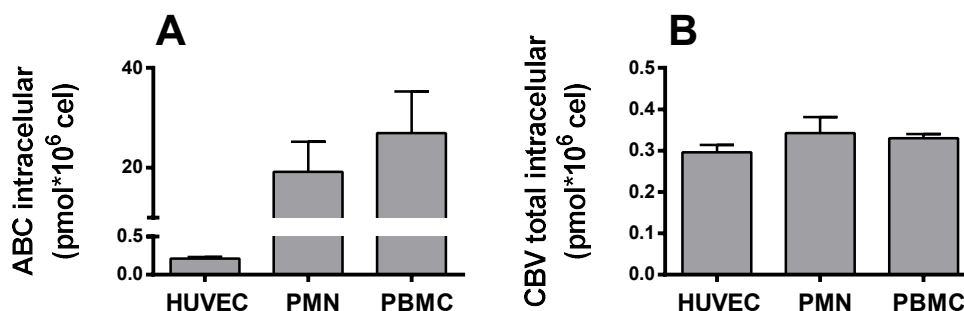


Figura 51. Concentración intracelular de ABC y CBV Total en los distintos tipos celulares. Las células HUVEC, PMN o PBMC se trataron con ABC (20 μ M) durante 4h. A continuación, se cuantificó la concentración intracelular de ABC (A) o CBV total (CBV+CBV-TP) (B) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. (n \geq 4).

4.2. Cuantificación de nucleótidos tras tratamiento con ABC.

Como hemos visto en los resultados anteriores ABC no puede estar ejerciendo su acción a través de CBV-TP. Por tanto, es posible que su acción se deba al ligando endógeno del receptor P2X7, el ATP. ABC debido a su analogía estructural con los sustratos de las enzimas que participan en el metabolismo del ATP extracelular, podría estar interfiriendo con esta ruta de degradación del ATP dando lugar al aumento de los niveles no solo de ATP sino también de otros nucleótidos, como ADP y reduciendo los niveles de la molécula antiinflamatoria adenosina.

Por tanto, se cuantificaron los niveles de nucleótidos (ATP/ADP/AMP/Adenosina) intracelulares y extracelulares tras tratamiento con ABC en los distintos tipos celulares HUVEC, PMN y PBMC mediante HPLC.

4.2.1. Efecto de ABC sobre los niveles de nucleótidos intracelulares.

Únicamente se observaron cambios significativos en los niveles intracelulares de ATP (**Figura 52 A**) en PMN observando una disminución respecto al control (esto podría ser indicativo de una liberación de ATP al medio extracelular) mientras que no se detectaron cambios significativos en ADP (**Figura 52 B**), AMP (**Figura 52 C**) y adenosina (**Figura 52 D**).

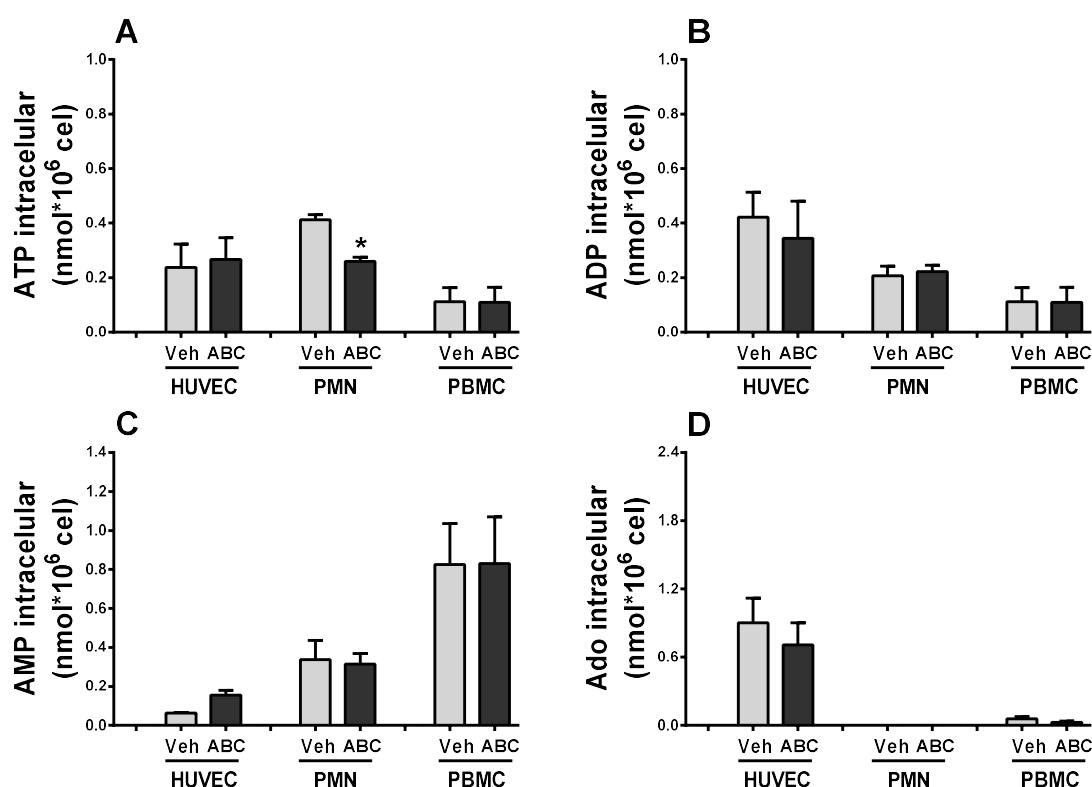


Figura 52. Concentración intracelular de nucleótidos en células endoteliales y leucocitos. HUVEC, PMN y PBMC se trataron con ABC (20 μM) o vehículo (veh) durante 4h. A continuación, se cuantificaron los niveles intracelulares de ATP (A), ADP (B), AMP (C) y adenosina (Ado, D) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n≥4). *p<0.05 respecto al grupo tratado con el vehículo. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

4.3.3. Efecto de ABC sobre los niveles extracelulares de nucleótidos.

ABC no indujo ningún incremento en los niveles de nucleótidos extracelulares a los tiempos evaluados (3 y 8 min) (**Figura 53**) o 4 horas (datos no mostrados). Pero podría ser que la liberación del ATP se produjera a un tiempo distinto de los analizados o a la rápida degradación que sufre.

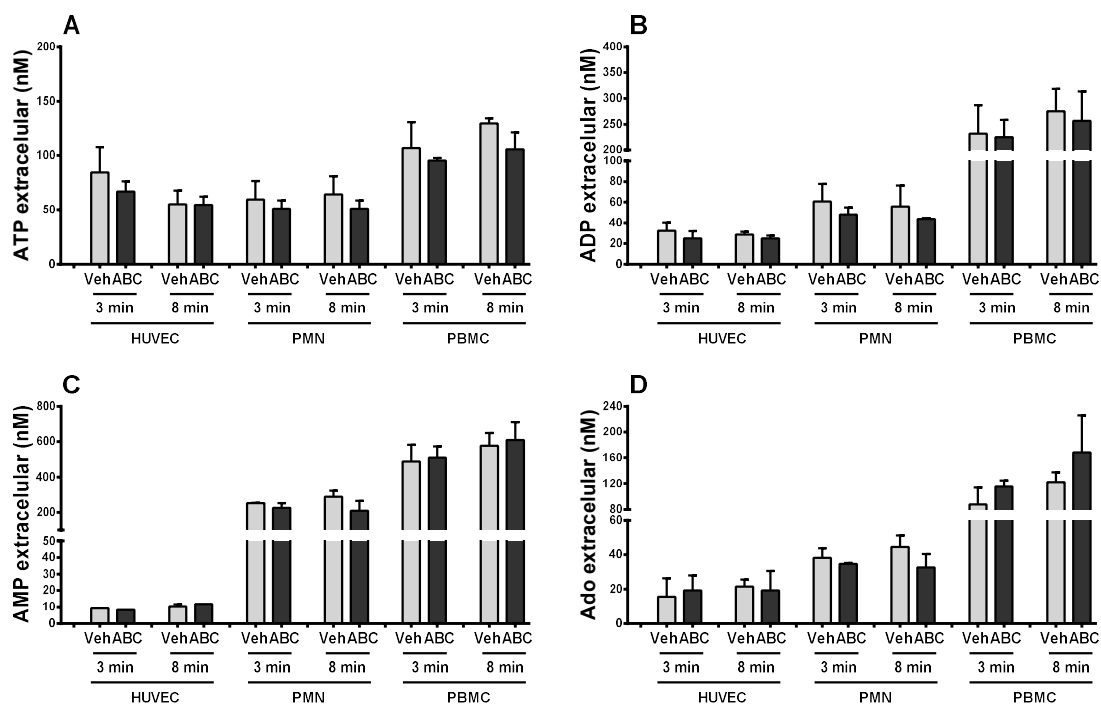


Figura 53. Concentración de nucleótidos extracelulares tras tratamiento con ABC. HUVEC, PMN y PBMC se trataron con ABC (20 μM) o vehículo (veh) durante 4h. A continuación, se cuantificaron los niveles extracelulares de ATP (A), ADP (B), AMP (C) y adenosina (Ado, D) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n≥4).

5. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS TRAS TRATAMIENTO CON ABC.

Debido a que no fuimos capaces de detectar un aumento en los niveles de ATP evaluamos tanto la velocidad de degradación del ATP como la posibilidad de que ABC estuviera afectando a las enzimas responsables de la degradación de nucleótidos.

5.1. Estudio de la velocidad de degradación del ATP tras tratamiento con ABC.

La velocidad de degradación del ATP se estudió añadiendo al medio extracelular ATP 20 μ M y recogiendo a distintos tiempos muestras de sobrenadante para la posterior cuantificación del ATP y AMP extracelular por HPLC. Con el fin de observar si ABC afecta a este metabolismo algunas muestras fueron pretratadas previamente con ABC (20 μ M, 4h).

Se observa que la velocidad de degradación del ATP es muy rápida, siendo reducido al 50% en 15 minutos tanto en HUVEC como en PMN y en 60 minutos en PBMC transformándose a AMP. Además, el tratamiento con ABC no modificó el patrón de degradación del ATP y de transformación en AMP en ninguno de los tipos celulares analizados (**Figura 54**).

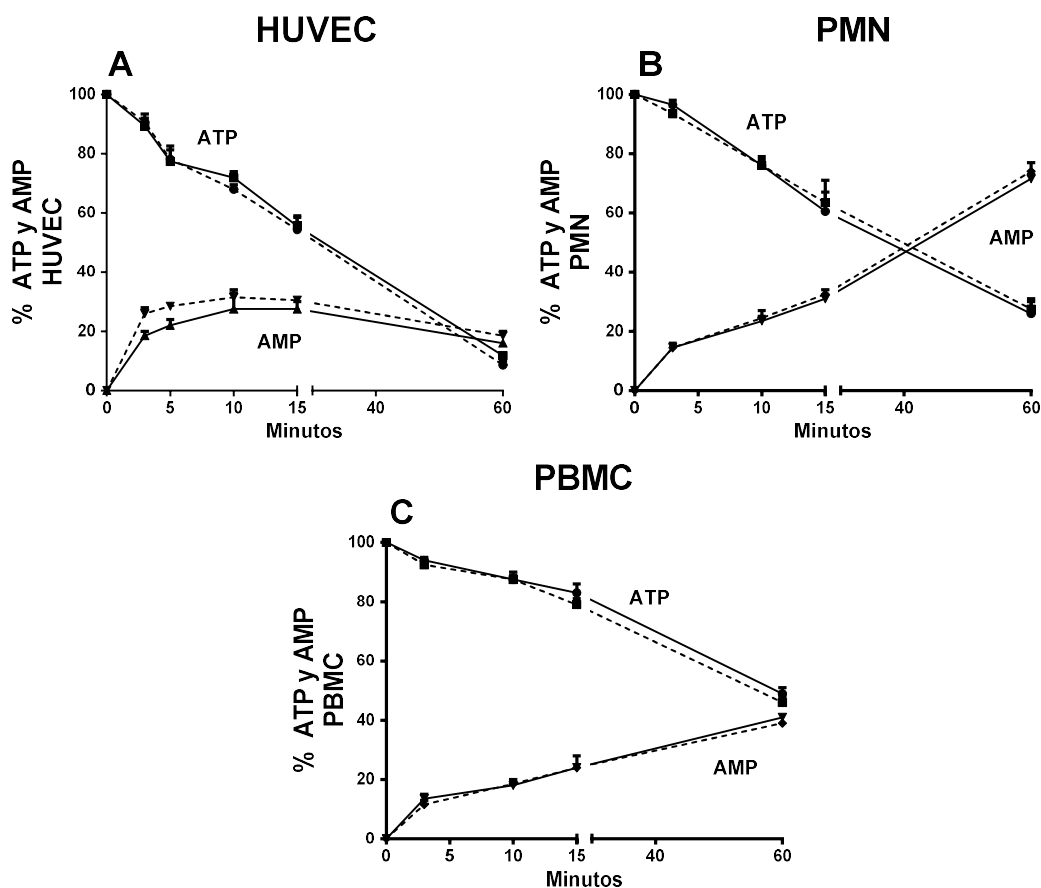


Figura 54. Efecto de ABC sobre el metabolismo extracelular de ATP. HUVEC, PMN y PBMC se pretrataron con ABC (20 μ M, 4h, línea discontinua) o vehículo (agua estéril, 4h, línea continua). A continuación, el medio se eliminó y añadió nuevo medio con ATP (20 μ M), recogiendo a los tiempos seleccionados (0, 3, 10, 15 y 60 min) una muestra de sobrenadante para su posterior análisis y cuantificación del porcentaje de ATP remanente y del porcentaje de AMP formado. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. (n \geq 4).

5.2. Cuantificación proteica de las enzimas partícipes en la degradación de nucleótidos tras tratamiento con ABC.

Se analizó la expresión de las distintas enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos extracelulares (CD39, CD73, NDP-K y AK). Se trataron las células HUVEC, PMN y PBMC con ABC (1-30 μ M) y se analizó la expresión proteica por Western Blot.

Ninguna de las enzimas evaluadas -CD39, CD73, E-NDP-K y AK- vio modificada su expresión tras tratamiento con ABC en ninguno de los tipos celulares evaluados: HUVEC (Figura 55), PMN (Figura 56) y PBMC (Figura 57).

HUVEC

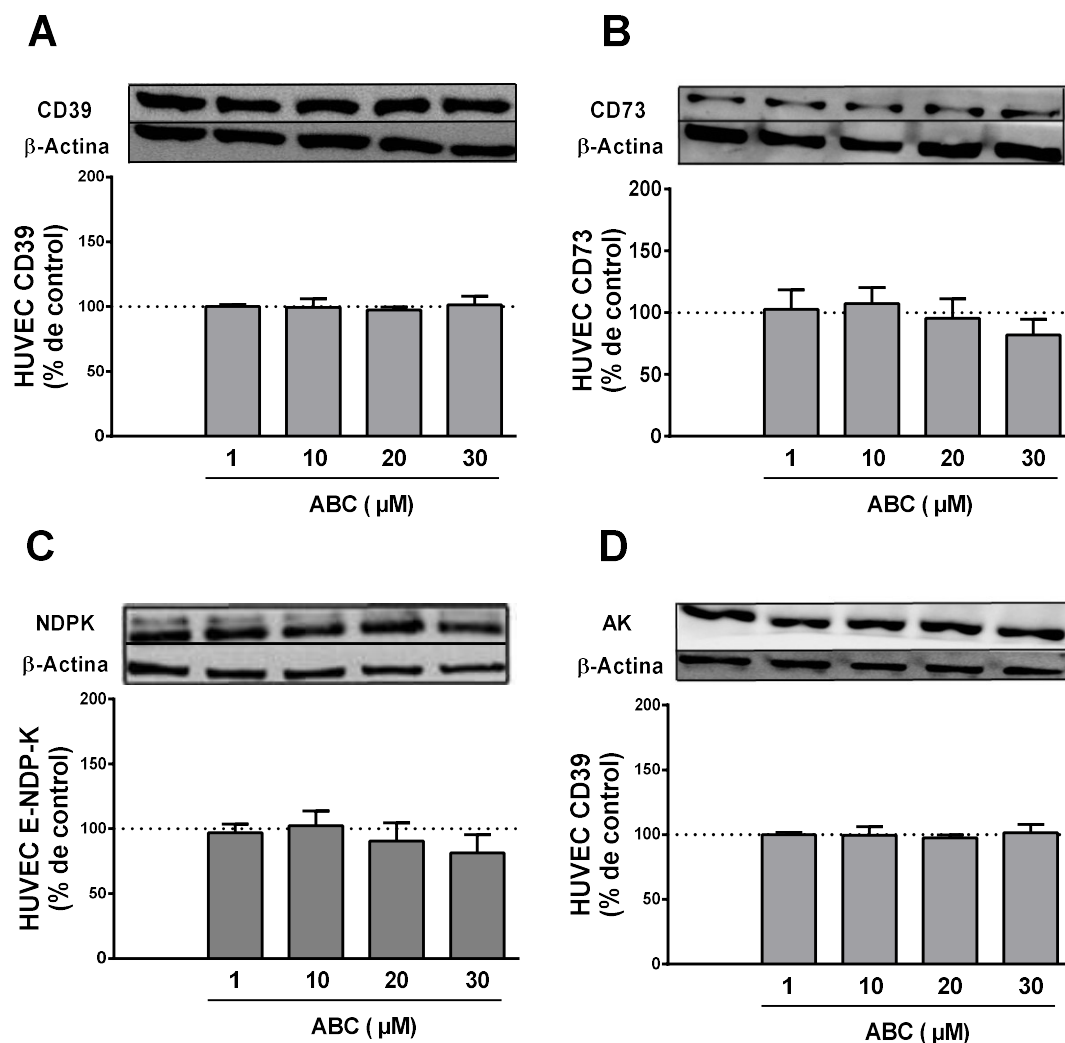


Figura 55. Efecto de ABC sobre los niveles de proteínas de las enzimas partícipes en la degradación de nucleótidos en HUVEC. Las células HUVEC fueron tratadas con abacavir (ABC, 1-30 μM) o agua estéril (vehículo). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de proteínas de (A) CD39 , (B) CD73, (C) E-NDP-K y (D) AK. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (vehículo, 100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 5-6).

PMN

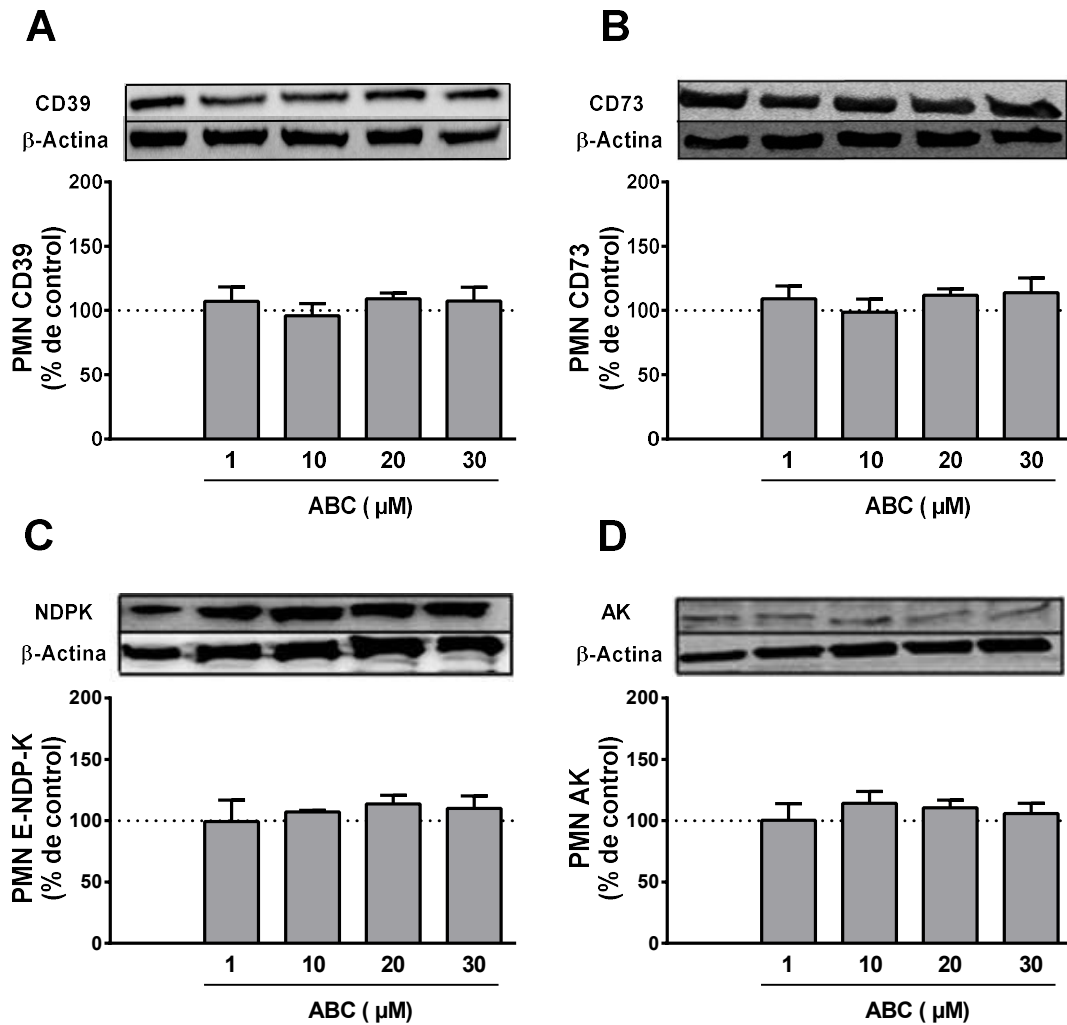


Figura 56. Efecto de ABC sobre los niveles de proteínas de las enzimas participantes en la degradación de nucleótidos en PMN. Los PMN fueron tratados con abacavir (ABC, 1-30 μM) o agua estéril (vehículo). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de proteínas de (A) CD39 , (B) CD73, (C) E-NDP-K y (D) AK. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (vehículo, 100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 5-6).

PBMC

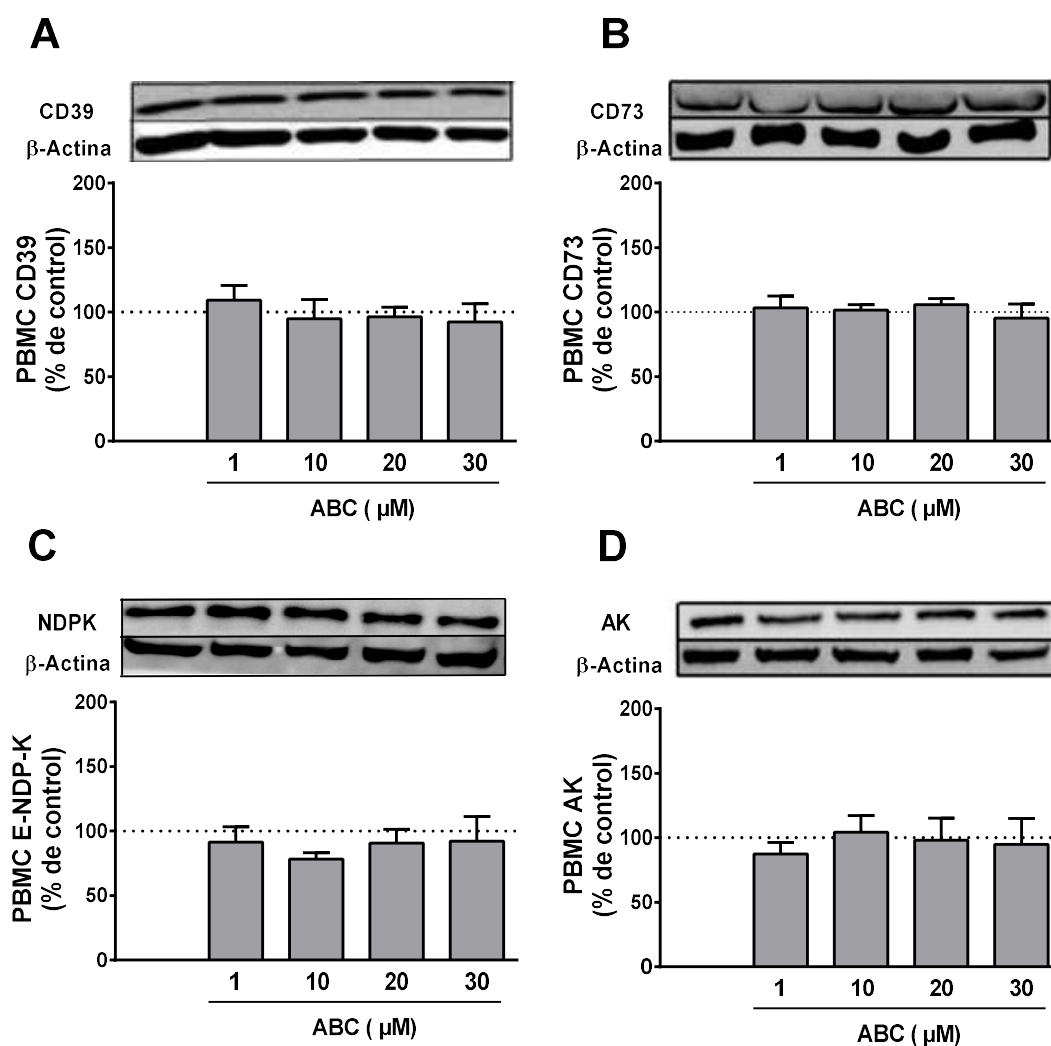


Figura 57. Efecto de ABC sobre los niveles de proteínas de las enzimas partícipes en la degradación de nucleótidos en PBMC. Los PBMC fueron tratados con abacavir (ABC, 1-30 μM) o agua estéril (vehículo). La figura muestra una imagen representativa y la cuantificación de los niveles de proteínas de CD39 (A) CD39 , (B) CD73, (C) E-NDP-K y (D) AK. Los valores representan el porcentaje de la cuantificación de luminiscencia respecto del control (vehículo, 100 %). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n = 5-6).

5.3. Evaluación de la actividad enzimática.

Como hemos visto, el tratamiento con ABC no afecta a la degradación de nucleótidos ni a la expresión de las enzimas que participan en la degradación de nucleótidos. Sin embargo, podrían estar compitiendo debido a su analogía estructural como sustrato enzimático y afectando a la actividad de estas enzimas. Por ello, se evaluó mediante el uso de derivados de eteno la actividad enzimática de las distintas enzimas del metabolismo de nucleótidos a nivel extracelular durante el tratamiento con ABC en HUVEC, PMN y PBMC. Las células se trataron con ABC 20 μM y al mismo tiempo se adicionaron los derivados de eteno, E-ATP (estudiar la actividad de CD39) y de E-AMP (para analizar la actividad de CD73).

Estos derivados de eteno se metabolizan de igual forma que sus derivados endógenos (ATP, ADP, AMP y Adenosina) permitiendo de una forma sencilla la medida de la actividad enzimática de estas enzimas.

La actividad de CD39 se mide como el porcentaje remanente del E-ATP añadido a las células que no se ha transformado E-ADP. ABC no afectó a la actividad enzimática de CD39 en ninguno de los tipos celulares evaluados, HUVEC (**Figura 58 A**), PMN (**Figura 58 B**) y PBMC (**Figura 59 C**).

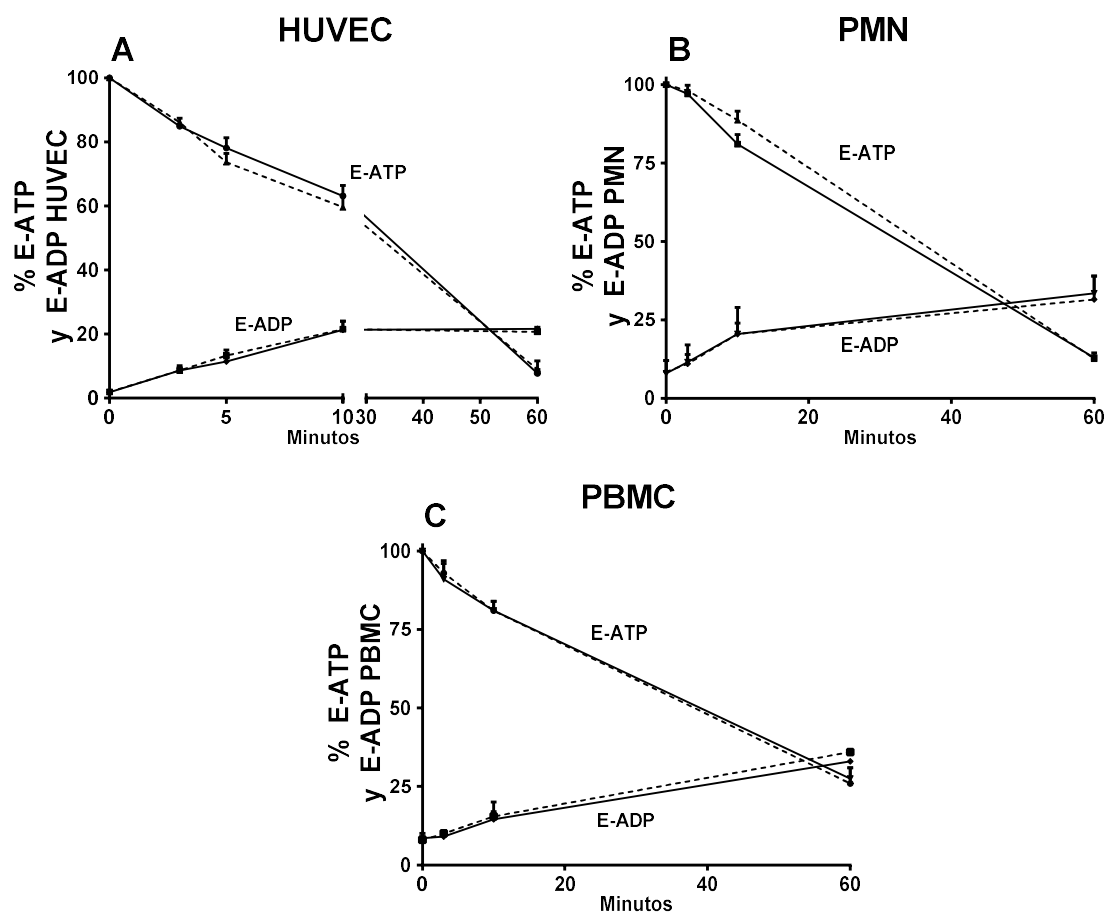


Figura 58. Actividad enzimática de la enzima CD39 tras tratamiento con ABC. HUVEC (A), PMN (B) y PBMC (C) se trataron con ABC (20 μ M, línea discontinua) o vehículo (línea continua). A su vez, se añadió eteno ATP (E-ATP, 10 μ M) recogiendo una muestra de sobrenadante (0, 3, 10 y 60 min) para la cuantificación del porcentaje de E-ATP remanente y el porcentaje de E-ADP formado. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$).

La actividad de CD73 se mide como el porcentaje remanente de E-AMP añadido a las células que no se ha degradado a E-Ado. En ninguno de los tipos celulares evaluados, HUVEC (Figura 59 A), PMN (Figura 59 C) y PBMC (Figura 59 D), se observaron diferencias significativas entre la actividad enzimática de CD73 en las células tratadas con vehículo y las tratadas con ABC.

Estos resultados junto con la cuantificación proteica de las distintas enzimas tras tratamiento con ABC descartan un efecto de éste sobre el metabolismo de nucleótidos.

RESULTADOS

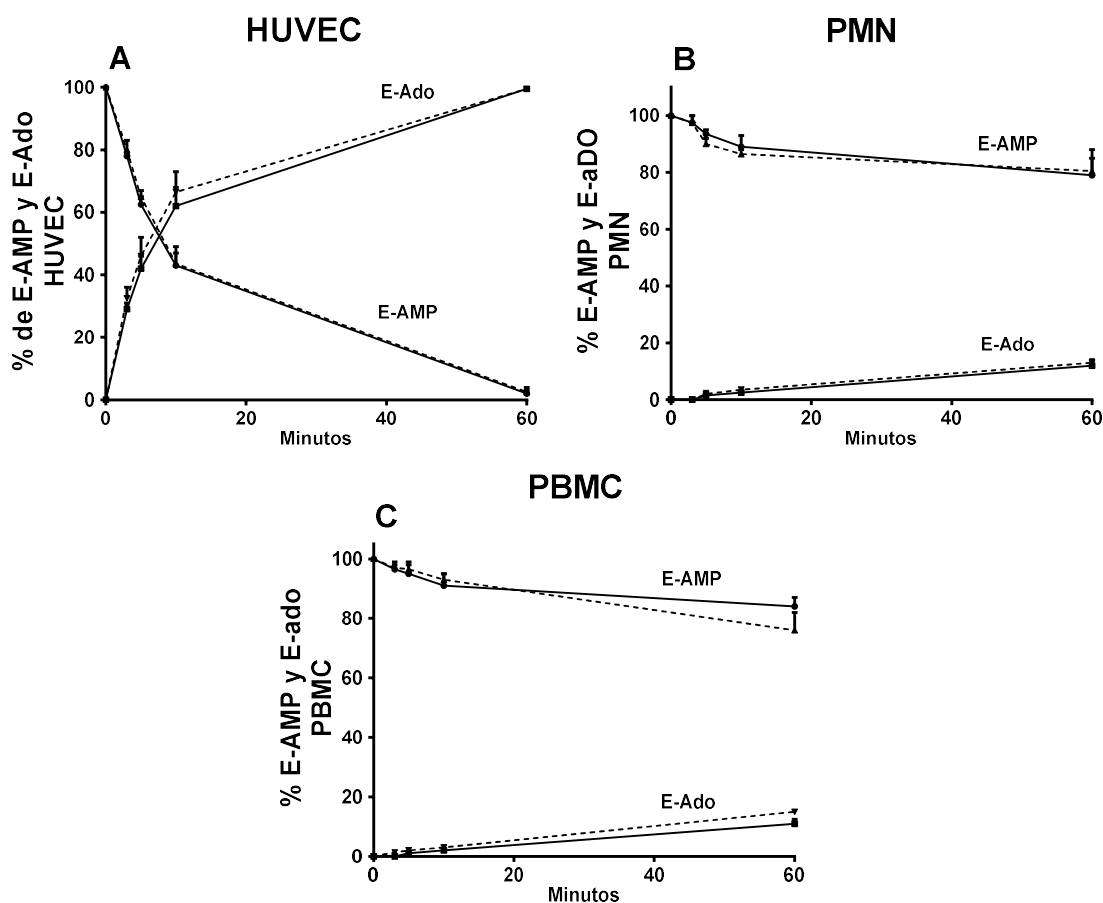


Figura 59. Actividad enzimática de CD73 tras tratamiento con ABC. HUVEC (A), PMN (B) y PBMC (C) se trataron con ABC (20 μ M), línea discontinua o vehículo (línea continua). A continuación, se añadió eteno ATP (E-ATP, 10 μ M) recogiendo una muestra de sobrenadante (0, 3, 10 y 60 min) para la cuantificación del porcentaje de E-AMP remanente y el porcentaje de E-Ado formado. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. (n \geq 4).

Los niveles de ATP no se incrementan en presencia de ABC. Éste tampoco afecta a la velocidad de degradación del ATP ni a la expresión proteica ni a la actividad enzimática de las enzimas responsables de la degradación de nucleótidos.

6. EFECTO DE LA APIRASA SOBRE LA DEGRADACIÓN DE ABC, ATP y CBV-TP.

El efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio es apirasa dependiente (**Figura 18**). La apirasa es capaz de revertir también el efecto de ATP y CBV-TP sobre la interacción leucocito-endotelio (**Figuras 46 y 47**). Por tanto, evaluamos el efecto de apirasa sobre los niveles de los 3 posibles ligandos ABC, ATP y CBV-TP aunque el CBV-TP ya lo tenemos descartado ya que no se detectaron niveles suficientes para ser el responsable del efecto de ABC. Si la apirasa fuera capaz de degradar al ABC, el efecto de ABC podría deberse a su acción directa. Si no fuera capaz de degradar al ABC, el efecto de ABC sería dependiente de ATP.

Se trataron los distintos tipos celulares analizados, HUVEC, PMN y PBMC con ABC, ATP y CBV-TP en presencia o ausencia de apirasa y se recogieron muestras de sobrenadante a distintos tiempos para su posterior análisis por HPLC.

Apirasa, no fue capaz de degradar a ABC (**Tabla 12**), sin embargo, degradó rápidamente el ATP y el CBV-TP (**Tablas 13 y 14**), por tanto, estos resultados apuntan a que el efecto de ABC tiene que deberse al ATP ya que CBV-TP esta descartado.

Tabla 12. Degradación de ABC (μM) por apirasa en los distintos tipos celulares.

TIEMPO (min)	0	1	10	60	240
ABC HUVEC	23.1 \pm 1.3	23.2 \pm 0.8	23.8 \pm 0.5	24.6 \pm 0.9	26.4 \pm 0.7
ABC HUVEC +APIRASA	21.0 \pm 0.5	20.8 \pm 0.3	20.9 \pm 0.4	20.5 \pm 0.3	20.6 \pm 0.4
ABC PMN	20.0 \pm 0.2	19.8 \pm 0.2	20.1 \pm 0.4	19.8 \pm 0.2	20.4 \pm 0.1
ABC PMN +APIRASA	22.0 \pm 0.7	21.8 \pm 0.4	21.5 \pm 0.8	20.9 \pm 0.5	21.5 \pm 0.8
ABC PBMC	20.5 \pm 0.1	20.3 \pm 0.3	20.1 \pm 0.4	20.4 \pm 0.1	20.5 \pm 0.1
ABC PBMC +APIRASA	22.0 \pm 0.7	21.8 \pm 0.5	22.1 \pm 0.5	21.8 \pm 0.4	22.1 \pm 0.3

Se trataron los distintos tipos celulares con ABC 20 μM y apirasa durante 240 minutos. A continuación, se cuantificó la concentración de ABC extracelular (μM) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$).

RESULTADOS

Tabla 13. Degradación de ATP (μM) por apirasa en los distintos tipos celulares.

TIEMPO (min)	0	1	10	60	240
ATP HUVEC	20.3 \pm 0.4	18.1 \pm 0.5	13.8 \pm 0.6	1.8 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
ATP HUVEC +APIRASA	21.1 \pm 0.7	0	0	0	0
ATP PMN	19.8 \pm 0.6	19.1 \pm 0.3	11.8 \pm 0.3	5.0 \pm 0.6	0.4 \pm 0.1
ATP PMN +APIRASA	20.1 \pm 0.5	0	0	0	0
ATP PBMC	20.2 \pm 0.3	19.4 \pm 0.3	16.6 \pm 0.5	9 \pm 0.9	0.6 \pm 0.2
ATP PBMC +APIRASA	19.8 \pm 0.5	0	0	0	0

Se trataron los distintos tipos celulares con ATP 20 μM y apirasa durante 240 minutos. A continuación, se cuantificó la concentración de ATP extracelular (μM) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$).

Tabla 14. Degradación de CBV-TP (μM) por apirasa en los distintos tipos celulares.

TIEMPO (min)	0	1	10	60	240
CBV-TP HUVEC	19.9 \pm 0.5	19.6 \pm 0.4	17.2 \pm 0.3	7.6 \pm 0.6	0.3 \pm 0.1
CBV-TP HUVEC +APIRASA	19.8 \pm 0.4	0	0	0	0
CBV-TP PMN	20.3 \pm 0.7	18.4 \pm 0.8	16.4 \pm 0.9	6.2 \pm 0.5	0.2 \pm 0.2
CBV-TP PMN +APIRASA	20.5 \pm 0.3	0	0	0	0
CBV-TP PBMC	21.1 \pm 0.9	16.6 \pm 0.3	16.2 \pm 0.2	8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
CBV-TP PBMC +APIRASA	20.5 \pm 0.3	0	0	0	0

Se trataron los distintos tipos celulares con CBV-TP 20 μM y apirasa durante 240 minutos. A continuación, se cuantificó la concentración de CBV-TP extracelular (μM) mediante HPLC. Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 4$).

7. ESTUDIOS DE “DOCKING” DEL RECEPTOR P2X₇.

El efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio es revertido por apirasa, la cual es capaz de degradar al ATP y el CBV-TP, pero no a ABC. En nuestro sistema no detectamos niveles suficientes de CBV-TP para que sea este ligando sea el responsable del efecto de ABC, sin embargo, sí que detectamos niveles endógenos de ATP (50 -100 nM) y de ADP (30-250 nM) y AMP (10-600 nM) que pueden venir de la degradación del ATP (**Figura 53**). Por tanto, una posibilidad es que el efecto de ABC fuera dependiente del ATP endógeno.

El receptor P2X₇ pertenece a la familia de receptores purinérgicos P2X. Estos receptores son trímeros que conforman canales selectivos de cationes mono y divalentes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) necesitando hasta 3 moléculas de ATP (1 por cada subunidad) para que se produzca la apertura del canal. Recientemente el receptor P2X₇ se ha relacionado con distintos compuestos que son capaces de modular su activación de forma alostérica en sitios distintos al sitio de unión del ATP, por ello y debido a nuestros resultados anteriores nos planteamos que el ATP sería necesario para activar el receptor y que ABC pudiera estar modulando de forma alostérica el receptor actuando sobre un sitio de unión diferente al del receptor ATP.

Una vez generado el modelo del receptor junto con las estructuras optimizadas de los posibles ligandos evaluados experimentalmente (Ver material y métodos, 7. Estudios de docking) se realizaron los estudios de “docking”. Se definieron dos sitios de unión, uno es el sitio de unión del ATP, sitio principal (sitio 1), y otro sitio de unión del antagonista A804598, sitio secundario (sitio 2). Para ello se establecieron dos cajas (x, y, z), la principal (sitio 1 coordenadas; 171, 168, 142) y la secundaria (sitio 2 coordenadas; 162, 150, 183) (**Figura 60**) (Karasawa A et al., 2016). Esto confirma la bibliografía reciente que habla del antagonista A804598 como un antagonista no competitivo del receptor (Karasawa A et al., 2016), contradiciendo la literatura previa que lo definía como un antagonista competitivo de mismo (Donelley Roberts et al., 2009).

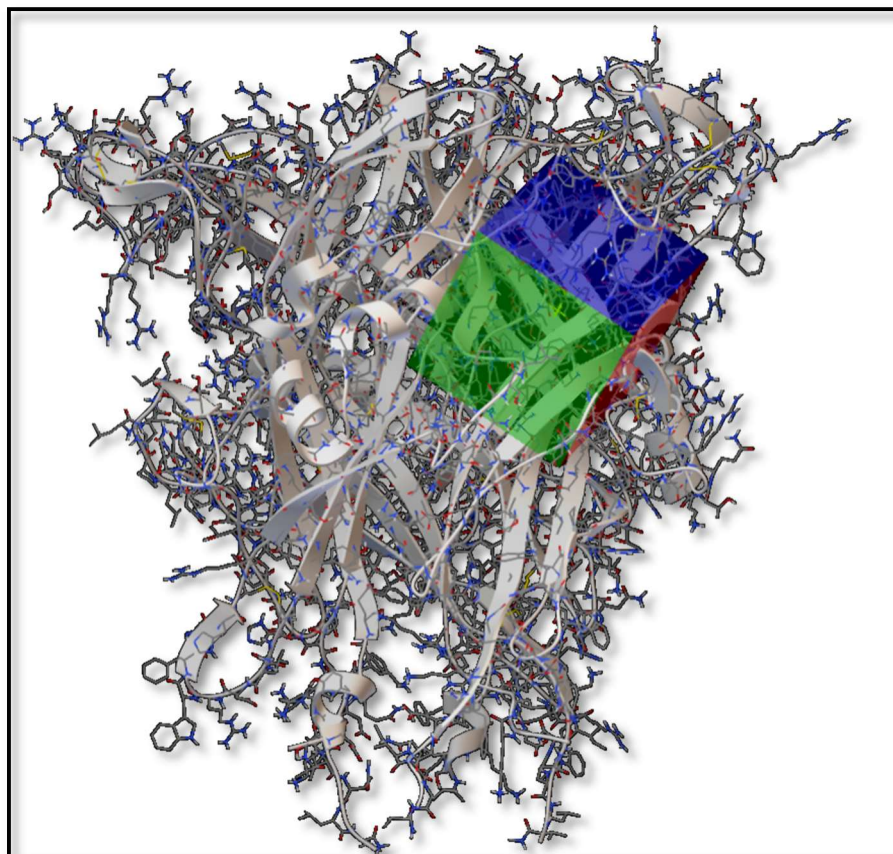


Figura 60. Imagen representativa de la caja del sitio de unión del ATP (caja principal, sitio 1) en el receptor P2X₇.

Una vez definidos los sitios de unión, se evaluaron 200 poses de cada uno de los ligandos (ABC, ATP, CBV-TP y BzATP) y después se filtraron en función de la disposición del ligando original en el cristal y a la energía de unión.

El primer paso fue comprobar la unión de ATP y A804598 a sus respectivos sitios de unión, así el ATP se une con una energía de unión muy favorable al sitio de unión 1 (**Figura 61 B**), de igual forma que el A804598 se une también con gran afinidad al sitio de unión 2 (**Figura 61 C**) formando en ambos casos un complejo estable. A continuación, se analizaron los distintos ligandos en ambos sitios de unión.

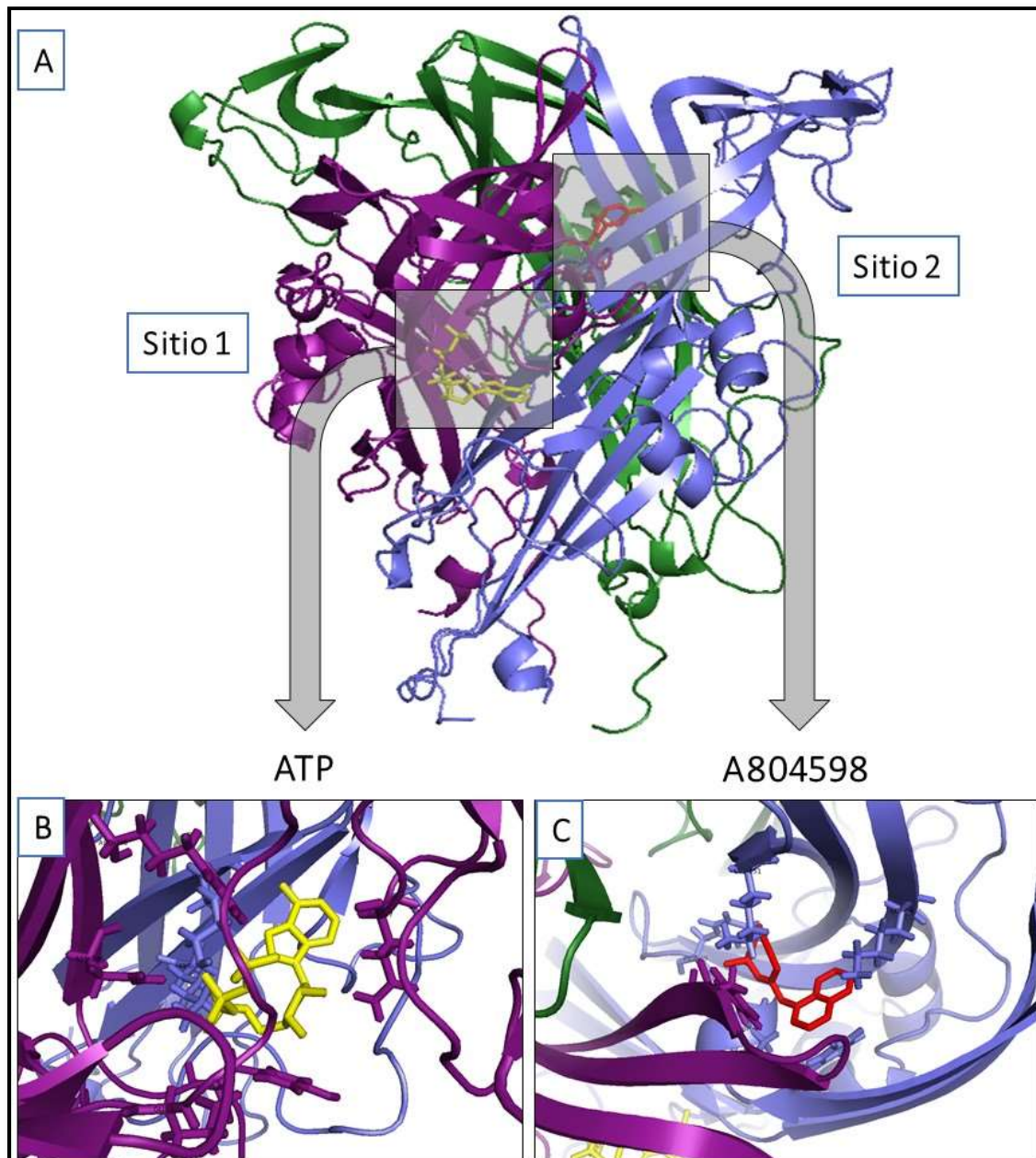


Figura 61. Sitios de unión definidos por “docking” del receptor P2X₇ para ATP y para el antagonista A804598. A) Modelo del receptor con los tres monómeros (verde, morado, azul) unido al ATP (amarillo) y al A804598 (rojo). B) Sitio de unión del ATP (sitio 1), cuya energía libre de unión predicha para el ATP es de -6,69 kcal/mol. C) Sitio de unión del A804598 (sitio 2), cuya energía libre de unión predicha para el A804598 es de -1,18 Kcal/mol.

7.1. Unión de los potenciales ligandos al sitio de unión del ATP (sitio 1).

Se analizó la unión de ABC y CBV-TP al sitio de unión del ATP (sitio 1). Los resultados sugieren que ABC (**Figura 62 A**) no es capaz de interactuar en este sitio de unión (forma un complejo inestable, energía positiva), mientras que el CBV-TP sí que presenta una energía libre de unión muy favorable pudiendo interactuar de igual manera que el ATP (**Figura 62 B**) (**Tabla 15**).

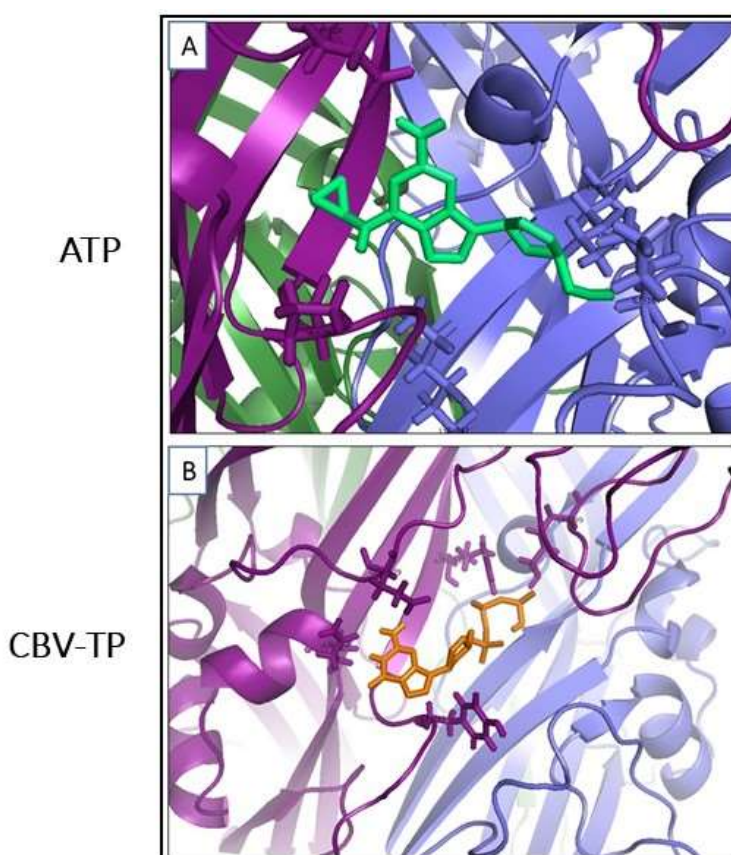


Figura 62. Unión de ABC y CBV-TP al sitio de unión del ATP (sitio 1). A) Unión de ABC (verde) con una energía no favorable estimada de 0.43 Kcal/mol. b) Unión de CBV-TP (naranja) con una energía favorable estimada de -6.73 Kcal/mol.

7.2. Unión de los potenciales ligandos al sitio de unión del A804598 (sitio 2).

ABC, sí que es capaz de interaccionar con el receptor en el sitio 2 con una energía favorable formando un complejo estable (**Figura 63 A**). Además, ATP y CBV-TP también presentan energías más favorables que ABC en este sitio de unión, aunque menos favorables que sobre el sitio 1, que es su sitio principal (**Figuras 63 B y C**) (**Tabla 15**).

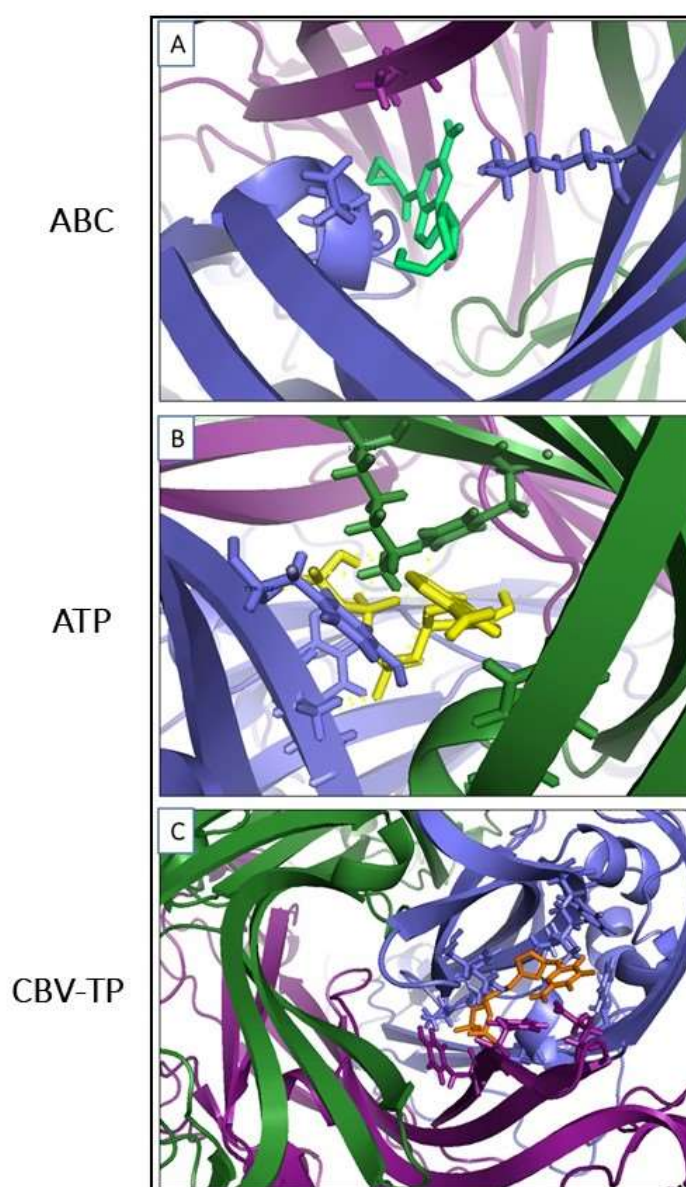


Figura 63. Unión de ABC, ATP y CBV-TP al sitio de unión del A804598 A) Unión de ABC (verde) con una energía favorable estimada de -0.56 Kcal/mol. B) Unión de ATP (amarillo) con una energía favorable estimada de -4.84 Kcal/mol. C) Unión de CBV-TP (naranja) con una energía favorable estimada de -3.74 Kcal/mol.

RESULTADOS

Tabla 15. Unión de ABC, ATP, CBV-TP y A804598 en los distintos sitios de unión del receptor P2X₇.

COMPUESTO	ENERGÍA DE UNIÓN SITIO 1 (kcal/mol)	AA IMPLICADOS	ENERGÍA DE UNIÓN SITIO 2 (kcal/mol)	AA IMPLICADOS
ABC	0.43	-	-0.56	ASP 46, LYS 251, ALA 250 y THR 48
ATP	-6.69	ARG 248, LYS 265, TYR 242, THR 143, LEU 145, LYS 18, ASN 246, GLU 129 y GLN 97	-4.84	TYR 249, LYS 251, TYR 252 y PHE 42
CBV-TP	-6.73	LYS 99, ARG 248, GLU 129 y GLN 202	-3.74	LYS 64, PHE 62, MET 59, GLU 259, TYR 252, LYS 251 y PHE 49.
A804598	-	-	-1.18	TYR 252, ASP 46, PHE 49, LYS 251, TYR 249, MET 59, VAL 266 y ILE 264

En la tabla se muestran las energías de unión (kcal/mol) de ABC, ATP y CBV-TP y A804598 en los dos sitios de unión (1 y 2) analizados, así como los aminoácidos implicados en cada unión.

Estos resultados sugieren que ABC podría estar actuando sobre el receptor P2X₇ en el sitio de unión 2 siendo capaz de formar un complejo estable que permita activarlo, mientras que ATP y CBV-TP podrían unirse a ambos, interaccionando primero en sitio de 1 y a concentraciones más altas uniéndose al sitio de unión 2 y siendo capaz de desplazar al A804598 al tener más afinidad. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los estudios de unión de radioligandos donde se observaba un desplazamiento parcial del radioligando [³H]A804598 en presencia de ATP y CBV-TP (Ver resultados, 3.1 Estudios de unión al receptor P2X₇), sin embargo, no explicarían porque

ABC no fue capaz de desplazar al radioligando cuando los resultados obtenidos en los estudios de “docking” confirman una unión de éste al sitio de unión 2. Por ello nos planteamos que podría estar ocurriendo cuando el antagonista A804598 está presente en este sitio de unión 2 en presencia de ABC. Se observó que en presencia de A804598 el ABC también cabe en este sitio de unión 2 pero se estaría uniendo a una zona adyacente. En esta nueva situación la energía deja de ser favorable y por tanto no sería capaz de activar al receptor ni desplazar al antagonista A804598 (**Figuras 64 y 65**) explicando los resultados obtenidos en los estudios de radioligandos donde ABC no fue capaz de desplazar a dicho antagonista (Ver resultados, 3.1 Estudios de unión al receptor P2X₇).

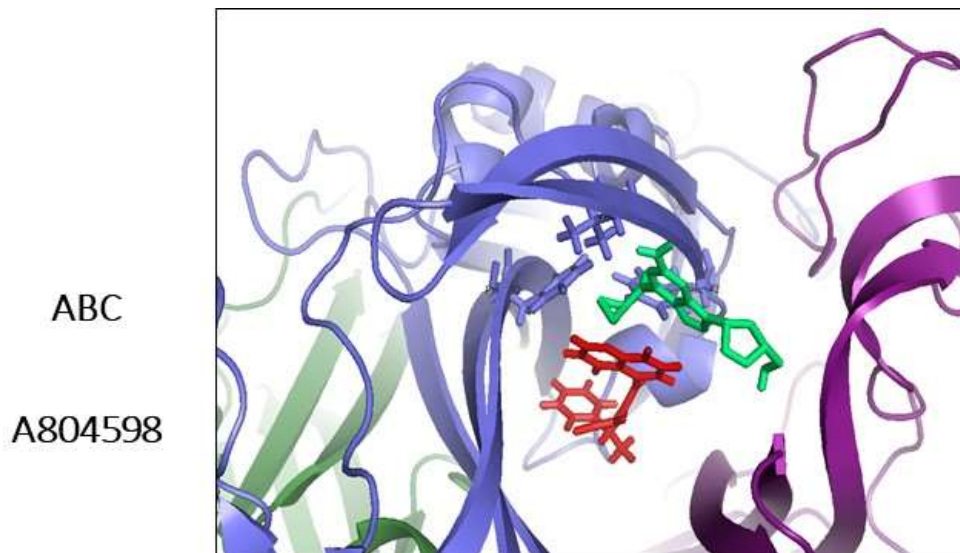


Figura 64. Interacción de ABC en el sitio de unión 2 en presencia de A804598. ABC (verde) y A804598 (rojo) en el sitio de unión 2. La energía predicha de ABC en presencia de A804598 es de -0,01 kcal/mol y los aminoácidos a los que se une ABC PHE 62, PHE 42, VAL 38, GLU 259 y GLN 70.

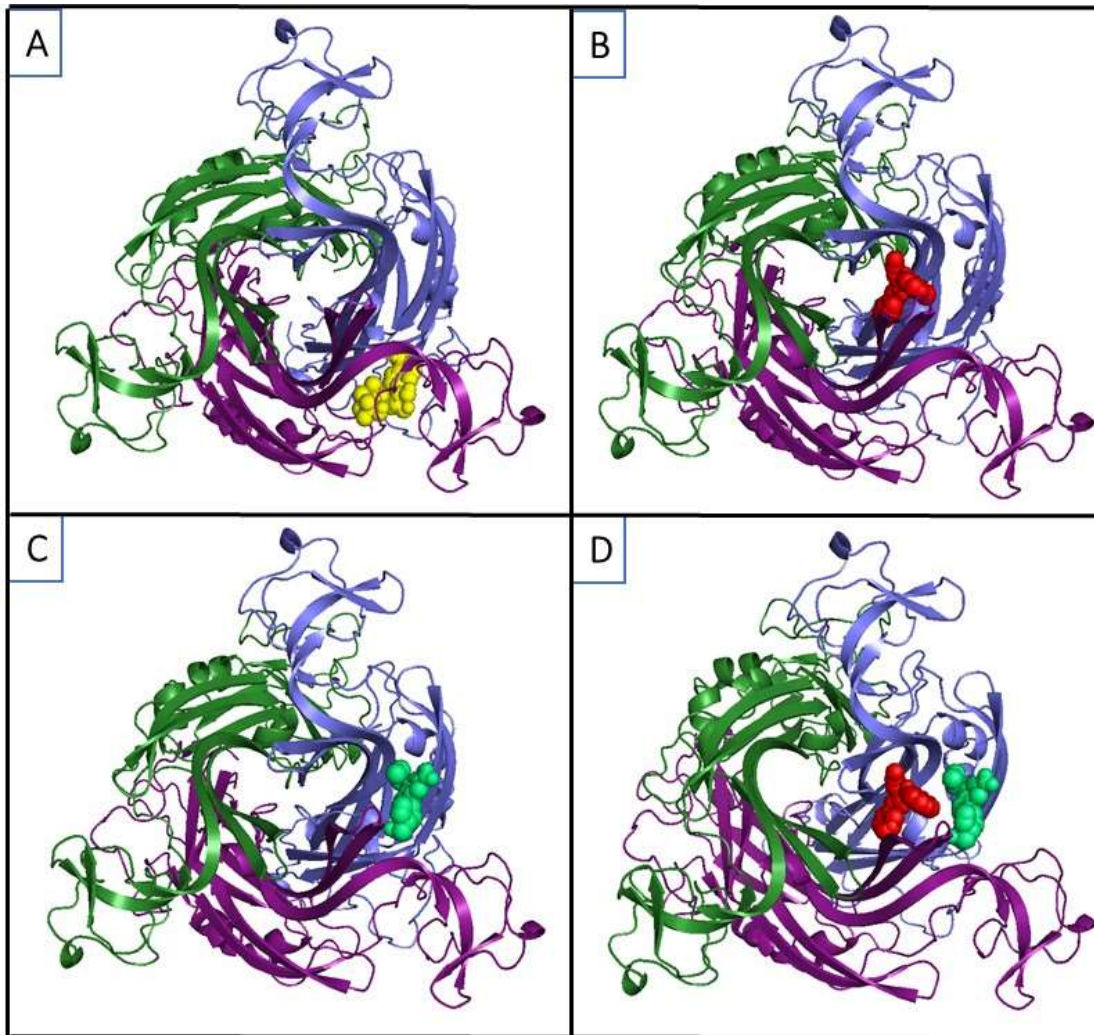


Figura 65. Sitios de unión principales de ATP, A804598 y ABC. (A) Unión de ATP (amarillo) al sitio de unión 1. (B) Unión de A804598 (rojo) al sitio de unión 2. (C) Unión de ABC (verde) al sitio de unión 2. (D) Unión de ABC en presencia de A804598 al sitio de unión 2.

8. MODULACIÓN ALOSTÉRICA DEL RECEPTOR P2X₇. ESTUDIOS DE POTENCIACIÓN.

Los resultados de “Docking” sugieren un sitio de unión distinto al sitio de unión del ATP (sitio 1) por parte de ABC sobre el receptor P2X₇. Por tanto, ABC podría estar actuando de forma alostérica sensibilizando el receptor a la acción del ATP.

8.1. Efectos sobre la interacción leucocito-endotelio.

Basándonos en los resultados previos (**Figuras 43 y 44**) seleccionamos las concentraciones de ABC 1 μM (de Pablo et al., 2010) y ATP 0.1 μM en PMNs y de ABC 1 μM y ATP 1 μM en PBMCs ya que no produjeron cambios significativos en los parámetros evaluados. Sin embargo, al usarlos en combinación, los efectos de ambos se ven potenciados observándose diferencias significativas respecto al tratamiento individual en la velocidad de rodamiento (**Figura 66 A**) y el rodamiento de PMNs (**Figura 66 C**) y la velocidad de rodamiento (**Figura 66 B**) y el rodamiento de PBMCs (**Figura 66 D**), no afectando al parámetro de adhesión leucocitaria.

Tras observar esta potenciación del efecto evaluamos la potencial implicación del receptor P2X₇ en esta respuesta mediante el pretratamiento de ambos tipos celulares (leucocitos o HUVEC) con el antagonista específico A804598. Los efectos producidos por la combinación de ATP y ABC fueron completamente revertidos tras el bloqueo del receptor P2X₇ en PMN (**Figuras 66 A y C**) y en PBMC (**Figuras 66 B y D**).

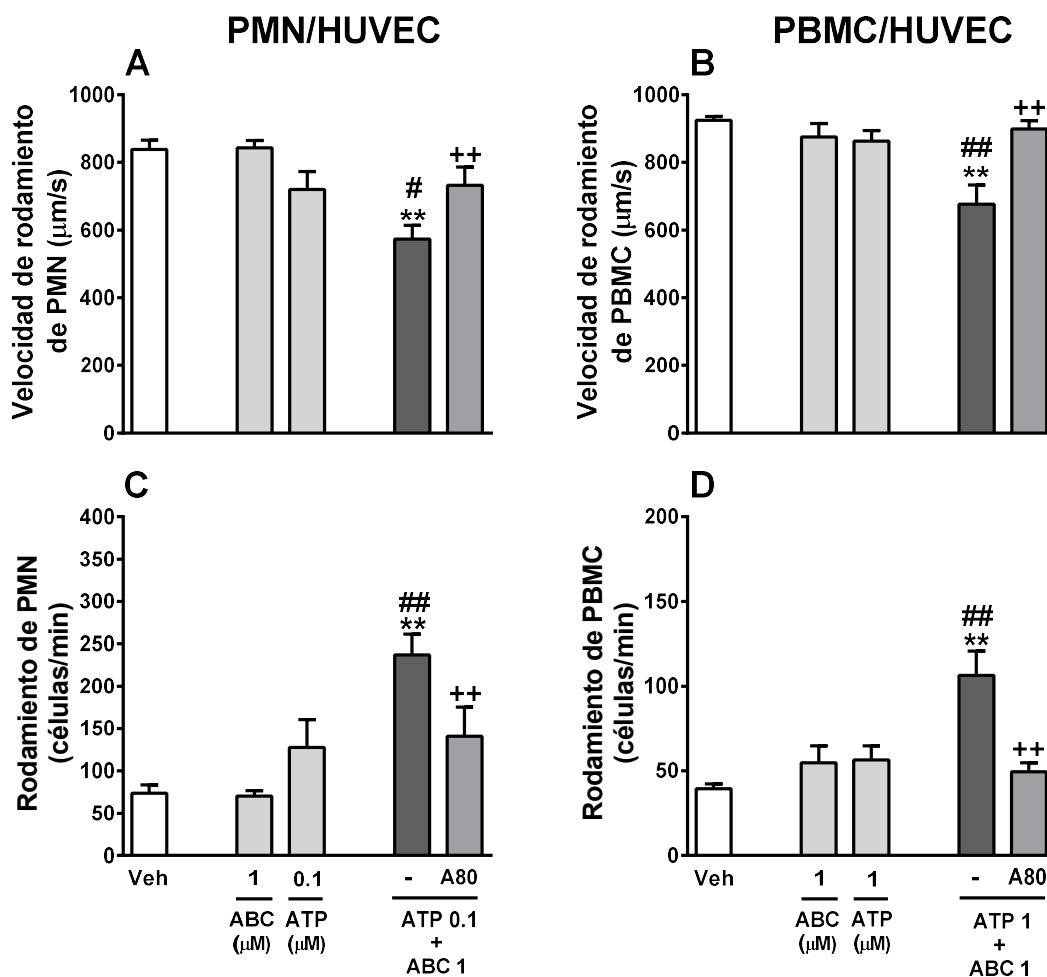


Figura 66. Implicación del receptor P2X₇ en la potenciación que produce ABC sobre de la interacción leucocito-endotelio inducida por ATP. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma individual o conjunta con ABC (1 µM) y ATP (0.1 µM para PMNs o 1 µM para PBMC) o vehículo (veh) durante 4h. En algunos casos se pretrataron con A804598 (30 min). Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B) y el rodamiento (C y D) de PMN y PBMC sobre el endotelio. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥5). **p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. #p<0.05 o ##p<0.01 respecto al grupo tratado con ATP. ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC+ATP. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

A pesar de que el CBV-TP no es el responsable de los efectos producidos por ABC, al unirse al receptor P2X₇ en el sitio del ATP (sitio 1) de igual forma que el ATP, ABC debería de potenciar sus efectos al igual que ATP. Basándonos en estudios previos (**Figuras 43 y 44**) se seleccionaron concentraciones de CBV-TP que por sí solas no tuvieron un efecto. Por ello las células se trataron con CBV-TP 10 µM y ABC 1 µM en PMN y PBMC. La combinación de ABC y CBV-TP produjo diferencias significativas en la

velocidad de rodamiento (Figura 67 A) y el rodamiento PMNs (Figura 67 C), así como en la velocidad de rodamiento de (Figura 67 B) y el rodamiento y de PBMCs (Figura 67 D). Estos efectos fueron bloqueados por el antagonista específico del receptor P2X₇, A804598.

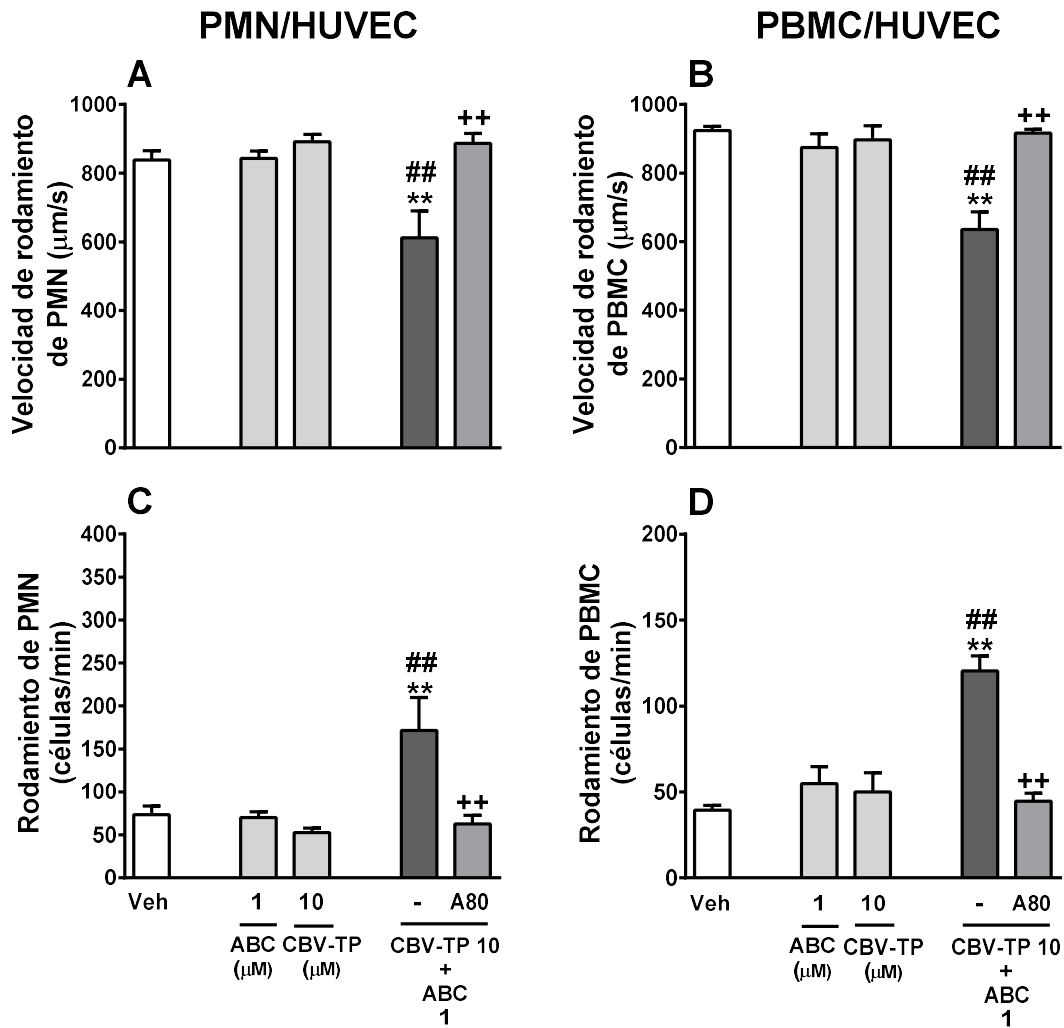


Figura 67. Implicación del receptor P2X₇ en la potenciación que produce ABC sobre de la interacción leucocito-Endotelio inducida por CBV-TP. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma individual o conjunta con ABC (1 µM) y CBV-TP (10 µM) o vehículo (veh) durante 4h. En algunos casos se pretrataron con A804598 (30 min). Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B) y el rodamiento (C y D) de PMN y PBMC sobre el Endotelio. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥5). **p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. #p<0.05 o ##p<0.01 respecto al grupo tratado con CBV-TP. ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC+CBV-TP. Análisis de varianza ANOVA seguidos del post-test Newman-Keuls.

8.2. Efectos sobre la expresión de Mac-1.

Se analizó el efecto de las combinaciones de ATP más ABC y CBV-TP más ABC endotelio sobre el aumento de la expresión de Mac-1 a concentraciones a las que por sí solos no tuvieron ningún efecto (**Figura 45**).

La sangre entera se trató durante 4 horas de forma individual o combinada con ABC 1 μM , ATP 0.1 μM y CBV-TP 1 μM para el posterior análisis de las subunidades de Mac-1 Cd11b y CD18 por citometría de flujo.

Ambas combinaciones -ABC/ATP y ABC/CBV-TP- incrementaron de forma significativa la expresión de las subunidades CD11b en neutrófilos (**Figuras 68 A y 69 A**) y monocitos (**Figuras 68 B y 69 B**). Para evaluar la potencial implicación del receptor P2X₇, en algunos casos se pretrató la sangre con el antagonista específico A804598. En ambas combinaciones ABC/ATP y ABC/CBV-TP el aumento de la expresión de la subunidad CD11b se revirtió cuando el receptor estaba bloqueado en neutrófilos (**Figuras 68 A y 69 A**) y monocitos (**Figuras 68 B y 69 B**).

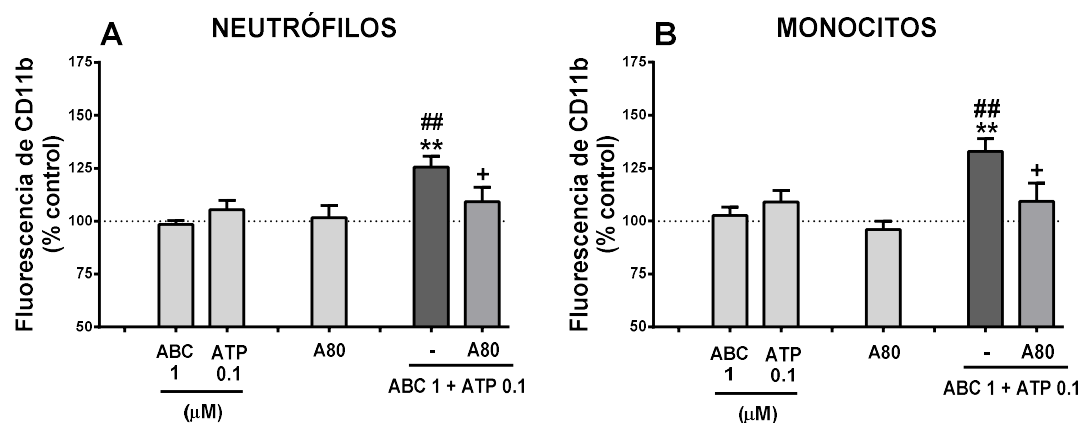


Figura 68. Importancia del receptor P2X₇ en la potenciación que produce ABC sobre la expresión de CD11b inducida por ATP. La sangre entera se trató de forma individual o conjunta con ABC (1 μM) y ATP (0.1 μM) o vehículo (veh) durante 4h. En algunos casos, la sangre se pretrató con el antagonista específico del receptor P2X₇ A804598 (A80, 30 min) antes del tratamiento y se cuantificó la expresión de la subunidad CD11b en neutrófilos (A) y monocitos (B). Los valores de fluorescencia (PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratados con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 6$). ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC. ## $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ATP. + $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con ABC/ATP. Análisis de varianza ANOVA seguidos del post-test Newman-Keuls.

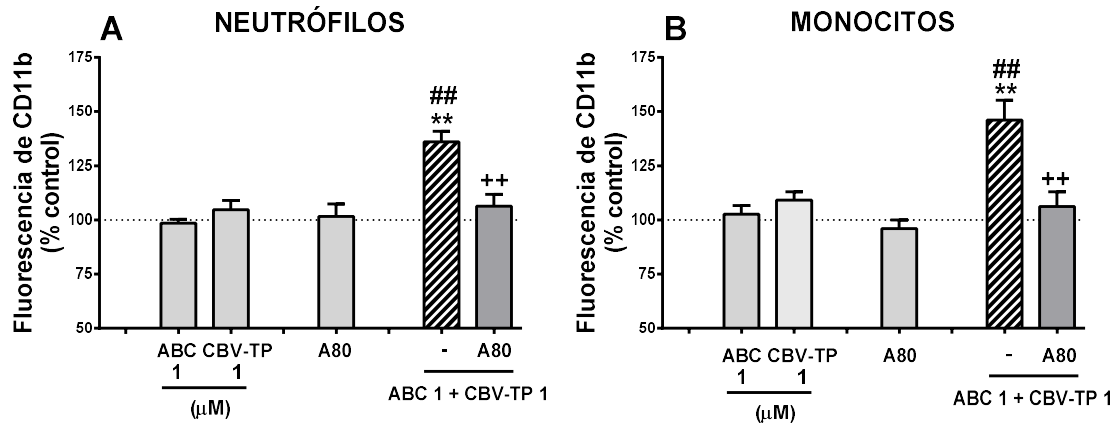


Figura 69. Importancia del receptor P2X₇ en la potenciación que produce ABC sobre la expresión de CD11b inducida por CBV-TP La sangre entera se trató de forma individual o conjunta con ABC (1 μ M) y CBV-TP (1 μ M) o vehículo (veh) durante 4h. En algunos casos, la sangre se pretrató con el antagonista específico del receptor P2X₇ A804598 (A80, 30 min) antes del tratamiento y se cuantificó la expresión de la subunidad CD11b en neutrófilos (A) y monocitos (B). Los valores de fluorescencia (PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratados con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media \pm E.E.M. ($n \geq 6$). ** $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC. # $p < 0.05$ o ## $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con CBV-TP. ++ $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con ABC/CBV-TP. Análisis de varianza ANOVA seguidos del post-test Newman-Keuls.

El efecto de ATP sobre la interacción leucocito-endotelio (**Figura 43**) y la expresión de Mac-1 (**Figura 45**) no fue revertido de forma específica por el antagonista del receptor P2X₇ (**Figuras 46 y 48**), mientras que en los estudios de potenciación del efecto de ATP por parte de ABC sí que fue dependiente del receptor P2X₇, repitiéndose estos resultados con la combinación ABC/CBV-TP. Por tanto, estos estudios funcionales sugieren que el efecto de ABC viene dado por su unión al receptor P2X₇ sobre otro sitio de unión 2 y sensibilizando al receptor a la unión del ATP extracelular en el sitio de unión 1.

9. IMPLICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓTIDOS EN EL EFECTO DE ABC.

Como hemos visto, ABC es capaz de potenciar los efectos de ATP sobre el receptor P2X₇ (**Figuras 66 y 68**). Además, la apirasa revierte los efectos de ABC (**Figura 18**) y degrada a el ATP pero no el ABC (**Tablas 12 y 13**). Esto unido al hecho de que el tratamiento con ABC induce una disminución del ATP intracelular (**Figura 52 A**) sugieren que el ATP puede estar liberándose y actuando sobre el receptor P2X₇ a pesar de su rápida degradación. Por ello nos planteamos el análisis de distintos transportadores que participan en la salida del ATP del medio intracelular al extracelular.

9.1. Efecto sobre la interacción leucocito-endotelio.

Empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo evaluamos la implicación de los canales de conexina y de panexina en el efecto producido por ABC. Para ello se trataron tanto las células endoteliales como los leucocitos con distintos antagonistas de los transportadores de ATP como; el compuesto bloqueante de las uniones gap formadas por los canales de conexina (Carbenexolona, CBX), un compuesto que bloquea tanto los canales de conexina como los de panexina y también el receptor P2X₇ (Probenecid, Prob), un péptido que bloquea los canales de panexina-1 ligados a la activación del receptor P2X₇ (Panx¹⁰) y un péptido que bloquea los canales de conexina-43 de forma intracelular (Gap¹⁹).

La interacción PMN-endotelio inducida por ABC fue completamente abolida por el pretratamiento de ambos tipos celulares con Prob, CBX) y Gap¹⁹, sin embargo, Panx¹⁰ no revirtió el efecto de ABC en ninguno de los parámetros evaluados en PMNs (**Figuras 70 A, C y E**).

En la interacción PBMC-endotelio los efectos de Probenecid y Gap¹⁹ se reprodujeron bloqueando los efectos de ABC, mientras que Carbenexolona y Panx¹⁰ no tuvieron ningún efecto (**Figuras 70 B, D y F**).

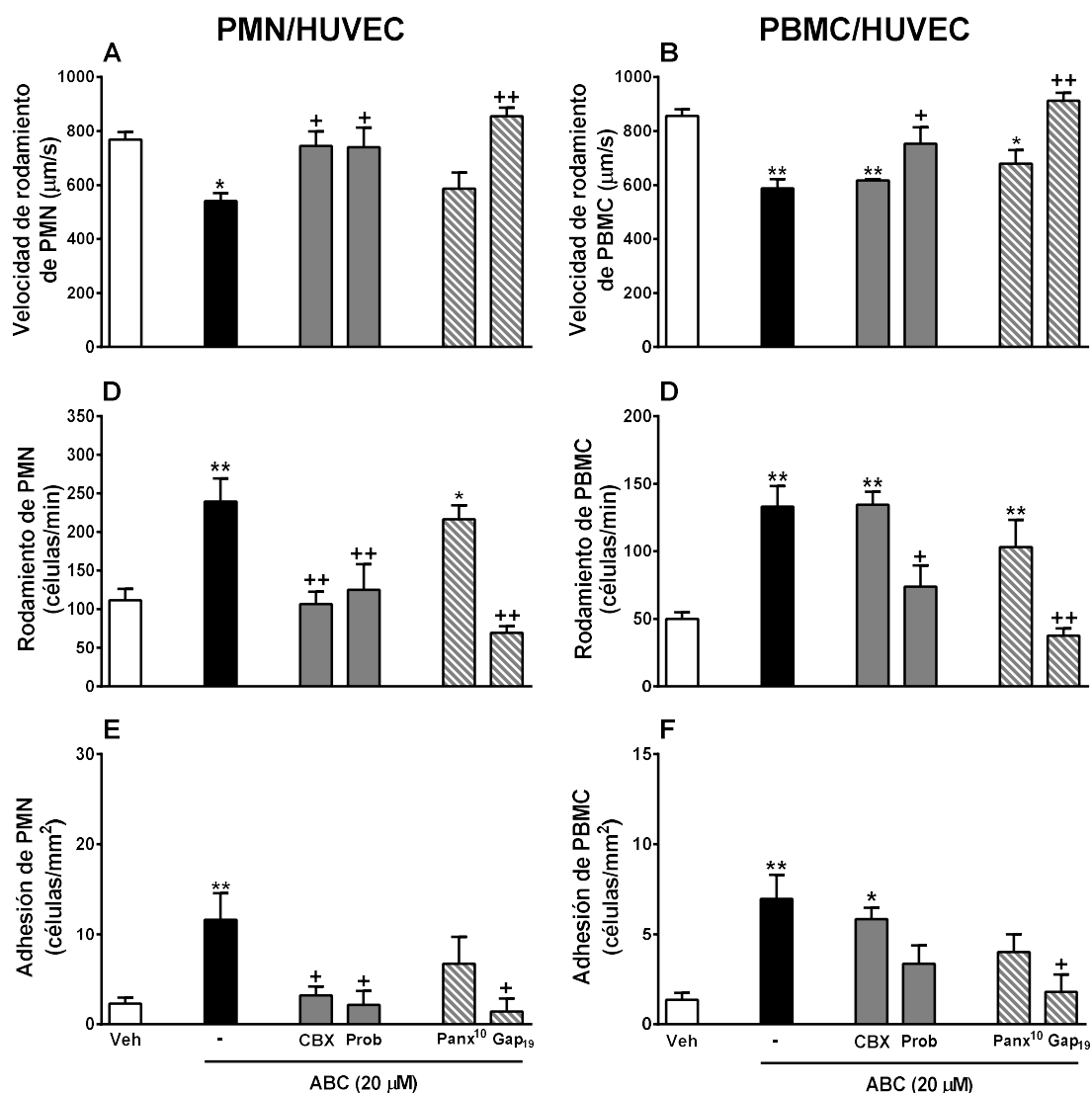


Figura 70. Implicación de los transportadores de nucleótidos en los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio. HUVEC y leucocitos (PMN o PBMC) fueron tratados de forma independiente con; el compuesto bloqueante de las uniones gap formadas por los canales de conexina (CBX), un compuesto que bloquea tanto los canales de conexina, panexina y el receptor P2X₇ (Prob), un péptido que bloquea los canales de panexina-1 (Panx¹⁰) y un péptido que bloquea los canales de conexina-43 (Gap¹⁹) antes del tratamiento con abacavir (ABC, 20 μM) o vehículo (veh) durante 4h. Tras realizar el montaje de la cámara de flujo, se cuantificó la velocidad de rodamiento (A y B), rodamiento (C y D) y adhesión (E y F) de PMN y PBMC al endotelio. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥4) *p<0.05 O **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. +p<0.05 o ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

9.2. Efecto sobre la expresión de Mac-1.

Para determinar si los canales de ATP están implicados en la expresión de Mac-1, analizamos en sangre procedente de donantes sanos el efecto de Carbenexolona (CBX) y Probenecid (Prob) al tratamiento con ABC mediante citometría de flujo.

El pretratamiento con CBX y Prob bloquearon de forma dosis dependiente el efecto de ABC sobre la expresión de la subunidad CD11b tanto en neutrófilos (**Figura 71 A**) y en monocitos (**Figura 71 B**).

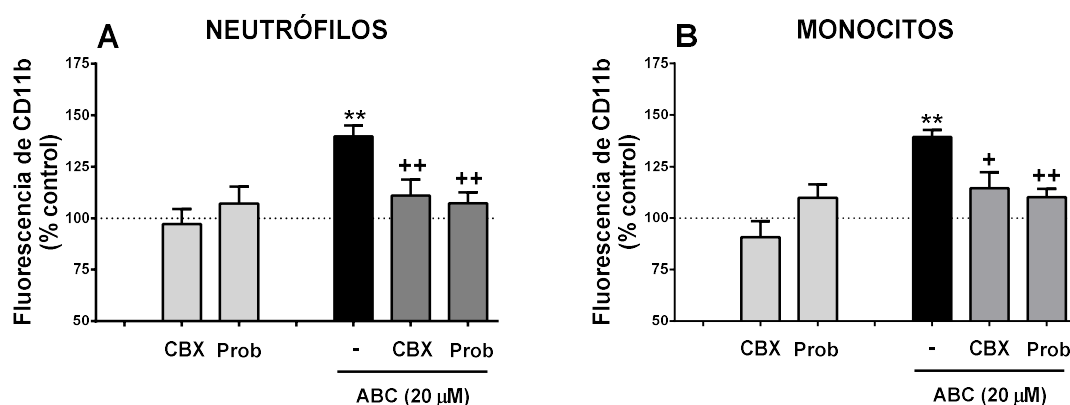


Figura 71. Implicación de los transportadores de nucleótidos en los efectos de ABC sobre la expresión de Mac-1. La sangre entera se trató con el compuesto bloqueante de las uniones gap formadas por los canales de conexina (CBX) y un compuesto que bloquea tanto los canales de conexina, panexina y el receptor P2X₇ (Prob) antes del tratamiento con abacavir (ABC, 20 μM) o vehículo (veh) durante 4h y se cuantificó la expresión de la subunidad CD11b en neutrófilos (A) y monocitos (B). Los valores de fluorescencia (PE) representan el % de la mediana de la intensidad de fluorescencia respecto del grupo control (tratados con vehículo, 100%). Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n≥6). **p<0.01 respecto al grupo tratado con vehículo. *p<0.05 o ++p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

Estos resultados implican a los canales de conexina-43 en los efectos producidos por ABC. Estos canales podrían formar uniones gap participes en la interacción leucocito-endotelio, conectando ambos tipos celulares, y además podrían participar en la liberación de ATP al medio extracelular. Gap¹⁹ es un péptido que bloquea estos canales de forma intracelular sin afectar a estas uniones gap, sugiriendo una posible liberación de ATP al medio extracelular tras tratamiento con ABC.

BLOQUE II. ESTUDIOS IN VIVO

1. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PURINÉRGICA EN LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE ABC.

Con el fin de darle mayor relevancia fisiológica a nuestros resultados, evaluamos el efecto producido por ABC sobre la interacción leucocito-endotelio empleando la técnica de microscopía intravital en cremáster de ratón. Para ello ABC se administró por vía intraescrotal (i.e, 10-30 μ M) y en algunos casos la administración se realizó de forma oral (100/200 mg/kg) (Ver material y métodos, Bloque II, 1.4 protocolo experimental).

ABC produjo una reducción significativa de la velocidad de rodamiento (**Figura 72 A**) y un incremento significativo y dosis dependiente en los parámetros de rodamiento (**Figura 72 B**) y adhesión (**Figura 72 C**) por vía intraescrotal. La administración oral de ABC reprodujo los efectos de la administración local. Las concentraciones plasmáticas de ABC fueron de 5.3 ± 0.8 μ g/mL y 16.2 ± 1.9 μ g/mL tras la administración de 100 y 200 mg/kg de ABC respectivamente. La concentración obtenida para la dosis de 100 mg/kg (5,3 μ g/mL en plasma) se encuentra dentro del rango clínicamente relevante en humanos.

En algunos casos, tras la evaluación de la interacción leucocito endotelio se empleó el modelo de trombosis inducida por FeCl₃ (Ver material y métodos, Bloque II, 1.1 Modelo de trombosis mediante FeCl₃) y se evaluó el posible efecto protrombótico de ABC en arteriolas de cremáster de ratón. Así, ABC indujo una disminución significativa dosis dependiente del tiempo de oclusión en la administración oral (**Figura 72 D**) lo que sugiere de forma preliminar un efecto protrombótico.

RESULTADOS

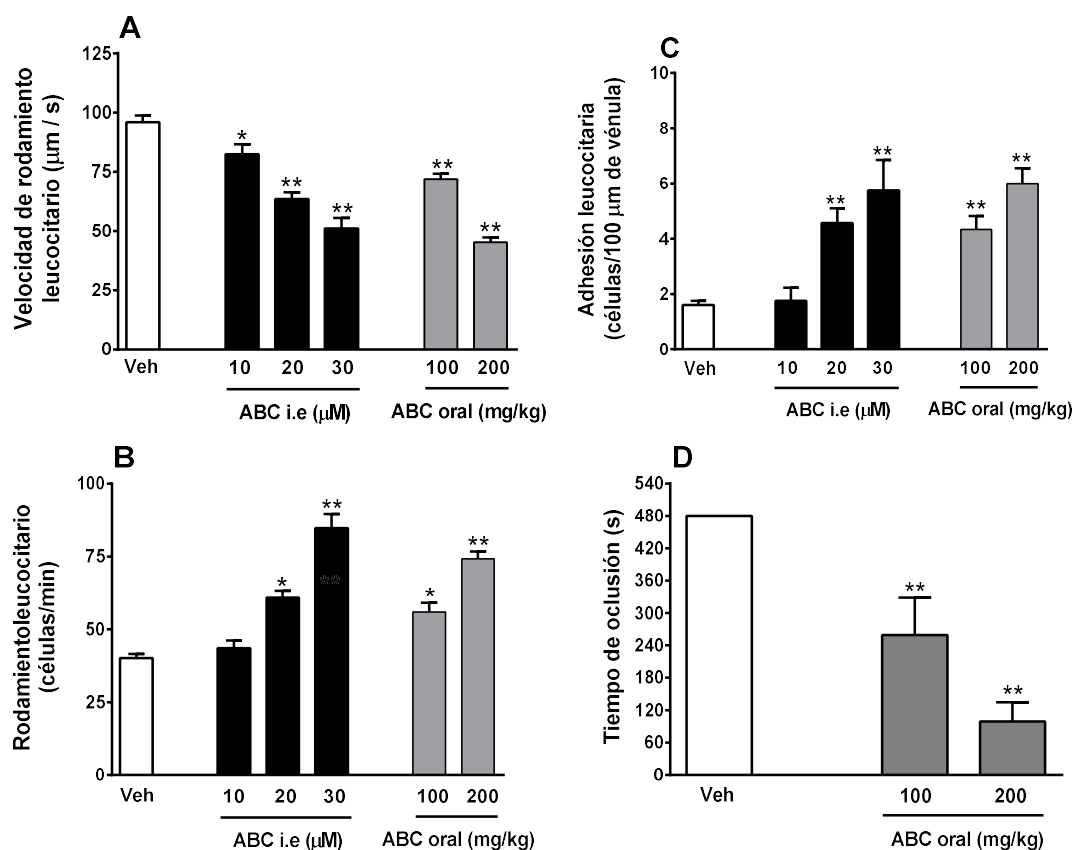


Figura 72. Efecto proinflamatorio de ABC en cremáster de ratón. Los ratones WT se trataron durante 4h por vía intraescrotal (i.e) con salino (vehículo, veh) o abacavir (ABC, 10-30 µM) o por vía oral (100-200 mg/kg). En vénulas se cuantificaron los siguientes parámetros: Velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) leucocitaria. A continuación, en arteriolas se cuantificó el tiempo de oclusión tras la superfusión con FeCl₃ hasta un máximo de 8 minutos (D). Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥5). *p<0.05 o **p<0.01 respecto al grupo WT tratado con el vehículo. Análisis de varianza de ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

Para evaluar la implicación del receptor P2X₇ en el efecto producido por ABC “in vivo” utilizamos una estrategia farmacológica pretratando los ratones con distintos antagonistas de los receptores purinérgicos antes del tratamiento con ABC (20 μM, i.e) y otra en la que empleamos ratones modificados genéticamente deficientes en el receptor P2X₇. Los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio, concretamente el rodamiento leucocitario (**Figura 73 B**) y la adhesión leucocitaria (**Figura 73 C**) fueron revertidos tanto con suramin (antagonista inespecífico de los receptores P2) como con cualquiera de los dos antagonistas específicos para los receptores P2X₇ (A804598 y BBG). Sin embargo, no observamos ninguna modificación cuando los ratones se pretrataron con un antagonista específico de los receptores P2X₂₋₃ (A317491).

Cuando comparamos ratones WT con ratones KO para el receptor P2X₇ observamos que en los ratones KO, ABC no fue capaz de producir ningún efecto sobre los parámetros leucocitarios inducidos por el fármaco en los ratones WT (**Figura 74**).

Estos resultados demuestran la implicación de los receptores P2X₇ en la interacción leucocito-endotelio producida por ABC “in vivo”, corroborando los resultados “in vitro” obtenidos.

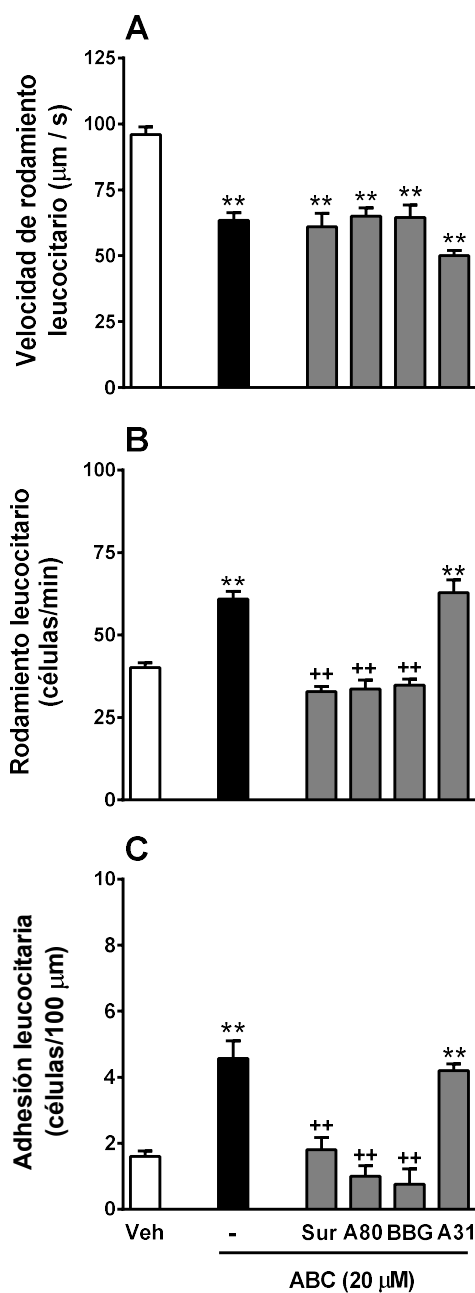


Figura 73. Implicación de los receptores P2X₇ en la interacción leucocito-entotelio producida por ABC. Los ratones se trataron durante 4h por vía intraescrotal (i.e) con salino (vehículo, veh) o abacavir (ABC, 20 μM). En algunos casos los ratones se pretrataron (i.p) con distintos antagonistas de los receptores P2: suramin, (Sur, antagonista no selectivo de los receptores P2X/Y, 400 mg/kg, 60 min), A804598 (A80, antagonista específico del receptor P2X₇, 1mg/kg, 30 min), BBG (Antagonista específico del receptor P2X₇, 45 mg/kg, 30 min) o A317491 (A31, antagonista específico de los receptores P2X₂₋₃, 1mg/ml, 30 min) previo al tratamiento con ABC (20 μM) y se cuantificaron a las 4h los siguientes parámetros: Velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) leucocitaria. Los resultados son expresados como media \pm E.E.M. (n \geq 5). **p<0.01 respecto al grupo tratado con el vehículo. **p<0.01 respecto al grupo tratado con ABC. Análisis de varianza de ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

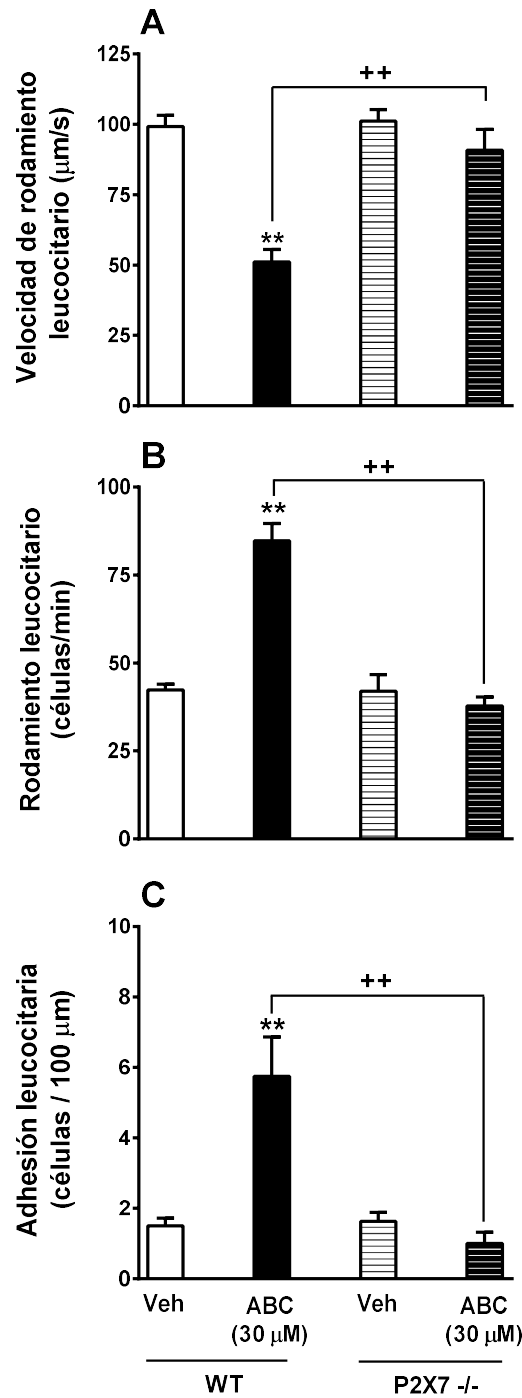


Figura 74. Comparación del efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio entre ratones WT y ratones P2X7^{-/-}. Los ratones WT o P2X7^{-/-} se trataron durante 4h por vía intraescrotal (i.e) con salino (vehículo) o abacavir (ABC, 30 µM, 4h) y se cuantificaron los siguientes parámetros: Velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) leucocitaria. Los resultados son expresados como media ± E.E.M. (n≥5). **p<0.01 respecto al grupo WT tratado con el vehículo. ++p<0.01 respecto al grupo WT tratado con ABC. Análisis de varianza de ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

V. DISCUSIÓN

El ITIAN análogo de guanosina ABC es uno de los fármacos más empleados en el tratamiento del VIH. Generalmente se ha considerado seguro, sin embargo, hoy en día existe una creciente evidencia que relaciona su uso con un aumento del riesgo cardiovascular (Sanz et al., 2005, Sabin et al., 2008, Worm et al., 2010, Obel et al., 2010). Su controvertida cardiotoxicidad ha ido en aumento debido tanto a la disparidad de estudios clínicos con diferentes conclusiones como a la inexistencia de un mecanismo de acción que pudiera justificar esta toxicidad vascular asociada a ABC.

En un estudio realizado por el grupo D:A:D se observó que en pacientes en tratamiento con ABC el riesgo cardiovascular disminuye una vez que el fármaco se deja de administrar apuntando a un mecanismo rápido de inflamación vascular (Sabin et al., 2008). En este sentido, otros autores relacionan ABC con los pasos iniciales de la inflamación vascular y disfunción plaquetaria debido a una disminución de la enzima óxido nítrico sintasa (Wang et al., 2009), al aumento de la expresión de P-selectina plaquetaria (Baum et al., 2011) o a un aumento de IL-6 y de CRP en pacientes tratados con ABC (SMART/INSIGHT & DAD study groups, 2008). Esta inflamación vascular involucra la acumulación de leucocitos y plaquetas en la pared vascular. En las primeras etapas del proceso, los leucocitos circulantes interaccionan con el endotelio vascular adhiriéndose a éste y migrando finalmente a nivel tisular. Adicionalmente, las plaquetas pueden unirse al endotelio, a dichos leucocitos adheridos y reclutar más plaquetas o leucocitos circulantes, lo que puede llevar a provocar la formación de un trombo y promover el proceso aterosclerótico (Ley et al., 2007, Gawaz et al., 2005).

El hecho de que estos fármacos se administren siempre en combinación hace que sea difícil estudiar a través de ensayos clínicos la potencial toxicidad vascular de un agente antirretroviral concreto y justifica la realización de estudios experimentales controlados tanto “in vitro” a través del empleo de células humanas como “in vivo” utilizando animales de experimentación. Nuestro grupo ha publicado distintos estudios que confirman esta inflamación vascular asociada a ABC (de Pablo et al., 2010, de Pablo et al., 2012, de Pablo et al., 2013), demostrando que concentraciones clínicamente relevantes (20 μM equivalente a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) producen un aumento sobre la interacción leucocito-endotelio tanto “in vitro” como “in vivo”, siendo estas interacciones el primer paso en el desarrollo

DISCUSIÓN

de enfermedades cardiovasculares de componente inflamatorio (Ley et al., 2007). El sistema empleado *in vitro* fue la adhesión dinámica en cámara paralela de flujo en la que los leucocitos fluyen sobre una monocapa de células endoteliales con una velocidad de flujo que representa las condiciones “*in vivo*” y que nos permite observar el rodamiento y la adhesión entre leucocitos y células endoteliales (Goetz et al., 1999). Los estudios *in vivo* se realizaron utilizando la microscopía intravital, aproximación metodológica que permite el análisis en detalle del proceso inflamatorio estudiando la velocidad de rodamiento, el rodamiento, la adhesión y la migración de los leucocitos en vénulas de animales vivos anestesiados (Hughes et al., 2010) y permitiendo evaluar el efecto de los fármacos administrados a nivel local. La elección de una ruta de administración local es aceptada como alternativa a una administración sistémica ya que permite que la solución administrada bañe directamente el tejido a analizar (Hughes et al., 2010).

Estos efectos aparecen rápidamente y son reversibles, lo cual está en concordancia con las observaciones clínicas mencionadas anteriormente (Sabin et al., 2008). Además, a través de los dos sistemas demostramos que estas interacciones inducidas por ABC eran debidas a las moléculas de adhesión Mac-1 leucocitaria interaccionando con ICAM-1 endotelial (de Pablo et al., 2010, de Pablo et al., 2013). Estos efectos parecen estar relacionados con la estructura química de ABC, ya que solo fueron reproducidos por ddl (ITIAN análogo de purina) y no por los ITIAN análogos de pirimidina (lamivudina, zidovudina o emtricitabina) o por el ITIAN análogo de nucleótido tenofovir (de Pablo et al., 2012, de Pablo et al., 2013). Por ello, una de las principales hipótesis que planteamos con el fin de explicar la toxicidad vascular asociada a ABC fue la posible implicación de la vía purinérgica, debido a la similitud estructural que presentan los análogos de purina con los mediadores purinérgicos y al hecho de que solo ddl, el otro ITIAN análogo de purina, reprodujo los efectos “*in vivo*” e “*in vitro*” producidos por ABC (de Pablo et al., 2010, de Pablo et al., 2013). Los mediadores purinérgicos como el ATP y ADP son las principales moléculas de señalización paracrina que pueden desencadenar mecanismos vasculares proinflamatorios y protrombóticos, que implican la activación y adhesión tanto leucocitaria como plaquetaria y finalmente la formación de la placa aterosclerótica; todo ello mediante la interacción con los

receptores de nucleótidos P2X. Estudios iniciales en nuestro laboratorio señalaron al receptor P2X₇ como el mediador de los efectos de ABC en dicha interacción (Esplugues et al., 2016). En la presente tesis doctoral nos centramos en expandir esta primera observación que apunta al receptor P2X₇; estudiando su implicación en los efectos de ABC, caracterizando el ligando mediante el cual ABC está actuando y profundizando en los efectos “in vivo” de este fármaco que termine de justificar su toxicidad cardiovascular.

Los receptores purinérgicos se encuentran localizados en una gran variedad de tipos celulares y participan en una gran cantidad de procesos inflamatorios (Burnstock et al., 2017) y se subdividen en dos familias: P2X y P2Y (**Figura 10**). Los receptores P2X son receptores acoplados a canales iónicos que permiten la entrada de Ca²⁺ para su activación, mientras que los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G. La presente tesis doctoral demuestra que las acciones proinflamatorias de ABC involucran a la señalización purinérgica mediante la implicación de los receptores P2X₇. Así, los efectos de ABC sobre el rodamiento y la adhesión “in vivo” en cremáster de ratón fueron revertidos por el antagonista inespecífico de los receptor P2X/Y (suramin) y por dos antagonistas específicos del receptor P2X₇ (A804598 y BGG) y no por el bloqueo de otro subtipo de receptores P2X. Además, las acciones de ABC sobre la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión leucocitaria no se reprodujeron en ratones KO para el receptor P2X₇, lo que corrobora la importancia de este receptor en los efectos de ABC. Los experimentos “in vitro” en células humanas reforzaron esta hipótesis. De nuevo, suramin revirtió los efectos de ABC en la interacción PMN/PBMC endotelio. El hecho de que esta acción también fueron revertida por un quelante de Ca²⁺ (EGTA) confirma la implicación de los receptores P2X acoplados a canales de calcio y excluye la implicación de los receptores P2Y en estos efectos, resultados que se confirmaron al no observar ninguna reversión con el bloqueo farmacológico de los receptores P2Y. El bloqueo específico de los receptores P2X₇, y no de otros receptores P impidió los efectos de ABC confirmando que los efectos de ABC son debidos a la activación de receptores P2X₇. Por último, los efectos se revirtieron con el pretratamiento con apirasa, compuesto que hidroliza ATP, que es el ligando endógeno del receptor P2X₇ y podría ser el responsable del efecto de ABC.

DISCUSIÓN

La implicación del receptor P2X₇ en los efectos proinflamatorios de ABC no es casual, ya que este receptor está implicado de forma directa en la generación de un ambiente proinflamatorio (Bours et al., 2011). La señalización purinérgica puede contribuir a este proceso a través de receptores purinérgicos P2X, localizados en una gran variedad de tipos celulares, así, los receptores P2X₇ han sido descritos tanto en leucocitos (Burnstock et al., 2014, Karmakar et al., 2016) como en células endoteliales (Wilson et al., 2007). Los resultados obtenidos mediante el sistema de adhesión en cámara paralela de flujo señalan a los receptores P2X₇ presentes en los leucocitos como los principales responsables de esta acción proinflamatoria de ABC.

Como hemos mencionado anteriormente, el reclutamiento de leucocitos inducido por ABC está mediado por la interacción entre Mac-1 leucocitaria e ICAM-1 endotelial (de Pablo et al., 2010). La integrina β_2 Mac-1 se considera como un enlace importante entre la adhesión celular y la trombosis (Hirahashi J et al., 2009); presente en neutrófilos y monocitos interacciona con ICAM-1 endotelial causando la adhesión de estos al endotelio. Diversos trabajos relacionan la activación del receptor P2X₇ a nivel endotelial con la generación de una inflamación vascular que lleva al reclutamiento leucocitario mediante la interacción Mac-1/ICAM-1 (Ley et al., 2007). Así, la activación de este receptor P2X₇ por ATP conlleva la entrada de un flujo de Ca²⁺ y la activación del NALP3 inflamasoma, siendo un potente estímulo para la liberación de distintas citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, TNF- α y LPS, así como la producción de ERO y la activación del factor de transcripción NF- κ B (Bours et al., 2011, Cruz et al., 2007) que darían lugar finalmente a la expresión de distintas moléculas de adhesión leucocitarias como Mac-1 o endoteliales como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina. El presente estudio está en línea con este concepto, pero en este caso los receptores P2X₇ están principalmente localizados en leucocitos y su activación es necesaria para que se exprese Mac-1 que mediará la interacción leucocito-endotelio producida por ABC.

Una vez confirmada la implicación del receptor P2X₇ leucocitario en los efectos proinflamatorios de ABC nos planteamos caracterizar el ligando a través del cual estaría actuando; ya que el efecto de ABC podría deberse a la activación directa del receptor por su parte, a su ligando endógeno ATP o por último al metabolito activo intracelular

de ABC, CBV-TP. Los resultados obtenidos mediante estudios de unión de radioligandos indican que ABC no es capaz de unirse al receptor en el mismo sitio de unión al no ser capaz de desplazar al radioligando, sin embargo, ATP y CBV-TP sí que produjeron un desplazamiento parcial de éste, lo que indica que si son capaces de unirse al sitio de unión analizado y podrían ser los responsables del efecto de ABC.

Estos resultados nos llevaron a analizar el efecto de ambos compuestos sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1 (CD11b/CD18), ya que para ser responsables de los efectos de ABC deberían reproducir sus efectos sobre ambos parámetros. Tanto ATP como CBV-TP son capaces de inducir de forma dosis dependiente la interacción leucocito-endotelio en cámara de flujo y la sobreexpresión de Mac-1 (CD11b/CD18), reproduciendo los efectos de ABC a concentraciones de 1-10 μM para ATP y de 10 a 50 μM para CBV-TP. En los estudios de la implicación de la vía purinérgica en estos efectos observamos que el efecto del ATP no es un efecto específico del receptor P2X₇ al revertir solo el parámetro de adhesión leucocitaria, mientras que el antagonista inespecífico de los receptores P2X/Y (suramin) y el compuesto que hidroliza ATP (apirasa) sí que revirtieron sus efectos. Una posible explicación a este resultado podría ser la implicación de otro tipo de receptores purinérgicos en los efectos de ATP, así como una implicación mayor de las células endoteliales en su efecto, al contrario que ocurre con ABC donde intervienen en mayor medida los leucocitos. Por ejemplo, se ha descrito la implicación de los receptores P2Y₁ en la activación del endotelio y posterior adhesión leucocitaria por parte de ATP y ADP (Cardoso et al., 2017). En el caso de CBV-TP, los efectos sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la sobreexpresión de Mac-1 fueron revertidos por apirasa, suramin y por el antagonista específico del receptor P2X₇ (A804598), resultados que, por tanto, apuntaron al CBV-TP como responsable de los efectos de ABC.

Una vez demostrado que CBV-TP produce efectos similares a ABC nos planteamos si sería posible detectar este compuesto a nivel intra y extracelular. ABC es una molécula de carácter lipofílico, aunque también presenta una alta solubilidad en agua, lo que le permite atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva y dentro de la célula transformarse en CBV-TP mediante una serie de reacciones enzimáticas (Barbarino et

DISCUSIÓN

al, 2014). Así, al estudiar el metabolismo de ABC, no encontramos cambios en los niveles extracelulares de ABC sugiriendo un metabolismo lento por parte de las células HUVEC y de los leucocitos, encontrando concentraciones bajas de ABC y carbovir total a nivel intracelular. Los niveles de CBV-TP detectados (HUVEC: 298 ± 15.33 , PMN: 342 ± 18.21 , PBMC: 330 ± 14.32 , fmoles/ 10^6 células) a pesar de encontrarse dentro del rango clínico (Moyle et al., 2009) son muy inferiores a los necesarios para inducir la interacción-leucocito y la sobreexpresión de Mac-1, y por tanto se descartó a CBV-TP como responsable del efecto de ABC.

Una vez descartado al CBV-TP, nos planteamos estudiar el metabolismo de los nucleótidos, ya que los resultados obtenidos iniciales del estudio no descartan al ATP como mediador del efecto. Primero, se cuantificaron los niveles de ATP tras tratamiento con ABC, observando una disminución de los niveles de ATP intracelulares en PMN lo que podría sugerir una liberación al medio extracelular, mientras que no se detectó ninguna variación en los niveles extracelulares de nucleótidos (rango de 20-600 nM a los tiempos evaluados). El metabolismo de nucleótidos extracelulares ocurre de manera rápida a través de una gran variedad de ecto-enzimas, por un lado encontramos las encargadas de la ruptura secuencial de nucleótidos a adenosina -ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa/CD39), ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP) y ecto-5'-nucleotidasa (CD73)-, y por otro lado, las encargadas de la re-síntesis de fosforilos de alta energía a través de reacciones de fosforilación en sentido opuesto -adenilato quinasa (AK) y la ecto-nucleósido difosfato quinasa (E-NDP-K)- (Yegutkin 2008). Se estudió por un lado si el tratamiento con ABC modificaba el metabolismo de nucleótidos añadidos exógenamente en HUVEC, PMNs o PBMCs, y por otro si este tratamiento afectaba a las mencionadas anteriormente. Así, observamos una degradación rápida de ATP y que el tratamiento con ABC no modificó ni el metabolismo de los nucleótidos, ni la expresión ni la actividad de las enzimas partícipes en su degradación y por tanto se descartó un efecto directo de ABC sobre esta vía de degradación.

Sin embargo, la reversión producida por apirasa sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1 producida por ABC nos hizo pensar en el ATP

como ligando responsable, por lo que estudiamos la acción de esta enzima sobre ABC, CBV-TP y ATP para descartar que apirasa estuviese degradando el ABC. Los resultados demostraron que apirasa degrada rápidamente el ATP y el CBV-TP mientras que no actúa sobre ABC, lo que unido a las bajas concentraciones de ATP necesarias para producir el efecto sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1 podría sugerir que el ATP es necesario para las acciones del ABC.

Hasta el momento, los estudios realizados confirman una clara implicación del receptor P2X₇ en los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1, receptores además localizados principalmente en leucocitos, sin embargo, continúa sin estar clara como se lleva a cabo la activación de este receptor. Los estudios de unión de radioligandos apuntan al ATP y al CBV-TP, pero CBV-TP queda descartado al no detectarse niveles suficientes tras el tratamiento con ABC para producir un efecto sobre la interacción leucocito-endotelio y expresión de Mac-1. La reversión por parte de apirasa, demostrando que no degrada al ABC y si al ATP, apunta directamente a este último como el responsable del efecto de ABC, además de observar una disminución del ATP intracelular en PMN que podría sugerir una liberación de éste al medio extracelular. Sin embargo, los efectos de ATP sobre los parámetros evaluados no son específicos de P2X₇ y no conseguimos detectar un aumento en los niveles de ATP extracelular, posiblemente debido a su rápida metabolización por parte de las enzimas encargadas del metabolismo de nucleótidos, que además no se ven afectadas por el tratamiento con ABC.

Recientemente se ha descrito que durante una infección o proceso inflamatorio el receptor P2X₇ modula su afinidad al ATP a través de diversos agentes mediante modulación alostérica que actúan sobre la región extracelular del receptor (Rissiek et al., 2015 Coddou et al., 2011). Esto plantea la cuestión de si el cambio de la actividad del receptor P2X₇ puede ocurrir bajo condiciones patológicas, permitiendo la activación de éste a concentraciones mucho más bajas que las habituales para activar al receptor (del orden de 1 mM). Actualmente se sugiere que estas altas concentraciones son un mecanismo de protección del receptor, ya que su activación como se ha descrito anteriormente da lugar a la liberación de diversos mediadores proinflamatorios como

DISCUSIÓN

ERO o IL-1 β , de forma que en situaciones fisiológicas el receptor P2X₇ se encuentra inactivo (Di Virgilio et al., 2018). Este receptor es un trímero que necesita de 3 moléculas de ATP para su activación, encontrando su sitio de unión en la región extracelular. La ocupación parcial de estos 3 sitios de unión da lugar a su apertura parcial y el posterior flujo de Ca²⁺, mientras que la ocupación de todos los sitios con concentraciones altas de ATP da lugar a la apertura total del poro. Por tanto, la velocidad y grado de sensibilización determinará el grado de activación del receptor (Moura et al., 2015).

A partir de la estructura del receptor P2X₄ en peces cebra se han construido modelos homólogos del receptor P2X₇, lo que ha permitido el estudio del receptor mediante cristalografía y estudios de “docking” (Karasawa et al., 2016). Los estudios de “docking” consisten en un modelado molecular que nos permite predecir cual es la conformación de una molécula al unirse con otra, analizando la estabilidad del complejo mediante la fuerza de unión de esta asociación. El modelo del receptor se basa en la presencia de dos sitios de unión distintos, un sitio de unión principal o sitio 1 (del ATP) y otro sitio de unión secundario o sitio 2 para el A804598. Esto implica que el antagonista A804598 actuaría como antagonista no competitivo reversible, a diferencia de lo descrito inicialmente donde se definía como un antagonista competitivo reversible del receptor (Donnelly-Roberts et al., 2009). Varios estudios recientes donde confirman un nuevo sitio de unión cercano al sitio de unión principal y que sólo está presente en el receptor P2X₇ (Karasawa et al., 2016, Di Virgilio et al., 2018) pudiendo explicar los resultados previos obtenidos.

Los resultados obtenidos mediante los estudios de “docking” sugieren que ABC no es capaz de interactuar en el sitio de unión principal del ATP, teniendo energías de unión no favorables (positiva) y por tanto siendo incapaz de formar un complejo estable con el receptor; mientras que para ATP y CBV-TP sí que se obtuvieron energías muy favorables formando ambos complejos estables con capacidad de activación del receptor en este sitio de unión 1. El segundo sitio de unión analizado es el sitio de unión del A804598 o sitio 2, en este ABC sí que es capaz de interactuar y formar un complejo estable pudiendo modular al receptor. Además, ATP y CBV-TP presentan una energía libre favorable por este sitio de unión, aunque ésta es menor que la que presentan en

el sitio principal de unión del ATP lo que explica los resultados obtenidos en los estudios de unión de radioligandos donde ATP y CBV-TP desplazaban de forma parcial al [³H]A804598. Sin embargo, esto no explicaría porque en los estudios de unión de radioligandos ABC no fue capaz de desplazar al [³H]A804598, ya que los estudios de “docking” sugieren que ambos compiten por el mismo sitio de unión. Una posible explicación sería la mayor afinidad del radioligando por el sitio de unión, pero al ser una unión reversible altas concentraciones de ABC deberían ser capaces de desplazarlo. Por lo tanto, nos planteamos realizar estudios de docking donde el A804598 se encuentra unido en el cristal de forma previa a la adición de ABC. En este caso observamos como ABC es capaz de interaccionar en el sitio de unión del A804598 ocupando una zona adyacente a éste sin desplazarlo e interaccionando de forma distinta con una energía de unión mucho menor, lo que da una explicación al problema planteado previamente. Estos resultados junto con los obtenidos apuntan directamente a ABC como el responsable de la activación del receptor al sensibilizarlo a la acción del ATP y planteando por primera vez la modulación alostérica del receptor P2X₇ como el mecanismo de acción proinflamatoria de ABC (**Figura 65**).

Como hemos comentado anteriormente, se ha descrito un nuevo sitio de unión alostérica cercano al sitio de unión del ATP, capaz de modular la activación del receptor (Di Virgilio et al., 2018). Actualmente se conoce que el receptor P2X₇ presenta una gran variedad de compuestos que actúan de forma alostérica inhibiendo o sensibilizándolo a la acción del ATP (Coddou et al., 2011, Moura et al., 2015, Di Virgilio et al., 2018). Esto, junto con las altas concentraciones de ATP necesarias para activar al receptor llevó a plantearse si éste sería el único agonista del receptor, o si por el contrario durante situaciones patológicas existen otros factores que modulen la activación del receptor sensibilizándolo y disminuyendo su umbral de activación. Esto llevo al descubrimiento de distintos compuestos que actúan como moduladores positivos del receptor sensibilizándolo al ATP, desde otros nucleótidos como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Haag et al., 2007) a agonistas no nucleotídicos como la proteína β amiloide, proteoglicanos o distintos compuestos de síntesis que actúan potenciando el efecto del ATP sobre el receptor (Di virgilio et al., 2017, Moura et al., 2015)

DISCUSIÓN

Por tanto, con el fin de ampliar nuestra hipótesis nos planteamos si el ABC fuera un modulador alostérico capaz de sensibilizar al receptor P2X₇ a la acción del ATP realizando experimentos de potenciación sobre los parámetros evaluados que pudieran confirmar de manera funcional esta modulación alostérica. Mediante el empleo de concentraciones bajas de ABC, CBV-TP y ATP que de forma individual no producen un efecto evaluamos el efecto de las combinaciones de estos compuestos sobre la interacción leucocito-endotelio y sobre la expresión de Mac-1. Así, se observó como las combinaciones de ABC/ATP y ABC/CBV-TP de forma conjunta sí que producen un aumento en el rodamiento y la velocidad de rodamiento de PMN y PBMC y un aumento de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1, siendo estos efectos revertidos por el antagonista específico del receptor P2X₇ A804598. Estos resultados confirmarían modulación alostérica del receptor por ABC. Este a concentraciones bajas podría estar interaccionando en su sitio de unión, sensibilizando al receptor a la unión de ATP y permitiendo que concentraciones bajas de este nucleótido lo activen con la ayuda de ABC. La elección de concentraciones bajas de ambos compuestos se realizó en base a los resultados obtenidos anteriormente ya que concentraciones más altas de ATP podrían estar ocupando ambos sitios de unión e impidiendo que el ABC actúe, mientras que concentraciones más altas de ABC serían capaces de activar el sistema mediante el ATP endógeno.

La disminución de ATP intracelular detectada en PMN tras tratamiento con ABC también apunta a una liberación de ATP al medio extracelular. Sin embargo, los niveles de nucleótidos extracelulares no se vieron afectados, encontrándose niveles de ATP de entre 50-130 nM, de ADP entre 20-250 nM y AMP entre 10-600 nM. Estas concentraciones no llegan a reflejar de forma precisa la concentración real de ATP en las proximidades de la membrana plasmática. Diversos estudios sugieren que el ATP se puede liberar de distintos lugares de la célula acumulándose a concentraciones suficientes para activar el receptor P2X₇ de forma paracrina y/o autocrina (Joseph et al., 2003, Fabbro et al., 2004) lo que unido a su rápida degradación hace muy difícil su detección. Por ello, se estudió la posible implicación de los dos canales de ATP más importantes en inflamación, los canales Cx43 y panx-1. Ambos están asociados a procesos inflamatorios y la activación de receptores purinérgicos (Fortes et al., 2004,

Locovei et al., 2006). Por ello, mediante el pretratamiento con distintos antagonistas de estos canales se analizaron la interacción leucocito-endotelio y la expresión de Mac-1 tras tratamiento con ABC. Carbenexolona y Gap¹⁹, ambos bloqueantes de los canales de Cx43 presentes en leucocitos, revirtieron los efectos de ABC sugiriendo una posible liberación de ATP en PMN y PBMC tras la activación del receptor, el cual al estar sensibilizado por ABC puede ejercer su acción sobre el receptor.

Actualmente nuestro grupo se encuentra estudiando el efecto de ABC sobre la población plaquetaria, concretamente la interacción de las plaquetas con el endotelio y los leucocitos que corresponderían con pasos esenciales para el desarrollo de procesos trombóticos (Projahn et al., 2012, Gawaz et al., 2005). Recientemente hemos publicado que ABC no afecta directamente a la activación plaquetaria pero si induce la adhesión de plaquetas al endotelio mediante la interacción entre P-selectina e ICAM-1 endoteliales con GPIIb/IIIa y GPIb α plaquetarias (Álvarez et al., 2017). Mediante el modelo de Cloruro Férrico, uno de los más empleados hoy en día para la generación de procesos trombóticos englobando daño endotelial y activación plaquetaria mediante el empleo de concentraciones bajas a las que el FeCl₃ no es capaz de producir este daño, pero predispone al endotelio a la formación de procesos trombóticos mediante factores externos (Westrick et al., 1995). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren un efecto protrombótico “in vivo” de ABC en arteriolas de cremáster de ratón.

En conclusión, el mecanismo planteado para ABC en base a los resultados obtenidos en la presente tesis se basa en la modulación alostérica de ABC sobre el receptor de ATP P2X₇ localizado principalmente en leucocitos. ABC a concentraciones clínicamente relevantes puede activar el receptor, sensibilizándolo a la unión del ATP endógeno y favoreciendo su liberación a través de los canales de Cx43 presentes en leucocitos. Este ATP actuaría de forma autocrina/paracrina sobre el propio receptor amplificando el proceso. La activación del receptor P2X₇ da lugar a la sobreexpresión de la integrina β_2 Mac-1 que interactúa con ICAM-1 endotelial provocando la adhesión de los leucocitos al endotelio y dando lugar a uno de los primeros pasos en la generación de un proceso inflamatorio que junto con la adhesión de plaquetas al endotelio a través de P-selectina e ICAM-1 endoteliales con GPIIb/IIIa y GPIb α plaquetarias tras activación

DISCUSIÓN

del receptor P2X₇ endotelial (Álvarez et al., 2017) constituyen los primeros pasos para la formación de un proceso trombótico (**Figura 75**). Este mecanismo sería compatible con la toxicidad vascular descrita en clínica.

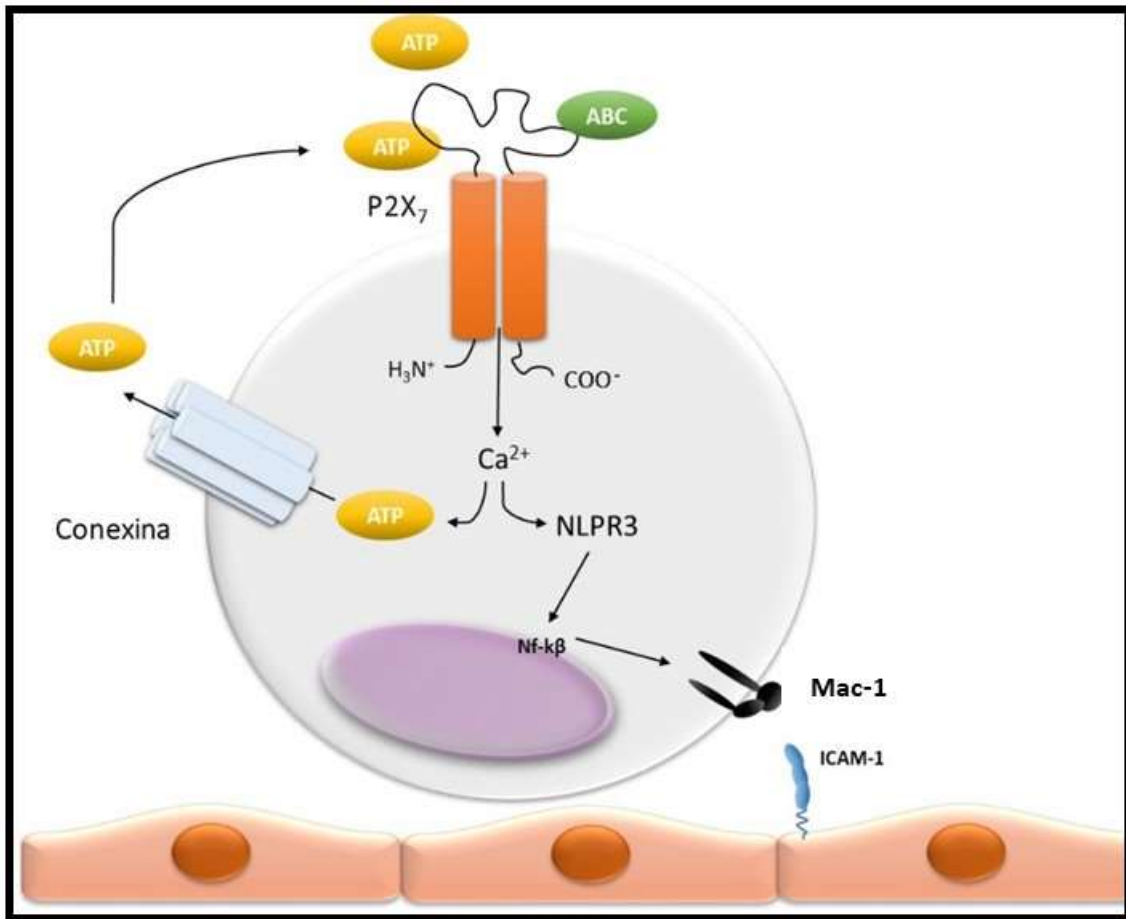


Figura 75. Mecanismo de acción propuesto de ABC. En la figura se observa como ABC actúa sensibilizando al receptor P2X₇ a la acción del ATP el cual puede ser liberado a través de los canales de conexina. Por otro lado, la activación del receptor P2X₇ lleva a la expresión de Mac-1 leucocitaria que interactúa con ICAM-1 endotelial dando lugar a la adhesión leucocitaria sobre el endotelio vascular.

VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. El efecto proinflamatorio de ABC medido como interacción leucocito-endotelio está mediado por los receptores P2X₇ localizados principalmente en los leucocitos (PMN y PBMC) y en menor medida en las células endoteliales. Además, el aumento de la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria (Mac-1) en neutrófilos y monocitos inducida por ABC se debe también a la activación del receptor P2X₇.
2. En estudios de unión al receptor P2X₇, ABC no desplaza al radioligando mientras que ATP y CBV-TP sí que lo hacen.
3. El ligando endógeno del receptor P2X₇ (ATP) y el metabolito activo de ABC (CBV-TP) reproducen los efectos de ABC tanto en la interacción leucocito-endotelio como sobre el aumento de la expresión de Mac-1. Los efectos de ATP no están mediados de forma específica por P2X₇, mientras que los de CBV-TP sí.
4. La metabolización de ABC a su metabolito activo CBV-TP es lenta, detectándose cantidades de CBV-TP inferiores a las necesarias para reproducir el efecto de ABC, lo cual lo descarta como responsable de la acción de este antirretroviral.
5. El tratamiento con ABC no modifica los niveles de nucleótidos extracelulares en los tipos celulares analizados (HUVEC, PMN y PBMC). ABC tampoco afecta a la velocidad de degradación del ATP ni a la expresión proteica o a la actividad enzimática de CD39 y CD73 (enzimas responsables de la degradación de este nucleótido).
6. El efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio es revertido por apirasa, apuntando al ATP como responsable de la acción de ABC. Además, ésta no afecta a los niveles de ABC y sí que es capaz de degradar rápidamente al ATP.
7. Estudios de “docking” en el receptor P2X₇ definen dos sitios de unión al receptor, uno para el ATP (sitio 1) y otro para el antagonista específico del P2X₇ A804598 (sitio 2). ATP y CBV-TP son capaces de unirse a ambos sitios de unión, teniendo

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

más afinidad por el sitio 1. ABC no tiene afinidad por el sitio de unión 1, mientras sí que interacciona formando un complejo estable con el sitio de unión 2, sugiriendo una posible modulación alostérica del receptor por parte de ABC.

8. El tratamiento con distintas combinaciones de ATP y ABC a concentraciones que por sí solas no produjeron un efecto sobre la interacción leucocito-endotelio ni sobre la expresión de Mac-1 sí que indujeron un incremento significativo de ambos parámetros. Además, estos aumentos se revierten con el pretratamiento con el antagonista del receptor P2X₇, confirmando la modulación alostérica del receptor por parte ABC al potenciar los efectos de ATP.
9. El efecto sobre la interacción leucocito-endotelio y sobreexpresión de Mac-1 inducido por ABC es revertido con el pretratamiento con bloqueantes de los transportadores de ATP. Estos resultados apuntan a los canales de conexina como los responsables de la liberación de ATP intracelular, el cual estaría actuando sobre los receptores P2X₇.
10. Los efectos de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio “in vitro” se reproducen “in vivo” en vénulas de cremáster de ratón. El receptor P2X₇ es el responsable de estos efectos ya que no se reproducen tras el pretratamiento con el antagonista específico del receptor P2X₇ ni en ratones KO para este receptor. Además, ABC redujo el tiempo de oclusión en arterias de cremáster de ratón en un modelo de trombosis.

1. The proinflammatory effects of ABC on leukocyte-endothelial interactions are mediated by P2X₇ mainly located in leukocytes (PMN or PBMC) and, to a lesser extent, in endothelial cells. Moreover, the overexpression of Mac-1 induced by ABC it is also due to P2X₇ involvement.
2. Studies assessing the binding of ABC to the P2X₇ receptor show that the drug does not inhibit the specific binding of the radioligand. In contrast, ATP and CBV-TP exhibit a partial activity towards inhibiting specific binding of the radioligand.
3. The endogenous ligand of P2X₇ (ATP) and the active metabolite of ABC (CBV-TP) reproduce the effects of ABC on leukocyte-endothelial cells and Mac-1 overexpression. The P2X₇ receptor mediates CBV-T's effects but does not influence ATP's effects in a specific manner.
4. ABC has a low metabolization to its active metabolite CBV-TP, with lower levels of CBV-TP than those being required to reproduce the effects of ABC. Thus, it can be ruled out as being responsible for the effect of ABC.
5. ABC treatment does not modify extracellular levels of nucleotides in any of the cell types analyzed (HUVEC, PMN and PBMC). ABC also does not modify the degradation of ATP, protein expression or enzymatic activity of CD39 and CD73 (enzymes that degrade this nucleotide).
6. The effect of ABC on leukocyte-endothelial interactions is reverted by apyrase, pointing to ATP as the main contributor to the actions of ABC. Moreover, apyrase does not modify the levels of ABC, whereas it degrades ATP rapidly.
7. Docking studies of the P2X₇ receptor define two sites of binding to the receptor: one for ATP (site 1) and the other for the specific antagonist of the P2X₇ receptor A804598 (site 2). ATP and CBV-TP are capable of binding to both binding sites, but with more affinity for site 1. ABC does not have affinity for site 1, whereas it is able

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

to interact with site 2, suggesting a possible allosteric modulation of the P2X₇ receptor by ABC.

8. Treatment with different combinations of ATP and ABC at concentrations that do not induce leukocyte-endothelial interactions and Mac-1 expression by themselves are able to induce a significant increment of both parameters when employed in combination. Moreover, this effect is reverted with pretreatment with the P2X₇ specific antagonist, thus supporting the concept of an allosteric modulation of ABC.
9. The leukocyte-endothelial interactions and Mac-1 overexpression induced by ABC are reverted by pretreatment with ATP channel blockers. This points to connexin channels as the main contributors to the release of ATP that interacts with P2X₇ receptors.
10. The effects of ABC on leukocyte-endothelial interactions are reproduced in an *in vivo* model. These effects are not reproduced by pretreatment with the specific antagonist of the P2X₇ receptor or in KO mice for this receptor, pointing to the P2X₇ receptor as the main contributor to the effects of ABC. Moreover, ABC reduces the time to occlusion of cremasteric arterioles in an “in vivo” model of thrombosis.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 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;163(2):349-54.
- Akanbi MO, Scarsi KK, Taiwo B, Murphy RL. Combination nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors for treatment of HIV infection. **Expert Opin Pharmacother**. 2012; 13(1): 65-79.
- Alon R, Feizi T, Yuen CT, Fuhlbrigge RC, Springer TA. Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. **J Immunol**. 1995; 154(10): 5356-66.
- Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. **Blood**. 2004; 104(2): 402-8.
- Alvarez A, Rios-Navarro C, Blanch-Ruiz MA, Collado-Diaz V, Andujar I, Martinez-Cuesta MA, Orden S, Esplugues JV. "Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis". **Antiviral Res**. 2017 May;141:179-18
- Alvarez A, Orden S, Andújar I, Collado-Diaz V, Núñez-Delgado S, Galindo MJ, Estrada V, Apostolova N, Esplugues JV. "Cardiovascular toxicity of abacavir: a clinical controversy in need of a pharmacological explanation". **AIDS**. 2017;31(13):1781-1795. Review.
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. **Genomics**. 2004; 83:706–716.
- Barbarino JM, Kroetz DL, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: abacavir pathway. **Pharmacogenet Genomics**. 2014;24: 276-282.
- 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; 20:220(4599):868-71.

BIBLIOGRAFÍA

- Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. **AIDS**. 2011;25(18):2243-8.
- Bedimo RJ, Westfall AO, Drechsler H, Vidiella G, Tebas P. Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular events in the highly active antiretroviral therapy era. **Clin Infect Dis**. 2011; 53(1): 84-91.
- Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak GR. ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. **Am. J. Physiol**. 1999; 276:C267.
- Blas-García A, Apostolova N, Ballesteros D, Monleón D, Morales JM, Rocha M, Victor VM, Esplugues JV. Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. **Hepatology**. 2010; 52(1): 115-25.
- 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;112(2):358-404.
- Bours MJ, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di VF. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. **Front Biosci**. 2011;3:1443-56.
- Brandely M, Lagrange PH, Hurtrel B. Effects of suramin on the in vivo antimicrobial resistance against *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. **Clin Exp Immunol**. 1986; 63(1):118-126.
- 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; 51(1): 20-8.
- Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. **Semin Hematol**. 1997; 34(4): 319-26.
- Browne LE, Jiang LH, North RA.L.E. North. New structure enlivens interest in P2X receptors. **Trends Pharmacol**. 2010; 31:229–237.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol**. 2004; 240:31–304.

- Burnstock G. Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease. **Purinergic Signal**. 2014;10:3–50.
- Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. **Circ Res**. 2017;120(1):207-228.
- Burnstock G, Knight G. The potential of P2X₇ receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. **Purinergic Signalling**. 2018; 14:1–18
- Cai YH, Alvarez A, Alcaide P, Duramad P, Lim YC, Jarolim P, Lowe JB, Luscinskas FW, Lichtman AH. Abrogation of functional selectin-ligand expression reduces migration of pathogenic CD8⁺ T cells into heart. **J Immunol**. 2006; 176(11): 6568-75.
- Cardoso TC, Pompeu TE, Silva CLM. The P2Y₁ receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin. **Purinergic Signal**. 2017;13(3):331-338.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**. 1994; 84(7): 2068-101.
- 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;353:2093-9.
- Carman CV, Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. **Curr Opin Cell Biol**. 2008; 20(5): 533-40.
- Castagna A, Maggiolo F, Penco G, Wright D, Mills A, Grossberg R, Molina JM, Chas J, Durant J, Moreno S, Doroana M, Ait-Khaled M, Huang J, Min S, Song I, Vavro C, Nichols G, Yeo JM; VIKING-3 Study Group. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. **J Infect Dis**. 2014; 210(3): 354-62.
- Chen P, Liu Z, Liu S, Xie Z, Aimiwu J, Pang J, Klisovic R, Blum W, Grever MR, Marcucci G, Chan KK. A LC-MS/MS method for the analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels. **Chen Pharm Res**. 2009;26(6):1504-15

BIBLIOGRAFÍA

- Coddou C, Stojilkovic SS, Huidobro-Toro JP. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. **Rev Neurosci**. 2011; 22: 335–354.
- 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;282(5):2871-9.
- Cutrell A, Brothers C, Yeo J, Hernandez J, Lapierre D. Abacavir and the potential risk of myocardial infarction. **Lancet**. 2008; 371(9622): 1413.
- De Béthune 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; 85(1): 75-90.
- 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;14:15-8.
- 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): 1259-66.
- De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Martí-Cabrera M, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment. **Antivir Ther**. 2012; 17(8): 1615-9.
- De Pablo C, Orden S, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues JV, Alvarez A. Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. **J Infect Dis**. 2013; 208(9): 1448-53.
- Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, *et al*. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. **FASEB J**. 2009; 23(6):1893-1906.
- Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobítg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of

protein and RNA sequences using structural information and homology extension.

Nucleic Acids Res. 2011;39(Web Server issue):W13-7.

- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood.** 2001; 97(3):587–600.
- Di Virgilio F, Giuliani AL, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Sarti AC. Non-nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation. *Front Pharmacol.* 2018;9:39.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, Vaidyanathan SX, Perez-Medrano A, YiWang Y, Carroll WA, Jarvis MF. [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. **Neuropharmacology.** 2009;223–229.
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Küper N, Karcher C, Weissmüller 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; 99:1100–8.
- Eltzschig HK, Macmanus CF, Colgan SP. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. **Trends Cardiovasc Med.** 2008; 18:103–7.
- Esplugues JV, De Pablo C, Collado-Díaz V, Hernández C, Orden S, Álvarez Á. “Interference with purinergic signalling: an explanation for the cardiovascular effect of abacavir?”. **AIDS.**;30(9):1341-51.
- Ezzell C. AIDS drug gets green light. **Nature.** 1987; 29:329(6142):751.
- Fabbro, A., Skorinkin, A., Grandolfo, M., Nistri, A., and Giniatullin, R. Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells. **J Physiol.** 2004;560:505–517.
- Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi KC, Eltzschig HK. ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. **PLoS One.** 2008; 3(7):8.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med.** 2003;349(21):1993-2003.
- Fortes FS, Pecora IL, Persechini PM, Hurtado S, Costa V, Coutinho-Silva R, Braga MB, Silva-Filho FC, Bisaggio RC, De Farias FP, Scemes E, De Carvalho AC, Goldenberg RC. Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J Cell Sci.* 2004;117:4717-26.
 - Furlan-Freguía C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. **J Clin Invest.** 2011;121:2932–2944.
 - Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annu Rev Immunol.** 2009; 27: 165-97.
 - Gallant JE, Koenig E, Andrade-Villanueva J, Chetchotisakd P, DeJesus E, Antunes F, Arastéh K, Moyle G, Rizzardini G, Fehr J, Liu Y, Zhong L, Callebaut C, Szwarcberg J, Rhee MS, Cheng AK. Cobicistat versus ritonavir as a pharmacoenhancer of atazanavir plus emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naive HIV type 1-infected patients: week 48 results. **J Infect Dis.** 2013; 208(1): 32-9.
 - Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. **J Clin Invest.** 2005; 115(12): 3378-84.
 - 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; 28:22(4):573-93.
 - 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.
 - Günthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, Gallant JE, Hoy JF, Mugavero MJ, Sax PE, Thompson MA, Gandhi RT, Landovitz RJ1, Smith DM, Jacobsen DM, Volberding PA. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. **JAMA.** 2016;316(2):191-210.

- Haag F, Adriouch S, Anette B, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. **Purinergic Signal**. 2007;3(1-2): 71–81.
- Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. **Antiviral Res**. 2010; 85(1): 201-9.
- Hechler B, Gachet C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2015;35(11):2307-15.
- Hickey MJ, Granger DN, Kubes P. Molecular mechanisms underlying IL-4-induced leukocyte recruitment in vivo: a critical role for the alpha 4 integrin. **J Immunol**. 1999; 163:3441–3448.
- 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;120(13):1255-65.
- 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; 373(6510): 123-6.
- Hughes EL, Gavins FN. Troubleshooting methods: using intravital microscopy in drug research. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 2010;61:102–112.
- 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; 297(6): C1588-95.
- Imamichi T. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. **Curr Pharm Des**. 2004; 10(32): 4039-53
- Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. **Nat Med**. 2011; 17(11): 1423-36.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Invest**. 1973; 52(11): 2745-56.

BIBLIOGRAFÍA

- Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. **Neuropharmacology**. 2009; 56(1):208–215.
- Joseph, S. M., Buchakjian, M. R., and Dubyak, G. R. (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. **J Biol Chem**. 2003;278:23331–23342.
- Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat Rev Immunol**. 2011; 11(3):201–212.
- Karasawa A, Kawate T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. **Elife**. 2016;9:5.
- Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR¹, Pearlman E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. **Nat Commun**. 2016;15:7:10555
- Khakh BS, North RA P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**. 2006; 442(7102):527–532.
- 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; 4(11): 1302-7.
- Klein. Surveillance data for myocardial infarction hospitalizations among HIV+ and HIV-northern Californians 1994-2006. 2007.
- Kunisaki KM, Janoff EN. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. **Lancet Infect Dis**. 2009;9(8):493-504.
- Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, Gilquin J, Partisani M, Simon A, Boccard 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; 170(14): 1228-38.
- Lewis W, Day BJ, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. **Nat Rev Drug Discov**. 2003;2(10):812-22.

- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**. 2007; 7(9): 678-89.
- Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. **Proc Natl. Acad. Sci**. 2006; 103:7655–7659.
- Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. **Immunol Rev**. 2007; 220:60–81.
- Maartens G, Celum C, Lewis SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**. 2014; 384(9939): 258-71.
- Martin A, Bloch M, Amin J, Baker D, Cooper DA, Emery S, Carr A. Simplification of antiretroviral therapy with tenofovir-emtricitabine or abacavir-Lamivudine: a randomized, 96-week trial. **Clin Infect Dis**. 2009; 49(10): 1591-1601.
- McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2010; 26: 363-96.
- Mirza RA, Turiansky GW. Enfuvirtide and cutaneous injection-site reactions. **J Drugs Dermatol**. 2012; 11(10): e35-8.
- Mocroft A, Ruiz L, Reiss P, Ledergerber B, Katlama C, Lazzarin A, Goebel FD, Phillips AN, Clotet B, Lundgren JD; EuroSIDA study group. Virological rebound after suppression on highly active antiretroviral therapy. **AIDS**. 2003; 17(12): 1741-51.
- 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;58(RR-11):1-166.
- Moura G, Lucena SV, Lima MA, Nascimento FD, Gesteira TF, Nader HB, Paredes-Gamero EJ, Tersariol I. Post-translational allosteric activation of the P2X7 receptor through glycosaminoglycan chains of CD44 proteoglycans. **Cell Death Discov**. 2015;1:15005.

BIBLIOGRAFÍA

- Moyle G, Boffito M, Fletcher C, Higgs C, Hay PE, Song IH. 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.
- 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; 65(6): 1094-9.
- Neelands TR, Burgard EC, Uchic ME, McDonald HA, Niforatos W, Faltynek CR, *et al.* 2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor. **Br J Pharmacol.** 2003; 140(1):202-210.
- 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;11:130-6.
- Orden S, de Pablo C, Rios-Navarro C, Martinez-Cuesta MA, Peris JE, Barrachina MD, Esplugues JV, Alvarez A. Efavirenz induces interactions between leucocytes and endothelium through the activation of Mac-1 and gp150,95. **J Antimicrob Chemother.** 2014; 69(4): 995-1004.
- 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; 338(13):853-60.
- Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida Executive summary of the GESIDA/National AIDS Plan Consensus Document on Antiretroviral Therapy in Adults Infected by the Human Immunodeficiency Virus (Updated January 2017). **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2017; 17;30131-3.
- 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; 6(3): 257-60.

- Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annu Rev Microbiol.** 1996; 50: 825-54.
- Pellicelli AM, Palmieri F, Cicalini S, Petrosillo N. Pathogenesis of HIV-related pulmonary hypertension. **Ann N Y Acad Sci.** 2001;946:82-94.
- Perry CM. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. **Drugs.** 2010; 70(9): 1189-213.
- Piliero PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2004; 1:37 Suppl 1:S2-S12.
- Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. **J Leukoc Biol.** 2012; 92(6): 1167-75.
- Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North, and A. Surprenant. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X7: cloning and expression of a human cDNA. **J. Biol. Chem.** 1997; 272:5482.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.** 2008; 22: 659-661.
- Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. **J Gen Virol.** 2002; 83:1253-65.
- Reust CE. Common adverse effects of antiretroviral therapy for HIV disease. **Am Fam Physician.** 2011; 83(12): 1443-51.
- Ribera E, Tuset M, Martín M, del Cacho E. Characteristics of antiretroviral drugs. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2011; 29(5): 362-91.
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. ADP-ribosylation of P2X7: a matter of life and death for regulatory T cells and natural killer T cells. **Curr Top Microbiol Immunol.** 2015;384:107-26.
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2010; 182:774–783.
- Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, Furlan-Freguia C, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Ruf W. Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. **J Clin Invest .** 2015;125:1471–1484.

BIBLIOGRAFÍA

- 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; 371(9622): 1417-26.
- Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, Hensley K, Garcia-Martinez LF, Simon SI, Staunton DE. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. **J Leukoc Biol**. 2007; 81(6): 1395-403.
- Sanz E. Abacavir-myocardial infarction. **WHO Signal**. 5 A.D. May 4-6-2005.
- Schilling, W. P., T. Wasylina, G. R. Dubyak, B. D. Humphreys, and W. G. Sinkins. Maitotoxin and P2Z/P2X7 purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. **Am. J. Physiol**. 1999; 277:C766.
- Schwiebert, E. M. ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. **Am. J. Physiol**. 1999; 276:C1.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. **J Biol Chem**. 2001; 276:125–132.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**. 1994; 76(2): 301-14.
- Strategies for Management of Anti-Retroviral Therapy/INSIGHT1; DAD Study Groups. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. **AIDS**. 2008; 12:22(14):17-24.
- Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. **J Clin Invest**. 2002; 110(7): 993–1002.
- Triant VA. HIV infection and coronary heart disease: an intersection of epidemics. **J Infect Dis**. 2012;205 Suppl 3:S355-S361.
- UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. 2013.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. **Nature**. 1994; 371: 516–519.

- van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004; 24(5): 824-33.
- Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. Emerging roles of connexin hemichannels in gastrointestinal and liver pathophysiology. **World J. Gastrointest. Pathophysiol.** 2010; 1:115–117.
- Wang H, Hong LJ, Huang JY, Jiang Q, Tao RR, Tan C, Lu NN, Wang CK, Ahmed M, Lu YM, Rong Liu Z, Shi W, Lai EY, Wilcox C, Han F. P2RX₇ sensitizes Mac-1/ICAM-1-dependent leukocyte-endothelial adhesion and promotes neurovascular injury during septic encephalopathy. **Cell Res.** Jun;25(6): 674–690.
- 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.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature.** 1995; 373(6510): 117-22.
- Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2007; 27: 2079-93.
- Wilson HL, Varcoe RW, Stokes L, Holland KL, Francis SE, Dower SK, Surprenant A, Crossman DC. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. **Br J Pharmacol.** 2007;51(1): 115–127.
- Worm SW, Sabin C, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, De Wit S, Law M, Monforte AD, Friis-Møller N, Kirk O, Fontas E, Weller I, Phillips A, Lundgren J. Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. **J Infect Dis.** 2010; 201(3): 318-30.
- Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim Biophys Acta.** 2008;1783(5):673-94.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang G, Walker AD, Lin Z, Han X, Blatnik M, Steenwyk RC, Groeber EA. Strategies for quantitation of endogenous adenine nucleotides in human plasma using novel ion-pair hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**. 2014;1325:129-36.
- 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;149:1887-98.

VIII. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Ríos-Navarro C, de Pablo C, Collado-Díaz V, Orden S, Blas-García A, Martínez-Cuesta MÁ, Esplugues JV, Álvarez A. “Differential effects of anti-TNF- α and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions”. **Eur J Pharmacol.** 2015;(15)765:355-65.
- Esplugues JV, De Pablo C, Collado-Díaz V, Hernández C, Orden S, Álvarez Á. “Interference with purinergic signalling: an explanation for the cardiovascular effect of abacavir?”. **AIDS** 2016 Jun 1;30(9):1341-51.
- Álvarez A, Ríos-Navarro C, Blanch-Ruiz MA, Collado-Díaz V, Andujar I, Martínez-Cuesta MA, Orden S, Esplugues JV. “Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis”. **Antiviral Res.** 2017 May;141:179-185.
- Álvarez A, Orden S, Andújar I, Collado-Díaz V, Núñez-Delgado S, Galindo MJ, Estrada V, Apostolova N, Esplugues JV. “Cardiovascular toxicity of abacavir: a clinical controversy in need of a pharmacological explanation”. **AIDS.** 2017 Aug 24;31(13):1781-1795. Review.
- Collado-Díaz V, Andujar I, Sanchez-Lopez A, Orden S, Blanch-Ruiz MA, Martínez-Cuesta MA, Blas-García A, Esplugues JV, Álvarez Á. “Abacavir induces arterial thrombosis in a murine model”. **J Infect Dis.** 2018 Jan 16. [Epub ahead of print]
- Collado-Díaz V, Sanchez-Lopez A, Martínez-Cuesta MA, Esplugues JV, Álvarez A. “Abacavir increase leukocyte purinergic P2X₇ receptor activation by ATP: a pro-inflammatory step to cardiovascular toxicity”. **British Journal of Pharmacology.** 2018. (En revisión).

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA

- García-Martínez P, Collado-Díaz V, Villarroel-Vicente C, Rovira-Llopis S, Blas García A, Álvarez A, Esplugues JV, Andújar I. “Differential protective effects of Biologics and methotrexate on vascular inflammation and risk of thrombosis in a murine model of psoriasis”. **The Journal of Experimental Medicine**. 2018 (En revisión).
- Orden S, Sanchez-Lopez A, Blanch-Ruiz M, Collado-Díaz V, Martínez-Cuesta MA, Esplugues JV, Álvarez A. “Proinflammatory and prothrombotic actions of different antiretrovirals in comparison with abacavir”. **AIDS**. 2018 (En revision).
- Blanch-Ruiz MA, Sanchez-Lopez A, Orden S, Ríos-Navarro C, Collado-Díaz V, Martínez-Cuesta MA, Esplugues JV and Álvarez A. “Abacavir stimulates the release of a substance by neutrophils that activates platelets. **J Infect Dis**. 2018 (En revisión).

IX. CERTIFICADOS

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00083

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

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

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

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

AUTORIZO:

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

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Angeles Alvarez Ribelles**

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

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



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



Hospital Clínic Universitari



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

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

CERTIFICA

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

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

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

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

Valencia, 26 de noviembre de 2015.

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

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

CERTIFICA:

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

INFORME FAVORABLE

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

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



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



HARVARD
MEDICAL SCHOOL

DIVISION OF Immunology
DEPARTMENT OF Microbiology & Immunobiology

Ulrich H. von Andrian, M.D.
Mallinckrodt Professor of Immunopathology
Harvard Medical School
77 Avenue Louis Pasteur, NRB, Room 836
Boston, Massachusetts 02115
Tel (617) 432-6828
Fax (617) 432-6829

January 20, 2017

To Whom It May Concern:

I confirm that Víctor Collado Díaz will be working in my lab in the Department of Microbiology and Immunobiology at Harvard Medical School as an intern starting in the summer of 2017 for a five month period. This internship was offered to Mr. Díaz with the understanding that Harvard Medical School will not provide any financial support or reward.

If you have any questions, please feel free to let me know.

Sincerely,

Ulrich H. von Andrian, M.D.
Mallinckrodt Professor of Immunopathology
Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School