

La tesi que aquí es presenta ha investigat els mecanismes d'entrada a les cèl·lules dels Inhibidors de la Transcriptasa Inversa Anàlegs a Nucleòsid (NRTIs, de l'anglès *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*) usats en teràpia contra el VIH, focalitzant els estudis en l'expressió i l'activitat dels transportadors d'antivirals en cèl·lules del sistema immunitari. Primerament, es van analitzar els mecanismes d'entrada de l'azidotimidina (AZT) en limfòcits T. Vam demostrar que els transportadors de nucleòsid humans (hNTs, de l'anglès *human Nucleoside Transporters*; famílies gèniques *SLC28* i *SLC29*) juguen un paper negligible en l'entrada del fàrmac. A més, els transportadors d'anions orgànics (hOATs, de l'anglès *human Organic Anion Transporters*; família gènica *SLC22*) no es van detectar ni a nivell d'ARNm ni funcionalment. L'AZT mostrà una ruta d'entrada depenent de temperatura i va ser up-regulat per fitohemaglutinina (PHA), fet que suporta la idea de què el seu mecanisme de transport és, al menys en part, mediat i pot ser regulat. Després d'això, vam estudiar l'expressió i activitat de transportadors d'entrada de fàrmacs antivirals de les famílies gèniques *SLC28*, *SLC29* i *SLC22* en cèl·lules del sistema immunitari. Quant als hNTs, tant els hENTs com hCNT2 van mostrar una abundant expressió en limfòcits. Els pròpils hENTs, hCNT2 i diferencialment hCNT3, van mostrar una notable expressió en cèl·lules del llinatge monòcit-macròfag amb una activitat preferent associada a hENT1 en limfòcits i a hCNT3 i hENT1 en macròfags. Tots aquests transportadors van patir una notable up-regulació a nivell d'ARNm en presència de PHA. En cèl·lules del sistema immunitari els transportadors de cations orgànics (hOCTs; de l'anglès *human Organic Cation Transporters*; família gènica *SLC22*) van mostrar un perfil d'expressió més heterogènia i una activitat menor als hNTs. No obstant, l'up-regulació va ser notable després de l'activació cel·lular. Com a aproximació preliminar de l'efecte directe de la infecció del VIH-1 sobre l'expressió de transportadors, vam explorar els canvis en els nivells d'ARNm d'hNTs en limfòcits primaris i la línia limfoblàstica MT4. A més a més, es va estudiar la implicació de les vies de rescat (salvage) de nucleòsids i el possible paper antiviral del dipiridamol (DIP) en aquestes cèl·lules. La infecció per VIH-1 *in vitro* només va afectar l'expressió d'ARNm de hCNT2 essent down-regulat més de 9 vegades en cèl·lules MT4. El DIP va mostrar un bon efecte antiviral, disminuint dràsticament el percentatge de cèl·lules infectades en MT4 a dies 2 i 3 post-infecció i els nivells d'antigen p24 fins a dia 9 post-infecció en PBMCs. Finalment, centrant-nos en els hOCTs, es van estudiar les interaccions i la especificitat de substrat de hOCT1, 2 i 3 amb tots els NRTIs usats avui dia en teràpia combinada de gran activitat (HAART, de l'anglès *Highly Active Antiretroviral Therapy*). Tots els NRTIs van interaccionar amb alta afinitat amb els hOCTs i podrien ser moduladors de la funció fisiològica de hOCTs *in vivo*. La lamivudina (3TC) va mostrar dos llocs d'interacció amb hOCTs: un d'alta afinitat (rang pM) i un de baixa afinitat (rang mM) i es va determinar aquest fàrmac com a nou substrat d'hOCTs, essent hOCT1 el transportador més eficient. Per últim, vam determinar com abacavir (ABC) i AZT, fàrmacs freqüentment co-administrats amb 3TC, inhibien el transport de 3TC a través de hOCTs a baixes concentracions, el que podria tenir conseqüències per la farmacocinètica de 3TC.

En conclusió, al llarg d'aquesta investigació s'ha descobert que els NRTIs no semblen tenir una entrada comú, contràriament al que es pensava en un inici. S'ha demostrat que algunes proteïnes de les famílies gèniques *SLC28*, *SLC29* i *SLC22* estan altament expressades i participen de la captació de NRTIs en cèl·lules del sistema immunitari. La regulació de l'expressió i l'activitat dels transportadors d'entrada de fàrmacs antivirals obre una nova via terapèutica en relació a la possible modulació de la seva farmacodinàmica i farmacocinètica i en l'estudi de la interacció fàrmac-fàrmac i la toxicitat farmacològica.

The present thesis has addressed the question of which mechanisms take part in the entry of the Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) used in HIV therapy, focusing our studies on the expression and activity of antiviral drug transporters in immune cells. Firstly, the uptake mechanisms of azidothymidine (AZT) were analysed in T lymphocytes. We found out that human Nucleoside Transporters (hNTs, *SLC28* and *SLC29* gene families) play a negligible role in AZT uptake. Moreover, human Organic Anion Transporters (from *SLC22* gene family), were not detected in T cells neither functionally nor at the mRNA level. AZT, with a higher lipophilic character than the rest of NRTIs, showed a temperature-dependent route of entry and was up-regulated by phytohemagglutinin (PHA), what supports the idea of a mediated and regulated transport mechanism, at least in part. Following that, we attempted to address the lack of information regarding the expression and activity of drug uptake transporters from *SLC28*, *SLC29* and *SLC22* gene families in immune cells. Regarding hNTs, both hENTs and hCNT2 were abundant in lymphocytes and the same transporters and hCNT3 were expressed in monocyte/macrophage lineage cells with preferential activity for hENT1 in T cells and hCNT3 and hENT1 in macrophages. All these proteins were highly up-regulated by PHA. In immune cells human Organic Cation Transporters (hOCTs, *SLC22* gene family) showed a more heterogeneous expression profile and a lower activity than hNTs, although up-regulation also occurred upon lymphocyte activation. As a preliminary approach to the direct effect of HIV-1 infection on the expression of transporters, we also explored the changes in mRNA levels of hNTs in infected primary lymphocytes and MT4. Moreover, the implication of nucleoside salvage and the possible antiviral effects of dipyridamole (DIP) was also analysed in these cells. HIV-1 infection *in vitro* only affected hCNT2 mRNA expression, down-regulating it > 9-fold in MT4 cells whereas in PBMCs or CD4+ T cells any hNT mRNA was affected. DIP showed a good antiviral effect, strikingly decreasing the percentage of infected cells in MT4 at days 2 and 3 post-infection and the p24 antigen levels at up to day 9 post-infection in PBMCs. Furthermore, focusing on hOCTs, we studied the interactions and transportability of all NRTIs currently used in Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) with OCT1, 2 and 3. All NRTIs interacted with hOCTs with a high affinity and could be modulators of physiological function of hOCTs *in vivo*. Lamivudine (3TC) showed two binding sites with hOCTs: a high-affinity one (in the pM range) and a low-affinity one (in the mM range) and is a novel substrate for hOCTs, with hOCT1 being the most efficient transporter. Finally, we found that abacavir (ABC) and AZT, drugs frequently coadministered with 3TC, inhibit the transport of 3TC through hOCTs at low concentrations, which could lead to consequences for 3TC pharmacokinetics.

To conclude, throughout the course of the investigation, we discovered that NRTIs do not seem to have a common entry pathway, contrary to what it was initially thought. Importantly, we demonstrated that some protein members of the *SLC28*, *SLC29* and *SLC22* gene families are highly expressed and do participate in NRTI uptake in immune cells. The regulation of the expression and activity of antiviral drug uptake transporters opens a new therapeutic approach in relation to the possible modulation of pharmacodynamics/kinetics of antiretroviral drugs, drug-drug interactions and drug toxicity.