

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: **GONZÁLEZ MORENA, JUAN MANUEL**

D.N.I./PASAPORTE: \*\*\*\*4055F

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D425-SEÑALIZACIÓN CELULAR**

DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **BIOLOGÍA DE SISTEMAS**

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 4/05/18, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **DOLORES PÉREZ-SALA // FRANCISCO J. SÁNCHEZ GÓMEZ**.

Sobre el siguiente tema: *ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): sobresaliente

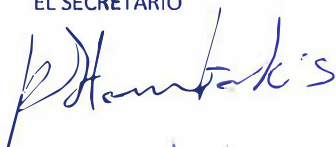
Alcalá de Henares, ..... 4 ..... de Mayo ..... de 2018

EL PRESIDENTE



Fdo.: ..... Federico Grego Badenas

EL SECRETARIO



Fdo.: ..... Konstantinos Stamatakis

EL VOCAL



Fdo.: ..... M. Isabel Mantuarez Vega

Con fecha 4 de junio de 2018 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: ..... Juan M. Gonzalez-Morena

La Secretaria de la Comisión Delegada



<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 11 de junio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *GONZÁLEZ MORENA, JUAN MANUEL*, el día 4 de mayo de 2018, titulada *ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

***MENCIÓN "CUM LAUDE"***



Alcalá de Henares, 12 de junio de 2018  
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA

F. Javier de la Mata de la Mata

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: GONZÁLEZ MORENA, JUAN MANUEL

Secretario del Tribunal: KONSTANTINOS STAMATAKIS ADRIANI

Director/a de Tesis: DOLORES PÉREZ-SALA // FRANCISCO J. SÁNCHEZ GÓMEZ



Universidad  
de Alcalá

**Programa de Doctorado en  
Señalización Celular**

**Estudio de la hapténización de  
proteínas por antibióticos  
betalactámicos**

**Tesis Doctoral presentada por**

**Juan Manuel González Morena**

**2018**









Universidad  
de Alcalá

Programa de Doctorado en  
Señalización Celular

# Estudio de la haptениzación de proteínas por antibióticos betalactámicos

Tesis Doctoral presentada por

**Juan Manuel González Morena**

**Directores:**

**Dra. María Dolores Pérez-Sala Gozalo**

**Dr. Francisco Javier Sánchez Gómez**

Alcalá de Henares, 2018

---







Doña MARÍA DOLORES PÉREZ-SALAGOZALO, Doctora en Medicina y Cirugía, Investigadora Científica del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C de Madrid,

INFORMA:

Que el trabajo que presenta JUAN MANUEL GONZÁLEZ MORENA, con el título "Estudio de la haptización de proteínas por antibióticos betalactámicos" ha sido realizado en el Laboratorio de Modificación Postraducciona de Proteínas (Departamento de Biología Estructural y Química), del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC de Madrid bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser presentado como memoria de Tesis Doctoral en el programa de doctorado de Señalización Celular de la Universidad de Alcalá de Henares para la obtención del título de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente informe en Madrid a 30 de Enero de 2018.

Fdo: M<sup>ª</sup> Dolores Pérez-Sala Gozalo

Investigadora Científica, CSIC





D. Francisco Javier Sánchez Gómez, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular,  
investigador postdoctoral del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC:

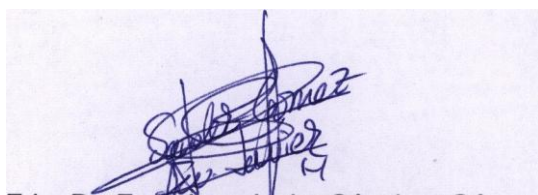
CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. Juan Manuel González Morena, titulado:

"Estudio de la haptización de proteínas por antibióticos betalactámicos",

adscrito al Programa de Doctorado "Señalización Celular" del Departamento de  
Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá de Henares; ha sido realizado en el Centro de  
Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. de Madrid bajo mi dirección. Dicho trabajo reúne los  
requisitos de contenido, originalidad y rigor científicos necesarios para ser defendido ante el  
tribunal nombrado por la Universidad de Alcalá de Henares con el fin de optar al grado de  
Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Madrid a 24 de Enero de 2018.



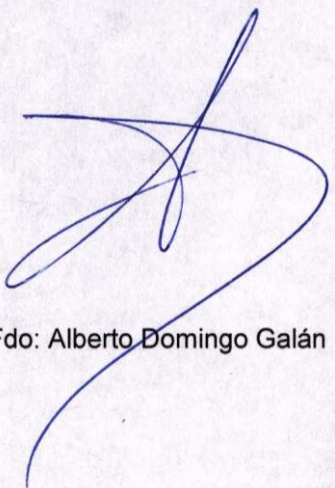
Fdo. Dr. Francisco Javier Sánchez Gómez



Alberto Domingo Galán,  
Coordinador de la Comisión Académica del  
Programa de Doctorado en Señalización Celular

**INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS”, presentada por D. Juan Manuel González Morena bajo la dirección de los Dres. María Dolores Pérez-Sala Gozalo y Francisco J. Sánchez Gómez, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares, a 9 de febrero de 2018



Fdo: Alberto Domingo Galán



Los resultados obtenidos de este trabajo han dado lugar a los siguientes artículos científicos y comunicaciones en congresos:

-Artículos científicos

Sánchez-Gómez FJ, **González-Morena JM**, Vida Y, Pérez-Inestrosa E, Blanca M., Torres MJ & Pérez-Sala D. Amoxicillin haptens intracellular proteins that can be transported in exosomes to target cells. *Allergy*. (2017) 72: 385-396.

**González-Morena JM**, Montañez M I, Aldini G, Sánchez-Gómez FJ & Pérez-Sala D. Adduct Formation and Context Factors in Drug Hypersensitivity: Insight from Proteomic Studies. *Current pharmaceutical design*. (2016) 22: 6748-6758.

-Comunicaciones en congresos

**González-Morena JM**, Pérez-Sala D, Vida Y, Pérez-Inestrosa E & Sánchez-Gómez FJ. Identification and fate of intracellular proteins haptened by amoxicillin. 6th Congress of the Spanish Proteomics Society. 15/11/2016 - 18/11/2016.

Sánchez-Gómez FJ, **González-Morena JM**, Vida Y, Pérez-Inestrosa E, Blanca M, Torres MJ, Pérez-Sala D. Identification And Fate Of Intracellular Proteins Haptened By Amoxicillin. 7th Drug Hypersensitivity Meeting. 21/4/2016 - 23/4/2016.

**González-Morena JM**, Pérez-Sala D, Vida Y, Pérez-Inestrosa E & Sánchez-Gómez FJ. Covalent Modification of Intracellular Proteins by Amoxicillin and its Biotinylated Analogue. III Biennial Meeting Of The Chemical Biology Group / XII Carbohydrate Symposium. 14/3/2016 - 14/3/2016.





# Agradecimientos



*Esta tesis doctoral se ha podido realizar gracias a la financiación de los proyectos SAF2012-36519 y SAF2015-68590R del MINECO, España y del RIRAAF/RD12/0013/0008 del Instituto de Salud Carlos III.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Dolores Pérez-Sala y el Dr. Francisco Javier Sánchez Gómez, por el tiempo y la dedicación que habéis depositado durante todo este tiempo en este trabajo. Gracias por haberme enseñado todo lo que hoy sé y por haberme dado la oportunidad de hacer ciencia.*

*Al Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa por su importante aportación en este trabajo al sintetizar las herramientas moleculares necesarias para llevar a cabo gran parte de los experimentos detallados en esta tesis doctoral.*

*Al profesor Giancarlo Aldini y su laboratorio, por su relevante aportación mediante técnicas de espectrometría de masas de alta sensibilidad en este trabajo.*

*Al Dr. Francisco Javier Cañada Vicinay por su ayuda, comentarios y observaciones en todo lo referente al modelado molecular.*

*Al personal de los servicios de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas y de la Universidad Complutense de Madrid por su labor en la identificación de las proteínas haptinizadas. Quisiera agradecer también al personal del servicio de Microscopía Confocal de Fluorescencia y al de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas por su ayuda en la obtención de las imágenes y al personal del Servicio de Cultivos Celulares por toda su ayuda.*

*A mis compañeros de laboratorio, Álvaro, Alma, Andreia, Sofia, Elena, María y a todos los que han ido pasando por allí. Gracias por todos los buenos ratos y todas las risas vividas durante este tiempo. Gracias Mariaje por todas esas conversaciones y los buenos momentos que hemos tenido, muchas gracias por toda la ayuda que siempre me has ofrecido en el laboratorio. También quisiera dar las gracias a todas las personas que he tenido la ocasión de conocer en el CIB.*

*A la página web somersault 18:24 por su fantástico repositorio de imágenes científicas, algunas de ellas usadas en los esquemas de este trabajo.*

*A todos mis amigos de la Universidad de Alcalá de Henares. En especial a mis camaradas Daniel y Sergio, gracias por todos los grandes momentos vividos durante todos estos años, que no han sido pocos, todas las fiestas, risas y todo lo que nos queda.*

*Quisiera también dar las gracias a toda la gente del máster de dianas terapéuticas. Especialmente a Álvaro, Raquel, Maca, Javier, David y Carmen, habéis sido y seguís siendo como una pequeña gran familia para mí. Gracias, gracias y mil veces gracias, por la cantidad de buenos recuerdos, momentos geniales e infinidad de risas que he tenido la oportunidad de haber vivido junto a vosotros y que espero seguir teniendo. Siempre tendréis un hueco en mi corazón, sois lo mejor.*

*A mis amigos de casi toda la vida Rubén, Paco y Tomás por todos vuestros consejos y ánimos durante todo este tiempo.*

*Finalmente, quisiera agradecer a las personas más importantes en mi vida, mi familia, sin las cuales esta tesis no se podría haber realizado. Gracias a mis padres, a mi hermana, a mis tíos y a mis abuelos por todo el apoyo y por todo vuestro cariño. Esta tesis es en buena parte vuestra.*

*A mis padres*

*A mi hermana*



# Resumen





Las modificaciones postraduccionales de proteínas constituyen un mecanismo de especial relevancia en numerosas funciones celulares y en situaciones patológicas, incluyendo las reacciones adversas a fármacos, y en particular en las alergias medicamentosas. Los fármacos que más frecuentemente inducen reacciones alérgicas son los antibióticos betalactámicos, especialmente la amoxicilina, recetada principalmente para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio. El mecanismo por el cual estos compuestos desencadenan la respuesta alérgica no se conoce. Se considera que estas moléculas son demasiado pequeñas para producir la respuesta inmune, por lo que deberían unirse con proteínas propias del paciente para iniciarla. La modificación covalente de proteínas por fármacos se denomina haptización. Las proteínas haptizadas podrían ser degradadas intracelularmente por vía proteasomal o lisosomal, y los péptidos generados, expuestos en la superficie de células presentadoras de antígeno para su reconocimiento por células efectoras. Además, las proteínas podrían ser secretadas en estructuras microvesiculares, que a su vez fueran reconocidas o captadas por las células efectoras. El interés del estudio del proceso de haptización y del procesamiento de las proteínas haptizadas no se limita a los antibióticos betalactámicos puesto que numerosos fármacos o sus metabolitos pueden modificar covalentemente proteínas. Los antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno, los antivirales, como el abacavir, o los antineoplásicos, como el clorambucil, pueden modificar covalentemente proteínas. En este trabajo se han identificado y caracterizado nuevas dianas de haptización por antibióticos betalactámicos mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Además, se han explorado las vías implicadas en el procesamiento de estas proteínas. Los hallazgos de este trabajo establecen que los exosomas transportan proteínas haptizadas a otras células y que la  $\alpha$ -enolasa es una de las principales dianas de haptización de amoxicilina. Este estudio contribuirá a una mejor comprensión del proceso de haptización por fármacos y su papel en las respuestas alérgicas. Las estructuras identificadas podrían resultar de utilidad en el diseño de nuevos procedimientos diagnósticos o de abordajes preventivos o terapéuticos.



# Abreviaturas



<b>2-PGA</b>	2-fosfoglicerato
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AX</b>	Amoxicilina
<b>AX-B</b>	Amoxicilina biotinilada
<b>BAEC</b>	Células endoteliales de aorta bovina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BSA-B</b>	Albúmina de suero bovino biotinilada
<b>CD</b>	Cúmulo de diferenciación
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión
<b>CLQ</b>	Cloroquina
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol diclorohidrato
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia mejorada
<b>EDTA</b>	Ácido disodio etilenodiaminotetraacético

<b>EF-2</b>	Factor de elongación 2
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>Estrep-HRP</b>	Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano
<b>Estrep-TXR</b>	Estreptavidina acoplada a "Texas Red"
<b>EV</b>	Vesículas extracelulares
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GDI</b>	Inhibidor de disociación del nucleótido de guanina
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>GSTP1-1</b>	Glutación-S-transferasa P1-1
<b>HCD</b>	Disociación por colisión de alta energía
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HNE</b>	4-Hidroxi-2-nonenal
<b>HSA</b>	Albúmina de suero humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico de 70 kilodalton
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina

<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAMP-1</b>	Proteína de membrana asociada a lisosoma 1
<b>LC</b>	Cromatografía líquida
<b>LFA</b>	Antígeno asociado con la función leucocitaria
<b>LTQ</b>	Cuadrupolo con trampa lineal
<b>LTR</b>	“LysoTracker Red”
<b><i>m/z</i></b>	Cociente de masa/carga
<b>MALDI</b>	Ionización/desorción mediante láser asistida por matriz
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PEPT</b>	Transportador de péptidos
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico

<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>S100</b>	Fracción de proteína soluble
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SNA</b>	Sulfo-NHS-acetato
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>T-TBS</b>	Tampón Tris salino con Tween-20
<b>ZLLL</b>	N-benziloxycarbonil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal



# Índice



Abreviaturas .....	25
Índice.....	31
I. Introducción.....	39
<b>1. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>41</b>
<b>1.1. Tipos de modificaciones .....</b>	<b>41</b>
1.1.1. Modificaciones postraduccionales enzimáticas .....	41
1.1.2. Modificaciones postraduccionales no enzimáticas .....	42
<b>1.2. Importancia de las modificaciones postraduccionales en fisiopatología.....</b>	<b>44</b>
1.2.1. Implicación de modificaciones enzimáticas en patología.....	45
1.2.2. Implicación de modificaciones no enzimáticas en patología.....	45
<b>2. REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Definición.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2. Tipos de reacciones adversas .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3. Reacciones alérgicas.....</b>	<b>48</b>
2.3.1. Antibióticos betalactámicos .....	49
<b>3. HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Haptениización de proteínas extracelulares por betalactámicos ..</b>	<b>52</b>
<b>3.2. Haptениización de proteínas extracelulares por otros fármacos ..</b>	<b>55</b>
<b>3.3. Haptениización de proteínas intracelulares por fármacos.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4. Procesamiento intracelular de las proteínas haptениizadas .....</b>	<b>57</b>
<b>4. COMUNICACIÓN INTERCELULAR .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Sinapsis inmunológica .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2. Papel de los exosomas en la respuesta inmune .....</b>	<b>61</b>
4.2.1. Biogénesis de los exosomas .....	61
4.2.2. Estructura y constituyentes de los exosomas.....	63
4.2.3. Exosomas como mediadores de la respuesta inmunitaria.....	64
4.2.4. Implicación de los exosomas en alergia .....	66
II. Justificación e hipótesis.....	69
III. Objetivos .....	73
IV. Material y Métodos.....	77
<b>1. MATERIAL .....</b>	<b>79</b>
<b>1.1. Medios y material para cultivos .....</b>	<b>79</b>

1.2. Reactivos para electroforesis .....	79
1.3. Anticuerpos .....	79
1.3.1. Anticuerpos para Western blot.....	79
1.3.2. Anticuerpos y reactivos para inmunofluorescencia.....	80
1.4. Otros reactivos .....	80
2. MÉTODOS .....	81
2.1. Modificación de $\alpha$ -enolasa recombinante <i>in vitro</i> .....	81
2.1.1. Haptenización de $\alpha$ -enolasa por betalactámicos <i>in vitro</i> .....	81
2.1.2. Acetilación de $\alpha$ -enolasa <i>in vitro</i> .....	81
2.2. Ensayos de la actividad enzimática.....	82
2.3. Cultivos celulares.....	83
2.4. Tratamientos celulares .....	84
2.5. Obtención de lisados celulares .....	84
2.6. Fraccionamiento del medio condicionado.....	84
2.7. Electroforesis en SDS-PAGE y Western blot.....	85
2.8. Electroforesis bidimensional .....	86
2.9. Espectrometría de masas .....	88
2.9.1. Análisis de $\alpha$ -enolasa modificada por amoxicilina <i>in vitro</i> mediante MALDI-TOF .....	89
2.9.2. Análisis de $\alpha$ -enolasa modificada por amoxicilina <i>in vitro</i> mediante ESI-MS .....	89
2.9.3. Identificación de residuos de $\alpha$ -enolasa modificados <i>in vitro</i> por amoxicilina mediante LC-ESI-MS/MS.....	90
2.10. Modelado molecular.....	91
2.11. Inmunoprecipitación .....	92
2.12. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad basada en avidina.....	92
2.13. Microscopía confocal.....	93
2.13.1. Detección de AX-B en el interior de varios tipos celulares .....	93
2.13.2. Internalización de vesículas extracelulares con AX-B en células BAEC.....	94
2.13.3. Estudio de diferentes vías de tráfico intracelular .....	94
2.14. Microscopía electrónica .....	95
2.15. Análisis estadístico .....	95

V. Resultados .....	97
1. HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS RPMI 8866 .....	99
1.1. Selectividad de la unión de betalactámicos a proteínas intracelulares .....	99
1.2. Detección de proteínas haptenizadas en linfocitos B .....	101
1.3. Identificación de proteínas haptenizadas por amoxicilina en la fracción de proteínas solubles del medio condicionado .....	102
1.3.1. Confirmación por inmunodetección de las proteínas identificadas .....	105
1.3.2. Confirmación por cromatografía de afinidad en avidina de las proteínas identificadas .....	107
1.3.3. Confirmación por inmunoprecipitación de las proteínas identificadas .....	108
1.4. Identificación de proteínas haptenizadas por AX-B en la fracción de lisado celular .....	109
1.4.1. Confirmación de las proteínas identificadas mediante inmunodetección .....	111
1.5. Estudio de la secreción activa de proteínas modificadas por AX-B por linfocitos B .....	112
1.5.1. Análisis y regulación de la secreción de vesículas extracelulares por linfocitos B .....	114
1.5.2. Detección e identificación de proteínas haptenizadas por AX-B en exosomas de linfocitos B .....	115
1.5.3. Análisis de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica .....	118
1.5.4. Análisis de las diferencias de haptenización entre las proteínas de exosomas <i>in vitro</i> y en células .....	119
1.5.5. Transporte de proteínas haptenizadas en vesículas extracelulares a células diana .....	120
2. ANÁLISIS DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR OTROS FÁRMACOS Y EN OTROS TIPOS CELULARES .....	122
2.1. Haptenización de proteínas de linfocitos B por penicilina .....	122
2.2. Haptenización de proteínas de células MCF-7 por amoxicilina .	124
2.3. Haptenización de proteínas de células RAW 264.7 por amoxicilina .....	126

<b>3. ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO CELULAR DE PROTEÍNAS HAPTENIZADAS POR AMOXICILINA</b> .....	129
<b>3.1. Degradación por vía lisosomal de las proteínas haptенizadas en linfocitos B</b> .....	129
<b>3.2. Degradación por vía proteasomal de las proteínas haptенizadas en linfocitos B</b> .....	131
<b>3.3. Degradación por vía lisosomal y proteasomal de las proteínas haptенizadas en macrófagos murinos</b> .....	133
<b>4. ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE <math>\alpha</math>-ENOLASA POR AMOXICILINA</b> .....	137
<b>4.1. Haptенización de <math>\alpha</math>-enolasa por amoxicilina <i>in vitro</i></b> .....	137
<b>4.2. Efecto de cofactores y sustratos de la <math>\alpha</math>-enolasa en la modificación por amoxicilina</b> .....	139
<b>4.3. Efecto de la AX o AX-B sobre la actividad enzimática de la <math>\alpha</math>-enolasa</b> .....	141
<b>4.4. Relación entre la integridad de la proteína y la modificación por amoxicilina</b> .....	142
<b>4.5. Estudio de la incorporación de AX-B a formas de la enolasa con distinto punto isoeléctrico</b> .....	144
<b>4.6. Efecto de la acetilación en la modificación de <math>\alpha</math>-enolasa por amoxicilina</b> .....	145
4.6.1. Repercusión de la acetilación <i>in vitro</i> en las distintas formas modificadas de la proteína.....	148
4.6.2. Acetilación de $\alpha$ -enolasa por ácido acetilsalicílico <i>in vitro</i> .....	149
<b>4.7. Modificación de <math>\alpha</math>-enolasa por penicilina</b> .....	151
<b>4.8. Análisis de la <math>\alpha</math>-enolasa modificada por AX <i>in vitro</i> mediante espectrometría de masas</b> .....	152
4.8.1. Caracterización de la haptенización de $\alpha$ -enolasa mediante MALDI-TOF MS y ESI-MS.....	152
4.8.2. Identificación de los sitios de modificación de la $\alpha$ -enolasa por AX mediante LTQ Orbitrap XL.....	154
<b>4.9. Modelado molecular</b> .....	156
VI. Discusión .....	159
<b>1. ANÁLISIS DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES POR FÁRMACOS</b> .....	161

<b>1.1. Estudio de la haptización de proteínas por amoxicilina en linfocitos B.....</b>	<b>162</b>
1.1.1. Naturaleza de las proteínas haptizadas por amoxicilina .....	164
1.1.2. Secreción activa de las proteínas haptizadas por amoxicilina	168
1.1.3. Transporte de proteínas haptizadas en exosomas .....	171
<b>1.2. Estudio de la haptización de proteínas por amoxicilina en otros tipos celulares .....</b>	<b>172</b>
<b>1.3. Estudio de la haptización de proteínas por penicilina en linfocitos B.....</b>	<b>174</b>
<b>2. ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS HAPTENZADAS.....</b>	<b>176</b>
2.1. Análisis de la vía lisosomal de procesamiento .....	176
2.2. Análisis de la vía proteasomal de procesamiento.....	178
<b>3. ESTUDIO DE LA HAPTENZACIÓN DE <math>\alpha</math>-ENOLASA POR AMOXICILINA .....</b>	<b>179</b>
VII. Conclusiones .....	187
VIII. Bibliografía .....	191





# I. Introducción



## 1. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PROTEÍNAS

Las modificaciones postraduccionales constituyen un proceso de especial importancia para las funciones celulares. Estas modificaciones pueden determinar la función de una proteína, activándola o inhibiéndola; su localización, como el caso de las modificaciones lipídicas de las GTPasas; la presentación de las proteínas modificadas como antígenos extraños y desencadenar la respuesta inmunitaria, o incluso, determinar el destino de estas proteínas para que sean reconocidas y eliminadas por los sistemas de degradación de la célula.

### 1.1. Tipos de modificaciones

Las modificaciones postraduccionales contribuyen a generar la gran diversidad estructural y funcional de las especies proteicas, alterando su secuencia y sus grupos funcionales. Estas pueden ocurrir de forma enzimática o no enzimática.

#### 1.1.1. Modificaciones postraduccionales enzimáticas

Existe una gran variedad de enzimas capaces de catalizar reacciones que añaden o eliminan grupos químicos en las proteínas modificando su función. Ejemplos son la fosforilación, la metilación o la acetilación, aunque hasta la fecha se conocen más de 100 tipos de modificaciones postraduccionales enzimáticas.

La fosforilación consiste en la adición de grupos fosfato en residuos de serina, treonina o tirosina, y es catalizada por quinasas. Esta reacción ocasiona un incremento de la carga negativa de la proteína. Es una modificación que está implicada en la regulación de las rutas de señalización celular (Day y col., 2016).

La metilación puede ocurrir en grupos amino de lisinas de la proteína, de forma que varios de estos grupos pueden incorporarse sobre el mismo

aminoácido (Lanouette y col., 2014). Esta modificación, catalizada por metil transferasas, es de especial importancia en la regulación de la expresión de genes. Además, la metilación del carboxilo terminal de las proteínas puede influir en su localización subcelular (Noguera-Salva y col., 2017).

La acetilación ocurre frecuentemente en la metionina del N-terminal de la proteína, aumentando su estabilidad, o en lisinas (Drazic y col., 2016). En el caso de las histonas, la acetilación de las lisinas puede interferir en su afinidad con el ADN. En esta reacción, el donador es el acetil coenzima A y puede ser una reacción enzimática, llevada a cabo por acetiltransferasas, o no enzimática (Verdin y Ott, 2015).

#### 1.1.2. Modificaciones postraduccionales no enzimáticas

Algunas modificaciones postraduccionales pueden ocurrir sin la participación activa de enzimas. Las proteínas se encuentran en constante exposición a sustancias reactivas, tanto exógenas como endógenas, que pueden participar en su modificación.

El estrés oxidativo en condiciones fisiopatológicas se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Tabla 1). Estas especies pueden dar lugar a la formación de productos de la peroxidación de lípidos como el malondialdehído, el propanal, el hexanal, el hidroxinonenal (HNE) y las prostaglandinas ciclopentenonas (Esterbauer y col., 1991; Benedetti y col., 1980) que pueden interaccionar con proteínas. En concreto, el HNE puede formar aductos de Michael (Sayre y col., 2006) o bases de Schiff (Aldini y col., 2015) con aminoácidos nucleofílicos como la lisina. Las prostaglandinas ciclopentenonas pueden modificar diversas proteínas, interaccionando principalmente con residuos de cisteína de proteínas Ras, de la glutatión-S-transferasa P1-1 (GSTP1-1) (Oeste y Pérez-Sala, 2014) o de las subunidades del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Pérez-Sala y col., 2003; Cernuda-Morollón y col., 2001), entre otras. También pueden interaccionar con compuestos con grupos tioles como el glutatión (GSH). En este caso, la

interacción entre las prostaglandinas ciclopentenonas y el GSH puede reducir la modificación de la GSTP1-1 (Gayarre y col., 2007).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno			
Radicales libres		Especies reactivas no radicales	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
Hidroxilo	$OH^{\cdot}$	Hidroperóxidos	ROOH
Alcoxi	RO	Hipoclorito	$ClO^{\cdot-}$
Peroxi	ROO	Oxígeno singlete	$^1O_2$
Carbonato	$CO_3^{\cdot-}$	Peroxinitrito	ONOO $^{\cdot-}$
Óxido nítrico	$NO^{\cdot}$		
Dióxido de nitrógeno	$NO_2$		

**Tabla 1: Resumen de las principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.**

A su vez, las especies reactivas formadas pueden interaccionar directamente con las proteínas (Davies, 2016). Se conocen numerosas reacciones de especies reactivas con diferentes aminoácidos de las proteínas. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede interaccionar con la cisteína 34 de la albúmina (Regazzoni y col., 2013). El radical hidroxilo puede formar aductos con la glicina y la alanina de pequeños péptidos (L. Hawkins y J. Davies, 1998). El oxígeno singlete se puede unir a residuos de histidina, triptófano, metionina y cisteína (Wilkinson y col., 1995).

Además de las modificaciones postraduccionales llevadas a cabo directa o indirectamente por las especies reactivas, las proteínas también se pueden modificar por sustancias exógenas como tóxicos ambientales o fármacos. En concreto, sustancias generadas en el ambiente por la oxidación de compuestos orgánicos como la acroleína, pueden formar aductos mediante adición de Michael en cisteínas de las proteínas (Cai y col., 2009). También compuestos químicos carcinógenos, como los epóxidos derivados de hidrocarburos poliaromáticos, forman aductos en grupos carboxílicos de la hemoglobina y la albúmina sérica (Tannenbaum y col., 1993). Además, las sustancias exógenas pueden inducir modificaciones postraduccionales

mediante mecanismos indirectos. Por ejemplo, los metales pesados presentes en el ambiente debido a la contaminación aumentan en el organismo los niveles de las especies reactivas del oxígeno (Shen y Dryhurst, 1998; Fowler y col., 2004) y, como consecuencia, se podrían producir las modificaciones anteriormente descritas. Los fármacos o sus metabolitos pueden modificar también diversos aminoácidos en proteínas. Una de las proteínas diana de fármacos mejor estudiada es la albúmina. Por ejemplo, la cisteína 34 de esta proteína se modifica por los antivirales abacavir y nevirapina y por sales de oro como las empleadas en el tratamiento de la artritis reumatoide (Meng y col., 2014; Meng y col., 2013; Talib y col., 2006).

En cuanto a las proteínas diana, las modificaciones no enzimáticas no ocurren de forma aleatoria: no todas las proteínas se modifican en la misma proporción, ni tampoco todos los residuos de una proteína. En general, las modificaciones afectan a residuos en los que se combina una especial reactividad (son altamente nucleofílicos), accesibilidad (para permitir la proximidad de la molécula que va a formar el aducto) y en muchos casos, un entorno determinado que favorece que se produzcan interacciones con los grupos químicos de la molécula reactiva y den estabilidad al complejo. De hecho, en ciertas proteínas existen residuos especialmente reactivos que pueden ser diana de numerosas modificaciones y se considera que desempeñan un papel "sensor" ante diversos tipos de estrés.

## **1.2. Importancia de las modificaciones postraduccionales en fisiopatología**

Las modificaciones postraduccionales regulan numerosos procesos celulares y pueden influir en la actividad de muchas proteínas interfiriendo en la homeostasis celular. Algunos compuestos o sustancias exógenas al organismo pueden reaccionar con proteínas o con el ADN formando aductos y produciendo efectos tóxicos, reacciones adversas o mutaciones en el material genético que pueden resultar clave para muchas enfermedades.

### 1.2.1. Implicación de modificaciones enzimáticas en patología

La alteración de la modificación enzimática de proteínas puede dar lugar o contribuir a numerosas patologías, como se ilustra en los ejemplos que se exponen a continuación.

En relación con la fosforilación, se ha descrito que las alteraciones o mutaciones de quinasas o fosfatasas pueden estar relacionadas con algunos tipos de cáncer, o con enfermedades como la diabetes o el linfoma no Hodgkin (Cohen, 2001).

La desregulación de la acetilación de proteínas puede estar relacionada con distintos tipos de enfermedades como el Alzheimer (Zhang y col., 2012), el Párkinson (Gebremedhin y Rademacher, 2016) o el cáncer. Por ejemplo, un aumento en la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en el cáncer de mama puede aumentar la migración celular y promover la metástasis (Boggs y col., 2015).

La metilación de argininas de algunas proteínas juega un papel importante en el desarrollo del cáncer (Wei y col., 2014). En varios tipos de cáncer se ha observado un aumento de expresión de metiltransferasas encargadas de modificar argininas, que puede estar involucrado en su desarrollo (Yoshimatsu y col., 2011).

### 1.2.2. Implicación de modificaciones no enzimáticas en patología

Las modificaciones postraduccionales no mediadas por procesos enzimáticos constituyen también un importante factor en el desarrollo de algunas enfermedades. Tanto las especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno, como compuestos xenobióticos, como tóxicos o fármacos, pueden producir la modificación de proteínas, favoreciendo la aparición de enfermedades o reacciones adversas.

En la enfermedad de Alzheimer, la interacción de radicales libres del oxígeno con lípidos puede formar productos mucho más reactivos, como el HNE o especies con grupos carbonilo. Dichas especies son capaces de generar aductos mediante adición de Michael con lisinas, histidinas o cisteínas que alteren la función o la conformación de las proteínas diana (Butterfield y col., 2011). De hecho, la formación de estos aductos se encuentra aumentada en esta enfermedad (Reed y col., 2009; Perluigi y col., 2009).

En la esclerosis lateral amiotrófica se han identificado numerosas mutaciones en la enzima superóxido dismutasa, lo cual provoca un aumento de las especies reactivas del oxígeno en las células (Beckman y col., 1994). Posiblemente asociado a este aumento del estrés oxidativo, se ha encontrado un incremento de hidroxinonenal en el fluido cerebroespinal de pacientes con esta enfermedad (Smith y col., 1998). En estudios de proteómica realizados en modelos de ratón de esta enfermedad se han encontrado proteínas modificadas por el HNE, como la HSP70 o la  $\alpha$ -enolasa (Perluigi y col., 2005).

En los procesos de respuesta inflamatoria también se generan productos de lipoxidación anteriormente descritos (Esterbauer y col., 1991). Durante estos procesos, la expresión de enzimas que forman parte de la defensa antioxidante, como la superóxido dismutasa, la catalasa, la tiorredoxina, las peroxirredoxinas o la GSTP1-1 se encuentra incrementada (Birben y col., 2012). Sin embargo, la actividad de la enzima GSTP1-1 puede resultar alterada debido a procesos oxidativos que dan lugar a la formación de oligómeros (Sánchez-Gómez y col., 2010). Por otra parte, la presencia de prostaglandinas ciclopentenonas, como la 15-desoxi- $\Delta$ (12,14)-prostaglandina J(2), puede inducir la oligomerización de esta enzima ya sea mediante estrés oxidativo o directamente por "cross-linking" (Sánchez-Gómez y col., 2010), lo que provoca su inactivación.

La modificación no enzimática de proteínas también puede dar lugar a un aumento de su inmunogenicidad. En diversas enfermedades se han detectado anticuerpos contra neoantígenos que se han generado de esta forma. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, se han encontrado anticuerpos en



el suero de pacientes que son capaces de reconocer proteínas citrulinadas, como el colágeno, la vimentina o la  $\alpha$ -enolasa (Wegner y col., 2010; Klareskog y col., 2008).

La modificación de proteínas por fármacos merece una atención especial debido a su implicación en reacciones adversas, que analizaremos con detalle en el siguiente capítulo. Una vez ingeridos, los fármacos son transportados generalmente en la sangre unidos a proteínas como la albúmina sérica (Yamasaki y col., 2013; Zhivkova, 2015) y pueden dar lugar a reacciones adversas, que en algunos casos están mediadas por sus metabolitos. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la toxicidad hepática inducida por dosis elevadas de acetaminofeno (Larson y col., 2005), cuyo metabolito, la N-acetil-p-benzoquinona, puede formar aductos con grupos tioles. Como consecuencia, se produce una severa reducción de los niveles de glutatión reducido y una alteración de la función de proteínas por reacción con los residuos de cisteína de las proteínas (Thompson y col., 2016). En situaciones de enfermedad, es necesario tener en cuenta que las modificaciones de proteínas por fármacos pueden coexistir con las modificaciones no enzimáticas producidas por especies reactivas endógenas, y dar lugar a distintos tipos de interacciones que modifiquen la formación de aductos de fármacos.

## **2. REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS**

### **2.1. Definición**

La gran mayoría de fármacos, aparte de realizar la función para la que han sido diseñados, son capaces de producir efectos no deseados o reacciones adversas en los pacientes. La Organización Mundial de la Salud define estas reacciones como “cualquier reacción nociva no intencionada que aparece a dosis normalmente usadas en el ser humano para profilaxis, diagnóstico, tratamiento o para modificar funciones fisiológicas” (World Health Organization., 1972). Las reacciones adversas a fármacos constituyen un problema para la salud pública. Se estima que alrededor de entre un 3 y un

10% de los pacientes hospitalizados desarrollan algún tipo de estas reacciones (Bouvry y col., 2015; Chan y col., 2016; Stausberg, 2014).

## **2.2. Tipos de reacciones adversas**

Existen diferentes tipos de reacciones adversas a medicamentos. Estas reacciones pueden ser predecibles (Tipo A) o impredecibles (Tipo B) (Rawlins y Thompson, 1977). Las reacciones de Tipo A se caracterizan por ser resultado de los efectos farmacológicos de los medicamentos. Este tipo de reacciones son dependientes de la dosis. A pesar de ser el tipo de reacción más frecuente, no suele presentar peligro para la vida del paciente. Ejemplos de este tipo de reacciones son las hemorragias por el uso de anticoagulantes o la presión arterial baja por el uso de antihipertensivos. Las reacciones de Tipo B se caracterizan por presentar efectos no relacionados con el efecto pretendido del medicamento administrado. Generalmente, son independientes de la dosis usada. En ciertas ocasiones, pueden provocar enfermedades graves o incluso la muerte. Ejemplos de este tipo de reacciones son la hipertermia maligna por el uso de anestésicos o la hipersensibilidad o alergia a ciertos medicamentos.

## **2.3. Reacciones alérgicas**

Uno de los principales efectos adversos producidos del uso de fármacos es la reacción alérgica. Esta respuesta se produce debido a la activación del sistema inmune al haber entrado en contacto con sustancias extrañas al organismo, denominadas alérgenos.

La clasificación de las reacciones alérgicas responde a los síntomas típicos y a cómo se desarrollan. De este modo, se distinguen cuatro tipos (Gell y Coombs, 1968): Tipo I (mediadas por IgE), Tipo II (mediadas por reacciones de citotoxicidad), Tipo III (mediadas por inmunocomplejos) y Tipo IV (hipersensibilidad retardada). Las características de cada tipo se resumen en la Tabla 2.

Reacciones alérgicas	
<b>Tipo I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmediata, se produce a los pocos minutos</li> <li>• Mediada por IgE específicas</li> <li>• Intervienen eosinófilos, mastocitos basófilos y neutrófilos</li> <li>• Síntomas: urticaria, conjuntivitis, rinitis alérgica, asma y/o anafilaxis</li> </ul>
<b>Tipo II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmediata, se produce a los pocos minutos u horas</li> <li>• Citotoxicidad dependiente de anticuerpos</li> <li>• Intervienen células NK, monocitos, neutrófilos y eosinófilos</li> <li>• Síntomas: granulocitopenia, anemia hemolítica y/o trombocitopenia</li> </ul>
<b>Tipo III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmediata, se produce a las pocas horas</li> <li>• Intervienen inmunocomplejos, mastocitos y neutrófilos</li> <li>• Síntomas: angioedema, síntomas gastrointestinales, neuropatías, encefalomielitis y/o pericarditis</li> </ul>
<b>Tipo IV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No inmediata, se produce a los 2 o 3 días</li> <li>• Mediada por células T</li> <li>• Intervienen macrófagos, monocitos y células T</li> <li>• Síntomas: erupción maculopapular, eosinofilia, síndrome de Stevens-Johnson y/o exantema</li> </ul>

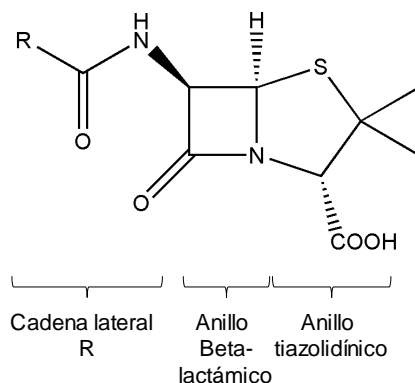
**Tabla 2: Resumen de las características de los diferentes tipos de reacciones alérgicas.** Adaptado de Baldo y Pham (2013).

### 2.3.1. Antibióticos betalactámicos

Los fármacos que más comúnmente producen reacciones alérgicas son los antibióticos betalactámicos (Doña y col., 2012). Estos antibióticos actúan impidiendo la formación de la pared bacteriana. Son uno de los grupos de fármacos más usados. Se estima que un 10% de los pacientes que toman betalactámicos desarrollan reacciones alérgicas (Albin y Agarwal, 2014; Macy, 2014). Sin embargo, esta prevalencia se encuentra en disminución en paralelo con un aumento en las reacciones frente a otro betalactámico ampliamente usado, la amoxicilina, ya sea por sí misma o en combinación con el ácido clavulánico (Doña y col., 2012).

Los betalactámicos se clasifican en diferentes grupos dependiendo de su estructura química: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas y clavamas. Exceptuando las monobactamas, la estructura

general de estos fármacos incluye un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico o a un anillo dihidrotiacínico que forman el núcleo de la molécula (Esquema 1).



**Esquema 1: Estructura química de los betalactámicos del grupo de las penicilinas.**

Los diferentes grupos de betalactámicos se distinguen en función de las diferentes cadenas laterales que pueden estar unidas a estos anillos (Tabla 3).

Grupo	Estructura química
Penicilinas	
Cefalosporinas	
Carbapenémicos	
Clavamas	
Monobactamas	

**Tabla 3: Estructura de los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos**

Se requieren numerosos factores para la inducción de una reacción alérgica por estos medicamentos. Entre ellos, podemos destacar tanto los de naturaleza inmunológica, como la presentación del antígeno por células especializadas o el reconocimiento de este por células T, como los de naturaleza bioquímica, relacionados con la modificación postraduccional de proteínas por parte del fármaco o de sus metabolitos.

Existen varias hipótesis que tratan de explicar el desarrollo de las reacciones alérgicas inducidas por fármacos: la hipótesis de la señal de peligro, la de las interacciones farmacológicas o concepto “p-i” y la hipótesis del hapteno.

La hipótesis de la señal de peligro (Matzinger, 1994) propone que las moléculas que se generan debido al daño celular producido por el fármaco y por la presencia de patógenos, entre las que se encuentran proteínas virales, lipopolisacáridos o citoquinas, pueden influir sobre el sistema inmune. De este modo, se iniciaría y/o potenciaría una respuesta inflamatoria que podría desembocar en la reacción alérgica.

La hipótesis de las interacciones farmacológicas (Pichler, 2008) propone que la unión mediante enlace no covalente del fármaco con receptores característicos de células que participan en la respuesta inmunitaria podría iniciar el proceso alérgico. Se han descrito interacciones de carácter no covalente entre fármacos, como la carbamazepina o el sulfametoxazol y receptores del sistema inmune, como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que se encarga de la presentación antigénica, o el receptor de células T (TCR) (Gerber y Pichler, 2006).

La hipótesis del hapteno (Landsteiner y Jacobs, 1935) establece que el inicio de la reacción alérgica se lleva a cabo gracias al reconocimiento por parte del sistema inmune de complejos moleculares formados por la unión covalente entre el fármaco y proteínas. Las proteínas haptinizadas pueden ser tanto extracelulares como intracelulares. El complejo proteína-fármaco formado sería procesado en el interior celular mediante vías de degradación reguladas por la

propia célula, generando el posible o los posibles antígenos y presentándolos en la superficie celular para dar inicio a la respuesta alérgica.

### **3. HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

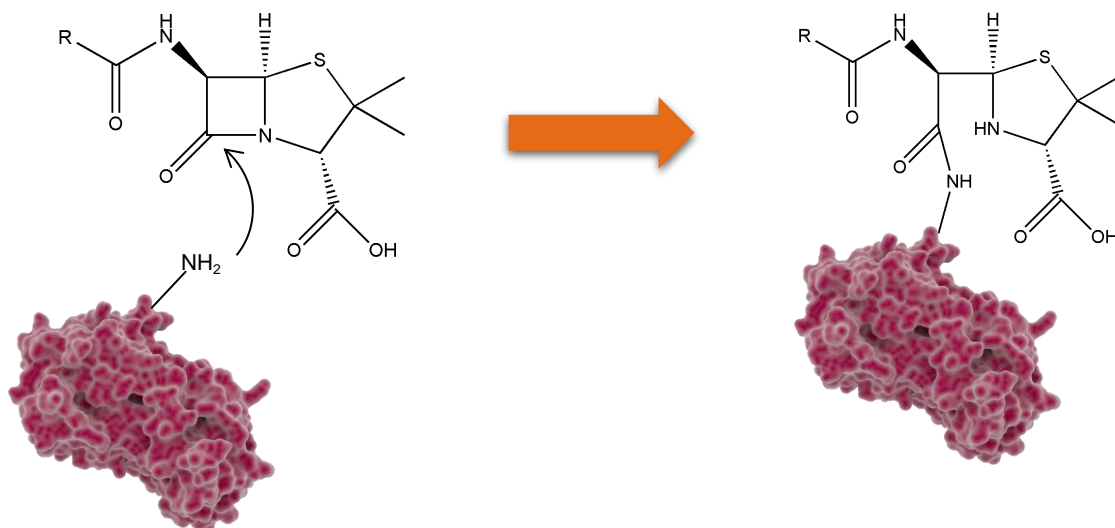
Se define como hapteno toda molécula de bajo peso molecular (<1.000 Da) que es incapaz de inducir una respuesta inmunitaria por sí misma, pero que, debido a su alta reactividad química, tras unirse con moléculas de mayor tamaño y capacidad antigénica, como proteínas, desencadenaría la respuesta inmunitaria.

Las primeras evidencias sobre la reactividad de algunos compuestos de bajo peso molecular para haptenizar proteínas e inducir la activación del sistema inmunitario se obtuvieron a partir de la haptenización de proteínas por dinitrofluorobenceno (Landsteiner y Jacobs, 1935). Posteriormente, la haptenización se comprobó con otros compuestos como el óxido de etileno (Bommer y col., 1985), el formaldehído (Patterson y col., 1986) o el diisocianato de tolueno (Karol y col., 1978). El funcionamiento de todas estas moléculas de pequeño tamaño como haptenos podría estar implicado en el desarrollo de reacciones adversas a las mismas.

A su vez, la información sobre haptenización de proteínas por fármacos, concretamente por betalactámicos, fue desarrollada en numerosos estudios llevados a cabo con penicilina (Ahlstedt y col., 1980; De Weck y Eisen, 1960; Levine y Ovary, 1961; Batchelor y col., 1965). En estos estudios se detalla la reactividad de la propia molécula frente a proteínas y la producción de anticuerpos específicos frente al aducto del fármaco con aminoácidos de la proteína. A partir de entonces, han sido muchos los estudios que han caracterizado la unión de antibióticos betalactámicos a proteínas tanto extracelulares como intracelulares.

#### **3.1. Haptenización de proteínas extracelulares por betalactámicos**

La haptización de proteínas por fármacos betalactámicos ocurre mediante un ataque nucleofílico de un grupo amino de la proteína al anillo betalactámico produciendo la apertura de este (Esquema 2).



**Esquema 2: Proceso de haptización de proteínas por betalactámicos.** Residuos nucleofílicos de la proteína, como los grupos amino de las lisinas, reaccionarían mediante ataque nucleofílico con el anillo betalactámico, produciendo la apertura de este.

En la literatura existen diversos estudios sobre haptización mediada por fármacos betalactámicos, en concreto por la flucloxacilina, piperacilina y la amoxicilina.

La flucloxacilina es un antibiótico betalactámico semisintético usado principalmente contra infecciones producidas por *Staphilococcus*. Este fármaco puede ser metabolizado por el citocromo P450 3A4 a 5-hidroximetil flucloxacilina. Tanto el betalactámico original como su metabolito, han sido detectados unidos a la albúmina humana en pacientes y en condiciones *in vitro* (Jenkins y col., 2009). Se ha descrito que ambos compuestos modifican las lisinas 190 y 212 de esta proteína en ambas condiciones.

La piperacilina es un antibiótico betalactámico semisintético que se administra para el tratamiento de la neumonía bacteriana. En estudios *in vitro* se ha observado que este fármaco también se une a la albúmina. Mediante abordajes de espectrometría de masas, se determinó que la lisina 541 se haptizaba con bajas concentraciones del fármaco, mientras que las lisinas

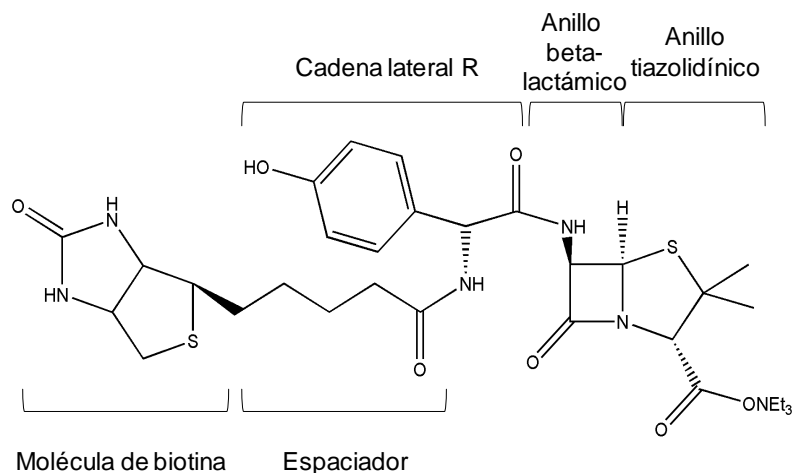
190, 195, 432 y 541 se haptenizaban en presencia de concentraciones más elevadas. Además, la haptenización de estos aminoácidos se detectó en plasma de pacientes (Whitaker y col., 2011). En este mismo estudio, se confirmó la antigenicidad de la albúmina haptenizada por este fármaco mediante estimulación de células T.

La amoxicilina es una penicilina semisintética perteneciente al grupo de las aminopenicilinas. Se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas, principalmente del tracto respiratorio. El hecho de ser uno de los betalactámicos más recetados podría estar asociado con la generación de más respuestas alérgicas. El estudio del proceso de haptenización de este fármaco es de especial importancia para comprender el desarrollo de las reacciones adversas y mejorar la seguridad de este medicamento.

La haptenización de proteínas séricas por amoxicilina ha sido objeto de estudios previos del grupo. En ensayos realizados *in vitro*, combinando detección inmunológica y técnicas de proteómica, se determinó que tanto la albúmina, la apolipoproteína A1, las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, la haptoglobina 2 y la transferrina resultaban haptenizadas por este fármaco (Ariza y col., 2012). Análisis más detallados de la modificación de la albúmina mediante MS, revelaron que el anillo betalactámico de la amoxicilina es capaz de reaccionar con la lisina 190, *in vitro* y en pacientes, y con la 432, en estudios *in vitro* (Ariza y col., 2012).

El uso de betalactámicos derivatizados con distintos grupos funcionales ha sido importante para la identificación de proteínas diana de haptenización. El empleo de ciertas especies moleculares acopladas a estos fármacos, que permiten una detección de mayor sensibilidad con métodos bioquímicos sencillos, ha facilitado la identificación de las proteínas haptenizadas. De esta forma, utilizando un análogo biotinilado de la amoxicilina (Esquema 3), se ha podido confirmar la haptenización de proteínas séricas antes identificadas por amoxicilina, pero en esta ocasión con concentraciones mucho menores y más próximas a las que se alcanzan farmacológicamente (Ariza y col., 2014).





**Esquema 3: Estructura molecular de la amoxicilina biotinilada.** La amoxicilina representada en el esquema es un derivado con trietanolamina (Et<sub>3</sub>).

### 3.2. Haptenización de proteínas extracelulares por otros fármacos

En la bibliografía se han descrito numerosos fármacos, además de los betalactámicos, que son capaces de haptenizar proteínas, como es el caso de los antiinflamatorios no esteroideos o los antivirales.

El ibuprofeno es uno de los antiinflamatorios más usados. Este fármaco es una de las primeras opciones para paliar síntomas como la fiebre y el dolor. El mecanismo de acción del ibuprofeno consiste en la inhibición de las ciclooxigenasas COX1 y COX2 evitando la formación de prostaglandinas. El ibuprofeno se puede degradar por medio del citocromo P450, formando acil glucurónidos, hidroxi-ibuprofeno y carboxi-ibuprofeno (Geisslinger y col., 1989). En estudios realizados *in vitro*, en los cuales se realizaron incubaciones de acil glucurónido del ibuprofeno junto con proteínas del suero, como la albúmina, se observó que este metabolito se unía a las proteínas plasmáticas (Castillo y col., 1995). Además, en el mismo estudio, se detectó la presencia de proteínas modificadas por el metabolito en plasma y orina de pacientes tratados con ibuprofeno.

El diclofenaco es un antiinflamatorio usado frecuentemente para el tratamiento de procesos articulares y en concreto en la artritis reumatoide. Tras su administración, este fármaco es metabolizado por el citocromo P450 a acil

glucurónidos. Se ha comprobado que estos metabolitos son capaces de reaccionar con la albúmina en ensayos *in vitro* (Hammond y col., 2014).

Uno de los antivirales más usados para el tratamiento del SIDA es el abacavir. Este fármaco ha estado asociado en varias ocasiones con reacciones de hipersensibilidad (Almeida y col., 2008; Mallal y col., 2002; Peyriere y col., 2003; Cutrell y col., 2004). En estudios *in vitro* se ha observado que este fármaco también es capaz de unirse a la albúmina, como revela el análisis mediante espectrometría de masas (Meng y col., 2014). Sin embargo, se desconoce si la formación de aductos entre este fármaco y la albúmina es responsable del desarrollo de reacciones adversas.

El estudio de la formación de aductos de estos fármacos o de sus metabolitos con proteínas podría facilitar el conocimiento de los procesos que favorecen el desarrollo de toxicidad o reacciones adversas.

### **3.3. Haptenización de proteínas intracelulares por fármacos**

El estudio de la haptenización de proteínas se ha centrado sobre todo en la modificación de proteínas presentes en el suero. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la interacción de fármacos con proteínas intracelulares. A lo largo de sus vías de administración y de distribución, los fármacos pueden interactuar con numerosos tipos celulares. Esta interacción podría favorecer su internalización y finalmente la haptenización de proteínas intracelulares. El análisis de la haptenización de proteínas intracelulares por fármacos podría permitir una mejor comprensión de los procesos celulares que ocurren y que favorecen la presentación antigénica del complejo fármaco-proteína. Además, pueden identificar nuevas estructuras implicadas en la respuesta inmune.

En la bibliografía, se ha reportado la haptenización de proteínas intracelulares por agentes antibacterianos como las sulfonamidas. Ejemplos de sulfonamidas son el sulfametoxazol y la dapsona. La haptenización de proteínas intracelulares por sulfonamidas o por sus metabolitos se ha demostrado tanto en fibroblastos dérmicos humanos como en células

dendríticas, mediante ELISA y microscopía de fluorescencia (Bhaiya y col., 2006; Roychowdhury y col., 2007).

La entrada de fármacos al interior celular está condicionada en muchos casos por su carga y otras propiedades químicas de la molécula. En ocasiones, se recurre a estrategias alternativas para poder introducir el fármaco en el interior celular para que este llegue a su diana, como por ejemplo el uso de péptidos o proteínas (Xu, 2015), liposomas (Lajunen y col., 2015) o mediante su unión directa a lípidos (Abed y col., 2015).

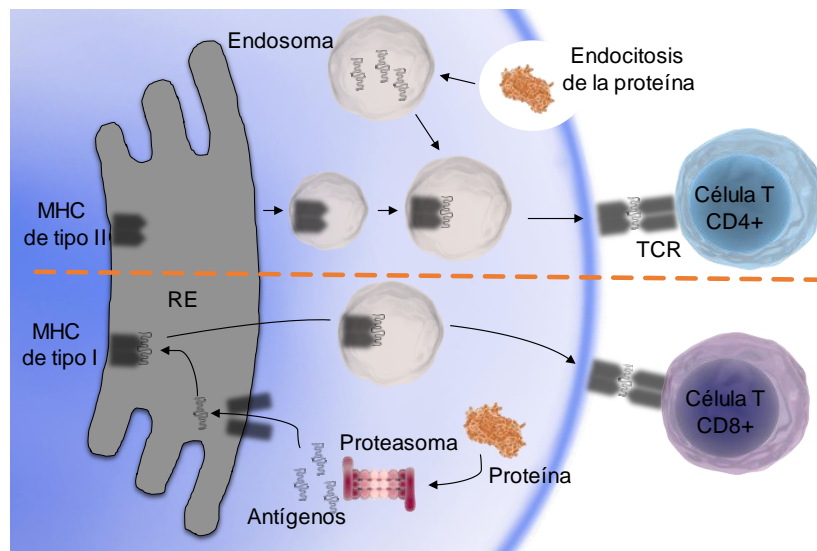
En el caso de la amoxicilina se ha descrito que puede entrar en células de riñón e hígado mediante los contranportadores de protones y péptidos (PEPT1 y PEPT2) (Sala-Rabanal y col., 2006; Sala-Rabanal y col., 2008; Tamai y col., 1985). Además, mediante ensayos de inmunocitoquímica se ha detectado este fármaco en el interior de células de intestino, riñón e hígado de rata y de células inmunes (Fujiwara y col., 2011; Ariza y col., 2014).

### **3.4. Procesamiento intracelular de las proteínas haptinizadas**

Se ha propuesto que las vías de procesamiento de proteínas haptinizadas por fármacos dependen de la procedencia, intracelular o extracelular, de dichas proteínas. Ello influirá en el tipo de degradación y a su vez determinará la respuesta inmunitaria que se va a producir.

En el caso de la formación de antígenos a partir de proteínas haptinizadas extracelularmente, estas son internalizadas por endocitosis. Las proteínas, se degradarán en compartimentos endosomales y/o lisosomales por acción de diferentes proteasas dando lugar a la formación de péptidos antigénicos (Shi y col., 1999; Villadangos y col., 1999; Rudensky y Beers, 2006). Las moléculas principales de histocompatibilidad de tipo II, o MHC de tipo II, sintetizadas en el retículo endoplasmático son transportadas en vesículas hasta los compartimentos que contienen los antígenos ya procesados. El complejo antígeno-MHC de tipo II es expuesto en la superficie celular de células presentadoras de antígenos donde será reconocido por linfocitos T CD4+ o cooperadores (Roche y Furuta, 2015) (Esquema 4).

Las proteínas haptinizadas en el interior celular, en cambio, podrían ser procesadas por el proteasoma. Los péptidos antigénicos producidos por el proteasoma son transportados al interior del retículo endoplasmático para formar el complejo antígeno-MHC de tipo I. Este complejo es transportado hasta la superficie celular, donde será reconocido por linfocitos T CD8+ o citotóxicos (Blum y col., 2013; Cresswell y col., 2005) (Esquema 4). Además de su exposición en la superficie celular, las proteínas o péptidos haptinizados podrían interaccionar con otras células tras su liberación al medio extracelular, bien debido a lisis celular o a procesos de secreción que por el momento han sido poco explorados.



**Esquema 4: Vías de procesamiento de antígenos en el contexto de MHC de tipo I y de tipo II.** En la vía de degradación lisosomal (parte superior), las proteínas son internalizadas por endocitosis y son degradadas en pequeños péptidos. Estos péptidos se unen a los MHC de tipo II para ser expuestos en la superficie celular. En la vía de degradación proteasomal (parte inferior), las proteínas intracelulares son degradadas por el proteasoma. Los antígenos generados son transportados hasta el retículo endoplasmático (RE) donde forman complejos con las moléculas MHC de tipo I que serán expuestas en la superficie celular. Adaptado de Kobayashi y van den Elsen (2012).

Todos estos datos apoyan la idea de que la modificación de proteínas propias del paciente por numerosos fármacos es un proceso clave en el desarrollo de las respuestas alérgicas. Por ello, el estudio de las principales dianas proteicas susceptibles de ser modificadas por fármacos de uso muy común es importante para obtener información y conocimientos sobre cómo se llegan a desencadenar las reacciones alérgicas mediadas por fármacos. Un

mejor análisis en este campo podría mejorar el uso de medicamentos en los pacientes alérgicos. Para ello, se podrían desarrollar estrategias que impidan que estos fármacos modifiquen proteínas que estén relacionadas con el proceso alérgico o que activen el sistema inmune y así paliar los efectos adversos de muchos medicamentos.

#### **4. COMUNICACIÓN INTERCELULAR**

La comunicación intercelular es el proceso por el que una célula interacciona con otra, mediante la secreción de moléculas o por interacción directa, con la finalidad de llevar a cabo una respuesta o acción conjunta en procesos fisiológicamente importantes.

El progreso de numerosas enfermedades o patologías se basa en la transferencia de información de unas células a otras. Cualquier alteración de esta comunicación puede perjudicar gravemente la salud. Existen diferentes formas de transferencia de información de una célula a otra en función de la distancia entre célula emisora y receptora o del tipo de información. De este modo, la comunicación puede ser endocrina, paracrina, yuxtacrina o autocrina. En procesos de inflamación o de respuesta alérgica predominan la comunicación paracrina y yuxtacrina.

Un gran número de moléculas y de tipos celulares pueden participar en la comunicación celular que se lleva a cabo en procesos inflamatorios y en la alergia. El papel de la comunicación entre células va a orquestar una respuesta eficaz frente a un patógeno, agente nocivo o célula dañada. De este modo, tanto la sinapsis neuronal como la comunicación endotelio y túnica media con las células del sistema inmune van a permitir el correcto desarrollo de la inflamación o de la reacción alérgica. Un ejemplo de comunicación intercelular de especial relevancia en los procesos alérgicos es la sinapsis inmunológica.

##### **4.1. Sinapsis inmunológica**

La sinapsis inmunológica se define como la interacción o comunicación entre una célula presentadora de antígenos y una célula efectora, normalmente, un linfocito T (Paul y Seder, 1994; Norcross, 1984). La formación de la sinapsis inmunológica comienza con la exposición del antígeno sobre los complejos MHC. Sin embargo, el linfocito T necesita previamente encontrar a la célula dendrítica y pasar por un proceso de polarización que permita el correcto reconocimiento del complejo MHC-antígeno por el receptor TCR. Este proceso de polarización ocurre mediante la actuación de quimioquinas. Los receptores del linfocito T reconocen el gradiente de quimioquinas y sitúan a la célula mediante un proceso de formación de uropodios y lamelipodios (Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999).

Una vez el linfocito T y la célula presentadora de antígenos se encuentran en posición, ocurre la adhesión entre ambas células mediante contactos moleculares y químicos (Grakoui y col., 1999). Independientemente de estos contactos que puedan ocurrir entre estas dos células, es importante destacar la presencia de otros mediadores en la sinapsis como las microvesículas. En experimentos llevados a cabo con linfocitos T y células presentadoras de antígenos, se ha comprobado la existencia de una transferencia unidireccional de exosomas cargados con miARNs de las células T hacia las células presentadoras de antígenos, que pueden influir en su expresión génica (Mittelbrunn y col., 2011; Mittelbrunn y Sanchez-Madrid, 2012). La formación de la sinapsis inmunológica es un proceso clave que aumenta la transferencia de exosomas entre ambas células.

Finalmente, el reconocimiento del complejo MHC-antígeno por parte del TCR del linfocito conduce a la activación de este (Sloan-Lancaster y col., 1998; Huppa y Davis, 2003). La activación final del linfocito T supone una serie de efectos que dependerán del tipo de molécula de histocompatibilidad reconocida, de forma que los MHC de tipo II activarán linfocitos T cooperadores CD4+ y los MHC de tipo I a linfocitos T citotóxicos CD8+. Los linfocitos T cooperadores, tras haber reconocido el antígeno sobre la superficie de una célula dendrítica, son capaces de reconocer el complejo MHC-antígeno sobre la superficie de linfocitos B. El proceso de sinapsis sobre estas dos células va a tener como

consecuencia la activación de la célula B y la producción de anticuerpos específicos contra ese antígeno (Parker, 1993). Los linfocitos T citotóxicos se activan mediante células infectadas normalmente por virus o por proteínas haptinizadas procesadas por el proteasoma. La activación de la célula T induce la destrucción de la célula con el antígeno mediante la producción de granzimas y perforinas.

#### **4.2. Papel de los exosomas en la respuesta inmune**

Como se ha comentado en el apartado anterior, los exosomas pueden estar directamente implicados en la respuesta inmunitaria y en la comunicación intercelular, e incluso pueden mediar con otras células que se encuentren a distancias mayores que la de la sinapsis inmunológica.

Entre las primeras evidencias de la existencia de estas estructuras se encuentra la descripción de Trams y col. (1981). Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana lipídica de entre 40 y 100 nm de diámetro. Presentan forma esférica en estado fisiológico y pueden tener forma de copa al desecarlos y observarlos mediante microscopía electrónica (Raposo y col., 1996; Conde-Vancells y col., 2008). Estas vesículas pueden participar en diferentes procesos como el desarrollo y homeostasis de tejidos sanos (Gross y col., 2012), o en procesos relacionados con el cáncer, incluyendo cáncer de ovario (Taylor y Gercel-Taylor, 2005), colorrectal (Dai y col., 2005), de mama (Wolfers y col., 2001) o de próstata (Mitchell y col., 2009) y la metástasis, en la que contribuyen a preparar el microambiente de la nueva zona (Peinado y col., 2012).

##### **4.2.1. Biogénesis de los exosomas**

Los exosomas son secretados al espacio extracelular, en mayor o menor medida, por todos los tipos celulares, como células hematopoyéticas, reticulocitos, linfocitos B y T, células dendríticas, mastocitos, algunas células epiteliales, astrocitos y células tumorales (Zitvogel y col., 2000; Johnstone y

col., 1989; Raposo y col., 1996; Skokos y col., 2002; van Niel y col., 2001; Faure y col., 2006).

La formación de los exosomas ocurre en los cuerpos multivesiculares. Estos compartimentos celulares provienen de la vía endocítica. La maduración de los endosomas tempranos hacia endosomas tardíos conlleva la producción de invaginaciones de membrana que forma las vesículas intraluminales cuya liberación al espacio extracelular dará lugar a los exosomas.

La formación de las vesículas intraluminales en los cuerpos multivesiculares se puede llevar a cabo mediante mecanismos dependientes o independientes de los complejos ESCRT (“Endosomal Sorting Complex Required for Transport”) (Colombo y col., 2014). Las proteínas ESCRT se pueden ensamblar formando cuatro complejos (ESCRT-0, -I, -II y -III) junto con proteínas accesorias (ALIX, VTA1 y VPS4). Cada complejo va a desempeñar funciones diferentes en la formación de las vesículas. En primer lugar, ESCRT-0 se encarga de reclutar proteínas ubiquitinadas a la membrana endosomal. A continuación, el complejo formado por ESCRT-0 recluta a ESCRT-I que junto con ESCRT-II favorece la deformación de la membrana del endosoma para comenzar la formación de la vesícula. Finalmente, el complejo ESCRT-III formará el cuello de la vesícula individualizándola en el interior del cuerpo multivesicular (Hanson y Cashikar, 2012; Colombo y col., 2014).

En referencia a los procesos independientes del complejo ESCRT, cabe destacar la regulación de la formación de vesículas por lípidos. La presencia de microdominios de esfingolípidos en la membrana de los cuerpos multivesiculares favorecen la formación de ceramidas. El aumento de la concentración de ceramidas en pequeños dominios puede inducir la curvatura de la membrana y, en definitiva, la formación de vesículas intraluminales. Además, en experimentos realizados en células oligodendrogiales de ratón, se ha comprobado una disminución considerable en la producción de exosomas cuando se trataban estas células con inhibidores específicos de la esfingomielinasa neutra (Trajkovic y col., 2008), enzima que cataliza la formación de ceramidas.

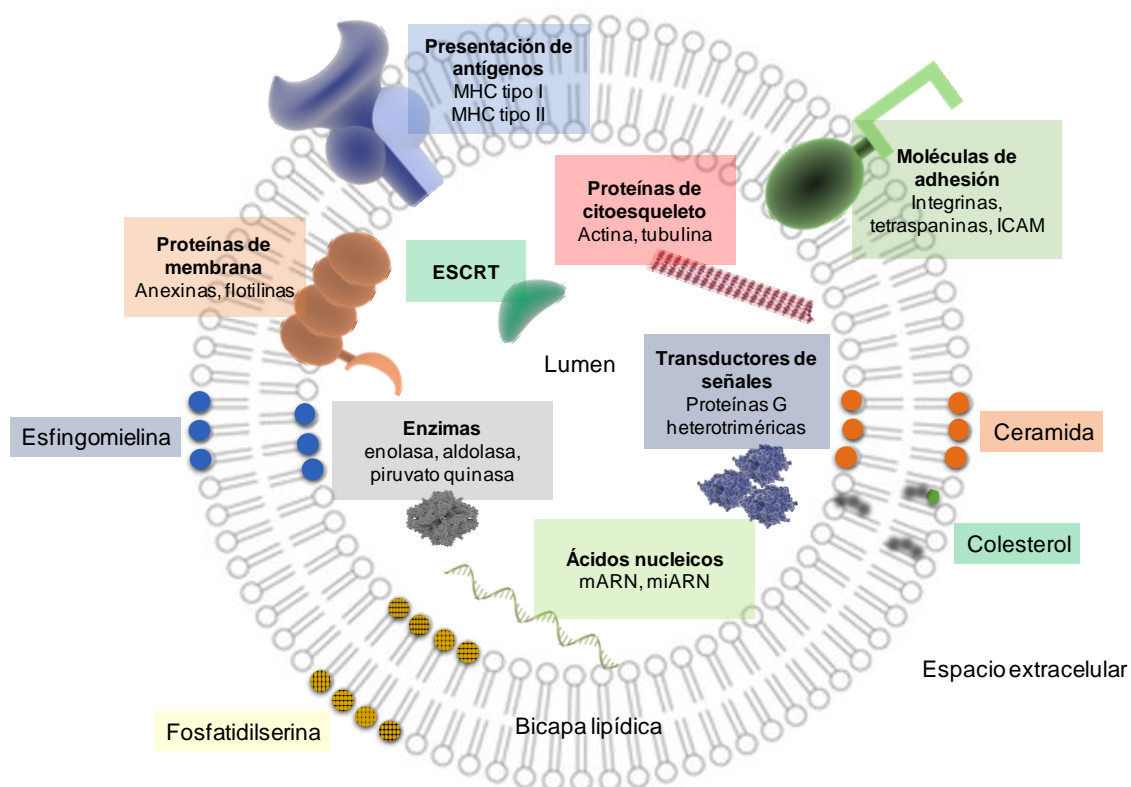


Finalmente, el destino de los cuerpos multivesiculares puede estar condicionado por varios factores. En muchos casos, los cuerpos multivesiculares se fusionan con lisosomas para degradar las proteínas que haya en el interior. Sin embargo, en otras ocasiones, los cuerpos multivesiculares pueden unirse a la membrana plasmática de la célula exponiendo las proteínas en la membrana o liberándolas en el interior de exosomas (Piper y Katzmann, 2007).

#### 4.2.2. Estructura y constituyentes de los exosomas

El contenido proteico, lipídico o nucleico de los exosomas va a determinar su destino y su función. Este contenido depende en gran medida del tipo celular que los libere. Sin embargo, muchas proteínas son comunes a la gran mayoría de exosomas.

En la superficie de las vesículas puede haber complejos proteicos transmembrana como los MHC de tipo I y de tipo II (Blanchard y col., 2002; Raposo y col., 1996), integrinas, tetraspaninas como CD63 o CD81 (Chaput y Thery, 2011) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) (Segura y col., 2005). En la cara interna de la membrana podemos encontrar anexinas y flotilinas. En cuanto al contenido lipídico de la membrana, predominan microdominios de esfingomielina, ceramida, colesterol y fosfatidilserina (Llorente y col., 2013) (Esquema 5). En el lumen de las vesículas puede haber una gran variedad de proteínas, desde proteínas del citoesqueleto, como actina, cofilina, miosina o tubulina, transductores de señales como proteínas G heterotriméricas, enzimas como la  $\alpha$ -enolasa, la aldolasa, la 3-fosfato deshidrogenasa, o la piruvato quinasa; factores de elongación y chaperonas como HSP70 (Colombo y col., 2014; Chaput y Thery, 2011) (Esquema 5). Además, pueden contener ácidos nucleicos como mRNA o miARN, que pueden afectar al patrón de expresión de la célula receptora de estas estructuras (Ismail y col., 2013).

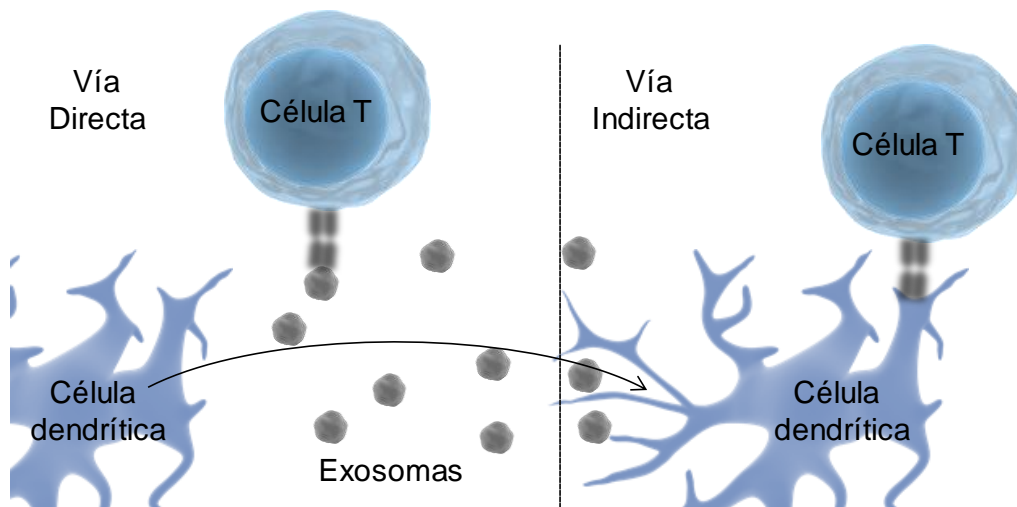


**Esquema 5: Representación y composición de un exosoma.** Los exosomas están compuestos por una bicapa lipídica sobre la que pueden ir acopladas proteínas con diversas funciones: presentación de antígenos, adhesión y comunicación celular o transportadores. La composición de lípidos puede variar, pero comúnmente podemos encontrar esfingomielina, fosfatidilserina o ceramida y colesterol. En el interior podemos encontrar gran variedad de proteínas como enzimas, transductores de señales, proteínas estructurales, proteínas involucradas en la formación de vesículas como ESCRT o ácidos nucleicos. Adaptado y modificado de Colombo y col. (2014).

#### 4.2.3. Exosomas como mediadores de la respuesta inmunitaria

El papel de los exosomas en la respuesta inmunitaria se ha abordado en los últimos años con gran interés (Greening y col., 2015; Hwang, 2013; Shenoda y Ajit, 2016). Estas microvesículas juegan un papel importante en la presentación antigénica, ya que pueden contener complejos MHC tanto de tipo I como de tipo II cargados con el antígeno, que pueden ser reconocidos por linfocitos T CD8+ o CD4+, respectivamente. El reconocimiento del antígeno induciría la activación de los linfocitos desencadenando la respuesta inmunitaria. La presentación antigénica mediada por exosomas puede ser

directa o indirecta en función de dónde tenga lugar el reconocimiento del antígeno por el linfocito T (Esquema 6) (Chaput y Thery, 2011).



**Esquema 6: Representación de las diferentes vías de presentación antigénica mediada por exosomas.** Los exosomas cargados con el complejo MHC-antígeno procedentes de células presentadoras de antígenos pueden ser reconocidos directamente por células efectoras (parte izquierda) o pueden ser captados por otras células presentadoras de antígenos, que expondrán el antígeno en su superficie, donde será reconocido por las células efectoras (parte derecha). Adaptado de Chaput y Thery (2011).

En referencia a la vía indirecta de presentación, las células presentadoras de antígenos pueden producir exosomas con complejos MHC-antígeno. Los exosomas liberados al espacio extracelular pueden ser captados por otras células presentadoras de antígenos, como células dendríticas. Estas células recibirían los exosomas y, a continuación, presentarían sobre su superficie celular el antígeno para ser reconocido por linfocitos T o por linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos. Por otro lado, la vía directa de presentación mediada por exosomas se basa en la secreción de exosomas cargados con el complejo MHC-antígeno por células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T interaccionarían con los exosomas circulantes, reconociendo dicho complejo sobre el propio exosoma.

Los exosomas pueden tener otras funciones relacionadas con la respuesta inmunológica en función del tipo celular que los secrete. Se ha descrito que los exosomas provenientes de linfocitos B son capaces de inducir respuestas inmunitarias adaptativas. Las microvesículas secretadas por estas

células pueden contener el complejo MHC-antígeno, capaz de estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Muntasell y col., 2007). Los exosomas provenientes de macrófagos, en cambio, parecen estar involucrados en procesos de arterioesclerosis (Truman y col., 2012). Además, en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (Bhatnagar y Schorey, 2007; Bhatnagar y col., 2007), se ha demostrado que los exosomas provenientes de macrófagos cultivados con bacterias o infectados con patógenos intracelulares son capaces de estimular macrófagos y neutrófilos para producir mediadores proinflamatorios. La inhibición de la respuesta inmune suele estar producida por exosomas procedentes de células tumorales. Por ejemplo, en estudios *in vitro* (Huber y col., 2005; Clayton y col., 2007) se ha constatado una disminución de proliferación de linfocitos T cuando se cultivaban en presencia de exosomas procedentes de células tumorales.

#### 4.2.4. Implicación de los exosomas en alergia

La comunicación intercelular mediada por exosomas es particularmente relevante en la respuesta alérgica. Se ha comprobado que estas estructuras pueden potenciar la activación de células del sistema inmune: exosomas con antígenos procedentes del epitelio del timo pueden promover la maduración de células T reguladoras (Skogberg y col., 2015), exosomas procedentes de células dendríticas pueden estimular a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Thery y col., 2002a) o, exosomas procedentes de mastocitos favorecen la maduración de células dendríticas (Skokos y col., 2003).

Los exosomas pueden participar actuando como estructuras presentadoras de antígenos, uniéndose a los TCR específicos del complejo MHC-antígeno para promover la activación del linfocito T. Uno de los primeros estudios en este campo, en relación con la presentación de alérgenos, fue realizado por (Admyre y col., 2007a). En este trabajo analizaron la presentación de péptidos alérgicos Bet v1 (alérgeno del abedul común) por medio de exosomas derivados de linfocitos B. Estos exosomas promovían la proliferación de los linfocitos T aumentando la producción de citoquinas e interleuquinas. En

otro estudio llevado a cabo a partir de exosomas procedentes de células dendríticas se ha observado que los exosomas pueden presentar alérgenos presentes en el aire, como Fel d1 (principal alérgeno de gato), a linfocitos T y aumentar la producción de citoquinas (Vallhov y col., 2015). Además, en estudios con exosomas procedentes de la mucosa de pacientes con rinitis alérgica atípica se ha comprobado la presencia de alérgenos como el del polvo (Der p1) o la enterotoxina B del *Staphylococcus* en su interior (Qiu y col., 2011). Estos exosomas, además, son capaces de inducir la diferenciación de linfocitos T CD3<sup>+</sup> hacia CD8<sup>+</sup>. En el caso de las alergias alimentarias, los exosomas liberados por el epitelio intestinal pueden contener pequeños péptidos que actuarían como antígenos. Estos exosomas se podrían dirigir hacia las células inmunes localizadas en el intestino para desarrollar la respuesta alérgica (Mallegol y col., 2007).

Los exosomas pueden también inhibir la respuesta alérgica. En estudios realizados en ratones sensibilizados al alérgeno del olivo (Ole e1) a los que se les administró exosomas provenientes de ratones tolerantes al alérgeno, se ha observado un efecto inhibitorio de la respuesta mediada por IgE, de la producción de citoquinas y de la inflamación de las vías respiratorias (Prado y col., 2008). El efecto inhibitorio de la respuesta alérgica podría ser importante para la elaboración de vacunas que eviten las reacciones adversas a medicamentos.



# II. Justificación e hipótesis





El uso extensivo de algunos fármacos está provocando un aumento en la frecuencia de reacciones adversas que desencadenan. En el caso de las reacciones alérgicas, se considera que los fármacos de bajo peso molecular requerirían de su unión con moléculas más grandes para inducir la reacción alérgica.

En el organismo, tras la administración de un fármaco, las células más expuestas a este agente externo pueden incorporarlo en su forma libre o acompañado con las proteínas circulantes. Una vez incorporado, ese fármaco podría modificar proteínas intracelulares mediante uniones selectivas de diferente naturaleza. La modificación postraduccional llevada a cabo por fármacos tendría lugar en diferentes compartimentos celulares. La posible modificación de proteínas en los diferentes compartimentos podría dirigir estas proteínas a un destino diferente y determinar interacciones entre células adyacentes y/o distales.

Nuestra hipótesis plantea que la identificación de proteínas hapténizadas y el estudio de su destino podrán proporcionar información sobre nuevas estructuras implicadas en la respuesta alérgica a fármacos y nuevos mecanismos en los que se podría actuar para el desarrollo de procedimientos diagnósticos y nuevas moléculas o terapias que prevengan estas reacciones adversas.

Este conocimiento, en el sentido amplio de la palabra, contribuirá a dilucidar algunos de los aspectos del proceso de hapténización, como la naturaleza del fármaco o los metabolitos implicados, el sitio de unión a las proteínas, el procesamiento del complejo formado y, por último, su función en las células efectoras de la respuesta final.



# III. Objetivos



La familia de fármacos que más frecuentemente produce reacciones alérgicas es la de los antibióticos betalactámicos. Actualmente, se desconoce el proceso por el que estas moléculas son capaces de iniciar el proceso alérgico. En general, se considera que las moléculas de los fármacos no alcanzan el tamaño suficiente para desencadenar la respuesta inmune. Por ello, deberían unirse a proteínas, haptinizándolas. En uno de los escenarios posibles, las proteínas haptinizadas podrían ser procesadas en el interior celular, y los péptidos modificados por el fármaco o por sus metabolitos reactivos presentados en moléculas principales de histocompatibilidad. Con estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

- I. Identificación de dianas celulares de haptización por antibióticos betalactámicos.
- II. Estudio de las vías celulares de procesamiento de las proteínas haptinizadas.
- III. Estudio de haptización proteica por otros fármacos relevantes en el desarrollo de reacciones adversas y alérgicas.
- IV. Caracterización de la formación de aductos entre fármacos y proteínas con un estudio detallado de las dianas de mayor interés.



# IV. Material y Métodos





## **1. MATERIAL**

### **1.1. Medios y material para cultivos**

Los medios de cultivo celular DMEM, RPMI1640, el medio Optimem usado para las transfecciones de plásmidos, la penicilina/estreptomicina, la tripsina-EDTA y el suero fetal de ternera fueron suministrados por Gibco (Life Technologies). El suero fetal bovino (FBS) fue adquirido a Sigma y a PAA Laboratories. El material de plástico utilizado para los cultivos celulares fue obtenido de Falcon (Corning). Las placas p35 con base de vidrio utilizadas para experimentos de microscopía confocal fueron obtenidas de MatTek Corp.

### **1.2. Reactivos para electroforesis**

El Tris procedió de Merck. La acrilamida, la N, N'-metilen-bis-acrilamida, el persulfato amónico (APS), la N, N, N', N'-tetrametilendiamida (TEMED), la glicina y el dodecilsulfato sódico (SDS) utilizados para la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y el Sypro-Ruby utilizado para la tinción de proteínas en los geles fueron suministrados por Bio-Rad.

### **1.3. Anticuerpos**

#### **1.3.1. Anticuerpos para Western blot**

Los anticuerpos primarios utilizados frente a ICAM-1 (sc-7891),  $\alpha$ -enolasa (sc-100812), EF-2 (sc-25634), laminas A/C (sc-7292), ubiquitina (sc-9133) y frente a RhoGDI (sc-360) fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo frente a penicilina fue adquirido a AbDSerotec. Los anticuerpos frente a  $\beta$ -actina (A2066), a  $\beta$ -tubulina (T8328) y frente a HSP70 (H5147) procedieron de Sigma. El anticuerpo frente a acetil-lisina (9441) fue obtenido de Cell Signaling Technology. El anticuerpo frente a amoxicilina (AO3.2) fue desarrollado por la Dra. Cristobalina Mayorga (Mayorga y col., 1995).

Los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la peroxidasa de rábano (anticuerpo frente a inmunoglobulinas de conejo (P0448) y anticuerpo frente a inmunoglobulinas de ratón (P0260)) fueron de Dako. La estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Estrep-HRP) usada para reconocer biotina y el reactivo usado para producir quimioluminiscencia (ECL) procedieron de GE Healthcare.

### 1.3.2. Anticuerpos y reactivos para inmunofluorescencia

Para la detección de proteínas por inmunofluorescencia en células se utilizaron anticuerpos frente a LAMP-1 (sc-20011), RhoGDI (sc-360), ubiquitina (sc-9133) y frente a CD-63 (sc-271900) de Santa Cruz. El 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) fue de Sigma. Los anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de ratón acoplados a Alexa Flúor 568, Alexa Flúor 488 o Alexa Flúor 647 fueron suministrados por Invitrogen. El isotiocianato de fluoresceína (FITC), la estreptavidina acoplada a Alexa Flúor 488 (Estrep-A488) y la estreptavidina acoplada a Texas Red (Estrep-TXR) procedieron de Molecular Probes. El "Lysotracker Red" (LTR) fue obtenido de Life Technologies.

### 1.4. Otros reactivos

El agua utilizada para la preparación de tampones, soluciones o reactivos fue de calidad Milli-Q, purificada en un sistema de Millipore. El detergente CHAPS fue suministrado por Fluka. El N-benziloxycarbonil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal (ZLLL), el inhibidor no competitivo de la esfingomielinasa neutra (GW4869), C6-ceramida, dihidro-C6-ceramida, la penicilina G, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el ácido acetilsalicílico procedieron de Sigma. Para la cuantificación de proteínas de lisado celular se usó el reactivo BCA (Pierce) y para la cuantificación de proteínas en las fracciones de microvesículas o de la fracción de proteínas solubles del medio condicionado se usó el reactivo Bradford (Bio-Rad). La albúmina sérica bovina biotinilada (BSA-B) fue suministrada por Pierce. La resina conjugada con moléculas de Neutravidina

utilizada para la purificación de proteínas con biotina y el reactivo sulfo-NHS-acetato (SNA) procedieron de Thermo Fisher. La  $\alpha$ -enolasa recombinante (P06733) fue de Acris (AR09287PU-N). La amoxicilina (AX), Clamoxyl®, se obtuvo de GlaxoSmithkline. La amoxicilina biotinilada (AX-B) fue sintetizada en el grupo del Dr. Ezequiel Pérez Inestrosa del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga (Ariza y col., 2014).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Modificación de $\alpha$ -enolasa recombinante *in vitro*

#### 2.1.1. Haptenización de $\alpha$ -enolasa por betalactámicos *in vitro*

La proteína  $\alpha$ -enolasa recombinante, a una concentración de 2,12  $\mu$ M, se incubó con diferentes concentraciones de fármacos en PBS durante 1 hora a 37°C. En los experimentos de competición, la proteína se incubó previamente con diferentes sustratos, cofactores o fármacos a las concentraciones y tiempos indicados en cada caso. Para estimar el grado de modificación de esta proteína por AX-B se elaboró una curva patrón utilizando cantidades crecientes de BSA-B, expresadas en picomoles de biotina. La proteína recombinante, una vez incubada en las condiciones descritas, y las muestras de la curva patrón se cargaron en geles de poliacrilamida y se realizó SDS-PAGE, como se describe a continuación. Mediante cuantificación de la señal obtenida por incubación de la membrana con Estrep-HRP tanto de la curva patrón como de la proteína recombinante, se estimó la cantidad de picomoles de biotina asociados a la  $\alpha$ -enolasa en función de la cantidad de esta proteína en la reacción.

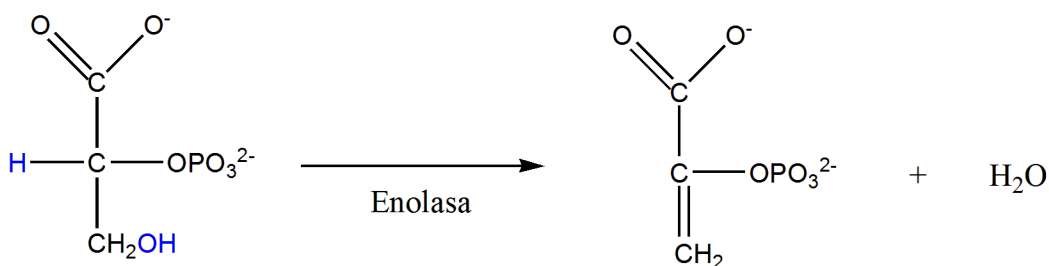
#### 2.1.2. Acetilación de $\alpha$ -enolasa *in vitro*

La  $\alpha$ -enolasa se incubó a una concentración de 2,12  $\mu$ M en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de sulfo-NHS-acetato (SNA). Para detener la reacción se añadió Tris a la reacción en cantidades equivalentes a las de SNA. La acetilación por ácido

acetilsalicílico se llevó a cabo incubando la proteína (2,12  $\mu\text{M}$ ) a 37°C durante 1 hora en PBS. Tras las incubaciones, la modificación en la proteína se estudió mediante electroforesis monodimensional o electroforesis bidimensional seguida de incubación con anticuerpo frente a acetil-lisina y detección por ECL.

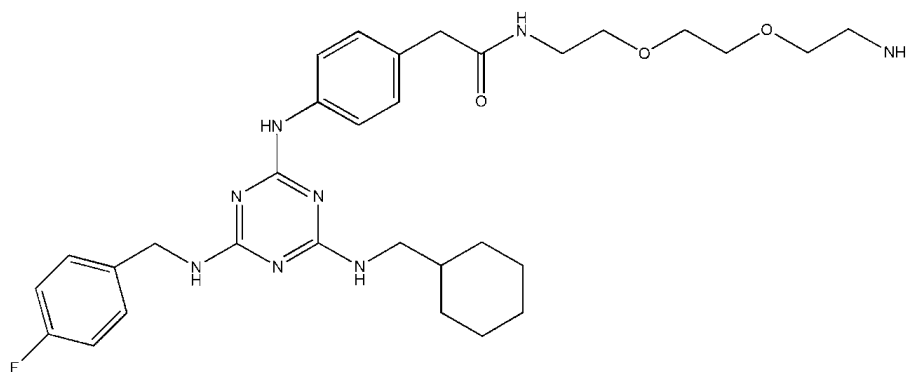
## 2.2. Ensayos de la actividad enzimática

La  $\alpha$ -enolasa es una enzima glucolítica que cataliza la reacción del 2-fosfoglicerato con formación de fosfoenolpiruvato (Esquema 7), que presenta un espectro característico de absorción con un máximo a 220 nm.



**Esquema 7: Reacción enzimática llevada a cabo por la  $\alpha$ -enolasa durante la glucólisis.** El 2-fosfoglicerato pierde una molécula de agua por la acción enzimática de la  $\alpha$ -enolasa, transformándose en fosfoenolpiruvato.

Para medir la actividad enzimática de la proteína control o modificada con AX o AX-B se puso a punto un método basado en la monitorización de la generación del fosfoenolpiruvato (PEP) en 1 ml de tampón de reacción (Tris 50 mM pH 7, KCl 12,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, 2-PGA 2,5 mM y  $\alpha$ -enolasa 21,2 nM) como el incremento de la absorción a una longitud de onda de 220 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro (Amersham Biosciences) (Baranowski y Wolna, 1975). Se estimó la actividad enzimática como moles de PEP/mg de proteína/unidad de tiempo durante los primeros 90 segundos de la reacción. Como control positivo de la inhibición de la actividad enzimática se utilizó un inhibidor específico de esta enzima: el compuesto AP-III-a4, ENOBlock (Selleckchem) (Esquema 8).



**Esquema 8: Estructura química del AP-III-a4.**

### 2.3. Cultivos celulares

La línea de linfocitos B de sangre periférica de linfoma B humano RPMI8866 procedió de Sigma. Las células endoteliales de aorta bovina (BAEC) fueron suministradas por Lonza. Las células endoteliales de cáncer de mama (MCF-7) y los macrófagos murinos procedentes de tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson, RAW 264.7, se obtuvieron de la “American Tissue Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA).

Las células BAEC, MCF-7 y RAW 264.7 se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C, en atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Los pases de estas células se realizaron mediante un procedimiento de tripsinización, posterior lavado mediante centrifugación y resuspensión en medio fresco.

Las células RPMI 8866 se cultivaron mediante dilución, manteniéndolas en un rango de 800000 – 1000000 células/ml, en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS (PAA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C y en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Los cambios de medio se realizaron mediante centrifugación y resuspensión.

## 2.4. Tratamientos celulares

Durante una semana antes de comenzar los tratamientos, las células se cultivaron en medio sin antibiótico para evitar la posible interferencia de la penicilina. Inmediatamente antes de los tratamientos con fármacos, para evitar la unión de los fármacos a proteínas mayoritarias presentes en el suero, el FBS del medio se eliminó mediante varios lavados de las células con medio de cultivo. Las células, sembradas en medio sin suero y sin antibióticos a una concentración de 2,66 millones de células por mililitro, fueron tratadas con AX a 2,5 mg/ml, o con varias concentraciones de AX-B o de penicilina G durante 16 horas. Para los tratamientos con diferentes reactivos se usaron las concentraciones y los tiempos que se indican en cada caso.

## 2.5. Obtención de lisados celulares

En primer lugar, las células se aislaron mediante centrifugación a 1000 x *g* durante 5 minutos. A continuación, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) y se resuspendieron en tampón de homogeneización compuesto por Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, SDS 0,5% (p/v); 2- $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM, inhibidores de proteasas (leupeptina, Pefabloc, aprotinina), fluoruro sódico (NaF) 50 mM y ortovanadato sódico 0,1 mM. Las células, resuspendidas en este tampón, se homogeneizaron mediante pases sucesivos a través de jeringuillas de 1 ml con aguja 26G x ½ ml de la casa comercial Becton Dickinson para forzar la lisis mecánica. Los lisados se centrifugaron a 15000 x *g* durante 15 minutos a 4° C, obteniendo en el sobrenadante el lisado celular final y descartando en el “pellet” restos celulares y orgánulos.

## 2.6. Fraccionamiento del medio condicionado

El medio de cultivo condicionado se sometió a fraccionamiento por centrifugación diferencial. Los restos celulares se obtuvieron mediante centrifugación a 15000 x *g* durante 20 minutos a 4°C, a esta fracción se la

denominó “fracción de membrana”. El sobrenadante resultante se sometió a ultracentrifugación en un rotor de ángulo fijo TLA 100.2 (Beckman), en una centrífuga Beckman Coulter Optima™ max, o en un rotor 70.1 Ti (Beckman), en una centrífuga Beckman Coulter Optima™ L-100 XP a 200000 x g durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante se consideró como proteína soluble en el medio extracelular (S100). El “pellet”, correspondiente a la denominada “fracción de vesículas extracelulares” (EV), se lavó una vez con PBS con el fin de reducir la contribución de proteína soluble en esta fracción.

## 2.7. Electroforesis en SDS-PAGE y Western blot

Para llevar a cabo la detección de proteínas modificadas por fármacos, las distintas fracciones obtenidas de los tipos celulares descritos se homogenizaron, se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C en buffer de Laemmli (Tris 80 mM pH 6,8; SDS al 2%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol) y se separaron en geles de poliacrilamida del 10%. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) en un sistema semiseco de transferencia (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 2% disuelta en TBS y Tween-20 al 0,05% (v/v) (T-TBS)). Para detectar la señal de biotina, la membrana se incubó con Estrep-HRP a una dilución 1:1000 durante 30 minutos. En otros casos, las membranas se incubaron también con diferentes anticuerpos que reconocían proteínas o características específicas de dichas proteínas. Los anticuerpos primarios se prepararon en diluciones entre 1:100 y 1:5000 y los secundarios a 1:2000, en una solución de 1% de albúmina sérica bovina (Sigma) en T-TBS. Para localizar las proteínas reconocidas por los anticuerpos o los complejos biotina-avidina, las membranas se incubaron con los reactivos ECL. La detección de la señal se llevó a cabo mediante la exposición de películas fotosensibles (AGFA) a las membranas. Éstas, fueron escaneadas con un escáner Agfa. Los niveles de señal de las bandas de interés se estimaron

mediante análisis de imagen con el programa informático “Scion Image” de Scion Corporation.

## **2.8. Electroforesis bidimensional**

Las distintas fracciones o proteínas recombinantes se sometieron a electroforesis bidimensional basada en isoelectroenfoque, separando las proteínas en primer lugar por su punto isoeléctrico y, a continuación, por peso molecular.

Antes de la electroforesis bidimensional, las proteínas se precipitaron por diversos métodos con el objetivo de eliminar sales u otras sustancias que pudiesen interferir en el isoelectroenfoque.

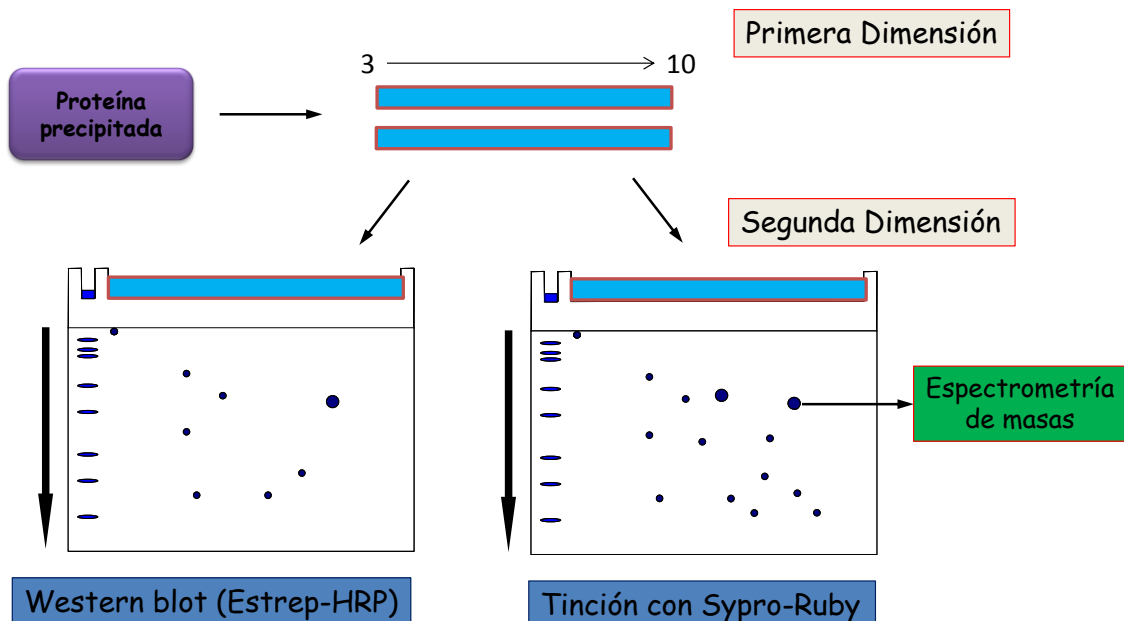
Para precipitar la proteína perteneciente a las fracciones de lisado celular o de proteína soluble del medio condicionado, se usó un protocolo basado en acetona (Jiang y col., 2004). Se precipitaron 200 µg de proteína del lisado o 1,8 ml de la fracción de proteína soluble con 3 volúmenes de acetona fría durante 16 horas a 4° C y en rotación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 15000 x *g* durante 30 minutos. Finalmente, se retiró toda la acetona posible y el sedimento resultante se dejó secar completamente.

En el caso de la proteína de la fracción de vesículas extracelulares o de la proteína recombinante se usó el método de metanol-cloroformo (Fic y col., 2010). Se precipitaron 4 µg de proteína recombinante o 60 µl de la fracción de vesículas extracelulares añadiendo dos volúmenes de cloroformo y cuatro volúmenes de metanol. La mezcla se agitó en “vortex” durante un minuto y se centrifugó a 9000 x *g* durante un minuto. Se descartó la fase acuosa y se añadieron 3 volúmenes de metanol. Nuevamente, la mezcla se agitó durante un minuto en “vortex” y se centrifugó a 9000 x *g* durante otro minuto. Finalmente, se retiró todo el sobrenadante posible y se dejó secar el sedimento completamente.

Las proteínas precipitadas provenientes de las fracciones celulares se resuspendieron en 278,4 µl de tampón de isoelectroenfoque (tiourea 2 M, urea



7 M, CHAPS 4%, DTT 100 mM, 0,75  $\mu$ l (0,5% v/v) de anfolitos (Biolyte, Bio-Rad), con un rango de punto isoeléctrico (pI) de 3 a 10, y 1  $\mu$ l (0,7% v/v) de azul de bromofenol) y se separaron en tiras de 7 cm y gradiente lineal de pH de 3 a 10 (Bio-Rad) para procesarlas por duplicado (Esquema 9). En el caso de la proteína recombinante precipitada se resuspendió en 139,2  $\mu$ l de tampón de isoelectroenfoque.



**Esquema 9: Esquema de la técnica de electroforesis bidimensional basada en isoelectroenfoque.** Una vez precipitada la muestra, las proteínas se separan en la primera dimensión según su punto isoeléctrico en tiras de gradiente continuo de pH de 3 a 10. Finalizado el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron en primer lugar con DTT y a continuación iodoacetamida para reducir y bloquear los puentes disulfuro, respectivamente. A continuación, las tiras se colocaron encima de los geles como se muestra en el esquema, donde se separaron según su tamaño en geles por duplicado, uno de ellos para Western blot usando Estrep-HRP y el otro para observar la proteína total del gel tiñendo con Sypro-Ruby. Las manchas con abundante señal de proteína que presentaban señal de biotina se digirieron con tripsina y se identificaron por espectrometría de masas.

Las tiras se colocaron en el equipo "Protean IEF Cell" (Bio-Rad), en el que se llevó a cabo el proceso de rehidratación a 50 V y a 50  $\mu$ A por tira a 20°C durante 12 horas. Posteriormente se sometieron a isoelectroenfoque según el siguiente programa: 1) 250 V durante 1 hora, 2) 500 V durante 1 hora, 3) 1000 V durante 1 hora, 4) 2000 V durante 1 hora, 5) 8000 V durante 1 hora y 6) 8000 V durante otra hora. Después, las tiras se incubaron durante 15 minutos a

temperatura ambiente en agitación con tampón de equilibrado (urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; y glicerol al 20%) en primer lugar con DTT 130 mM y, a continuación, en el mismo buffer con iodoacetamida 135 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación.

Una vez equilibradas, las dos tiras correspondientes a cada muestra se colocaron sobre geles de poliacrilamida del 10% para la separación de las proteínas en función de su tamaño. Uno de los geles se transfirió a una membrana Immobilon-P que se incubó en solución de bloqueo, y la presencia de aductos de AX-B o AX se detectó mediante incubación con Estrep-HRP (1:1000) o AO3.2 (1:100) respectivamente. Las incubaciones posteriores se realizaron con anticuerpos que reconocían las proteínas de interés.

El gel duplicado se fijó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas del gel se tiñeron mediante incubación con Sypro-Ruby (Bio-Rad) durante toda la noche en agitación y en oscuridad. A continuación, el gel se lavó con una solución de metanol al 10% y ácido acético al 4% durante 1 hora. El gel se escaneó con luz ultravioleta en un transiluminador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad) para obtener la señal de las proteínas presentes en el gel.

## **2.9. Espectrometría de masas**

Para identificar las proteínas, las manchas de interés se escindieron de los geles bidimensionales teñidos con Sypro-Ruby mediante EXQuest Cutter (Bio-Rad) para proceder a su digestión. En primer lugar, se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM pH 8 y seguidamente con acetonitrilo (ACN). Las proteínas se tripsinizaron durante 8 horas a 37°C con tripsina a 12,5 ng/μl en una solución de bicarbonato amónico 50 mM. Para la extracción de los péptidos resultantes se usó una solución de ACN al 100% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%. La solución resultante se evaporó mediante “speed-vacuum”, y los péptidos se resuspendieron en 6 μl de ACN al 30% y TFA al 0,5%. Las muestras se analizaron en el espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker-Daltonics). El análisis de los datos de la

relación masa/carga ( $m/z$ ) se realizó usando FlexAnalysis (Bruker-Daltonics) y los resultados se enfrentaron a la base de datos de proteínas SwissProt 2014\_03. La identificación de las proteínas se consideró significativa ( $p < 0,05$ ) cuando su puntuación fue superior a 59.

#### 2.9.1. Análisis de $\alpha$ -enolasa modificada por amoxicilina *in vitro* mediante MALDI-TOF

La determinación de la masa por espectrometría de masas basada en MALDI TOF se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, miembro del Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed-ISCI, usando un Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker-Daltonics). El espectro fue adquirido usando la potencia de un láser justo por encima del umbral de ionización. Las muestras se analizaron en el modo lineal de detección de iones positivos y de extracción retardada. Se realizó una calibración externa usando albúmina bovina (Sigma), cubriendo un rango de 15000 a 100000 Da. La solución matriz de 2,5-dihidroxi-acetofenona (2,5-DHAP) se preparó disolviendo 7,6 mg (50  $\mu$ moles) en 375  $\mu$ l de etanol, a la que se le añadieron 125  $\mu$ l de citrato de hidrógeno diamónico 80 mM en solución acuosa. Para la preparación de la muestra, se diluyeron 2  $\mu$ l de muestra con 2  $\mu$ l de ácido trifluoroacético al 2% en solución acuosa, y 2  $\mu$ l de solución matriz. Se colocó un volumen de 1  $\mu$ l de esta mezcla en el AnchorChip de 800  $\mu$ m (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se enfrentaron a la base de datos de proteínas SwissProt 2014\_03.

#### 2.9.2. Análisis de $\alpha$ -enolasa modificada por amoxicilina *in vitro* mediante ESI-MS

Los experimentos descritos en este apartado y el siguiente fueron realizados en el laboratorio del profesor Giancarlo Aldini del Departamento de Ciencias Farmacéuticas “Pietro Pratesi” de la “Università degli Studi di Milano” (Italia), donde se llevó a cabo el análisis de las muestras en un espectrómetro

de masas con trampa iónica lineal LTQ Orbitrap™ XL (ThermoFisher Scientific) equipado con una fuente de ionización por electrospray (Finnigan Ion Max).

La proteína  $\alpha$ -enolasa recombinante se incubó a una concentración final de 2,12  $\mu$ M con amoxicilina a 21,2  $\mu$ M durante 3 horas a 37°C. Se tomaron 3 alícuotas de las diferentes muestras de  $\alpha$ -enolasa incubada con amoxicilina a tiempo cero y después de 3 horas, y se filtraron y desalaron por separado en unidades de filtración YM-30 con un tamaño de poro de 30 kDa (Microcon Centrifugal Filter Devices, Millipore) como se describe a continuación. En primer lugar, se equilibraron los filtros con H<sub>2</sub>O Milli-Q centrifugando durante 6 minutos a 12500 rpm. Se cargaron las muestras y se centrifugaron a 12500 rpm durante 6 minutos. A continuación, las alícuotas se lavaron sucesivamente para eliminar las posibles interacciones no covalentes entre la proteína y el fármaco: la primera alícuota se lavó 4 veces con 0,3 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q, la segunda alícuota se lavó dos veces con 0,3 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q y dos veces con 0,3 ml de etanol en solución acuosa en una proporción H<sub>2</sub>O:EtOH 1:1 (v/v), y la tercera alícuota se lavó cuatro veces con 0,3 ml de etanol en solución acuosa en una proporción H<sub>2</sub>O:EtOH 1:1 (v/v). Los lavados se realizaron centrifugando las muestras a 12500 rpm hasta tener finalmente un volumen de muestra de 50  $\mu$ l. Las columnas de filtración se invirtieron sobre un nuevo tubo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos para recuperar las muestras concentradas. Las muestras (96  $\mu$ g de proteína) se diluyeron en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 200  $\mu$ l de ACN/H<sub>2</sub>O/Ácido fórmico (60:40:0,4 v/v/v) y se inyectaron en el espectrómetro de masas con una velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min. Como calibración interna, se usó una lista de 20 contaminantes plásticos comunes que se detectan como señal de fondo en el análisis por ESI-MS. Los resultados obtenidos se enfrentaron a la base de datos de SEQUEST.

### 2.9.3. Identificación de residuos de $\alpha$ -enolasa modificados *in vitro* por amoxicilina mediante LC-ESI-MS/MS

La  $\alpha$ -enolasa se incubó a una concentración final de 2,12  $\mu$ M con amoxicilina a 2,12 mM durante toda la noche a 37°C. Tras la incubación la

proteína se sometió a electroforesis en SDS-PAGE. Se extrajo la proteína del gel y se obtuvieron los péptidos resultantes de la digestión con tripsina/quimotripsina. Antes de cargar las muestras en el sistema de cromatografía líquida se añadió ácido fórmico a la mezcla de péptidos hasta una concentración final del 10%. Un  $\mu\text{l}$  de muestra se inyectó en el sistema de nanocromatografía (UltiMate 3000 RSLCnano System, Dionex) y la mezcla peptídica se cargó en una columna de fase reversa (PicoFrit™ Column, Halo, C18, 2,7 microm 100 Å, 75 microm i.d. x 10 cm, New Objective). Los péptidos se eluyeron a una velocidad de flujo constante de 300 nl/min.

El sistema de cromatografía líquida estaba conectado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap™. La detección de los péptidos modificados por el fármaco y la detección de los sitios de modificación se realizó mediante un proceso compuesto de dos pasos: el primer paso consistió en el análisis del espectro de MS/MS registrado en el modo de fragmentación de iones mediante disociación por colisión de alta energía (HCD) con el fin de encontrar los iones diagnósticos de este ensayo; y el siguiente paso consistió en comparar los iones precursores con una lista teórica de iones modificados generados a partir de la digestión virtual de la  $\alpha$ -enolasa con tripsina/quimotripsina. Los resultados obtenidos se enfrentaron a la base de datos de SEQUEST.

## 2.10. Modelado molecular

La estructura de la  $\alpha$ -enolasa fue obtenida a partir del código 2PSN del Protein Data Bank (PDB) (Hyo y col., 2008). La estructura del cristal de la proteína se completó añadiendo hidrógenos polares mediante el programa informático AutoDock Tools 1.5.6 (Sanner, 1999). La estructura de la amoxicilina con su correspondiente geometría fue obtenida a partir de la base de datos de PubChem con código de acceso 33613. La interacción entre la amoxicilina y la  $\alpha$ -enolasa se modeló mediante el programa informático AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010) considerando un espacio de 24 Å de diámetro alrededor de la lisina 239. El cálculo con Vina generó 9 modelos de

interacción de la amoxicilina con la  $\alpha$ -enolasa alrededor de la lisina 239. Se consideraron aquellos con los niveles de energía de unión más negativos y la distancia más pequeña entre el grupo amino de la lisina y el grupo carbonilo del anillo betalactámico del fármaco. La representación final de la interacción se llevó a cabo mediante el programa informático PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.74 Schrödinger, LLC) (Schrodinger, 2015).

### **2.11. Inmunoprecipitación**

En primer lugar, el anticuerpo específico contra las proteínas de interés (2  $\mu$ g) se incubó con 50  $\mu$ l de resina conjugada con proteína G en tampón de homogeneizado 1 (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, SDS al 0,1% y NP-40 al 0,2%) durante 1 hora a 4°C en agitación. Tras la incubación, el anticuerpo no unido se eliminó mediante lavados de 5 minutos a 3000 x g y resuspensión en el mismo tampón. A continuación, la fracción S100 de medio condicionado se incubó con el conjugado de resina con proteína G y anticuerpo durante 1 hora a 4°C en agitación. La fracción de proteínas no retenidas (fracción no unida) se separó de la fracción unida mediante centrifugación. Finalmente, tras varios lavados con tampón de homogeneizado 2 (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, SDS al 0,5% y NP-40 al 1%) la fracción de proteína unida se eluyó con tampón Laemmli 2X a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas purificadas se analizaron mediante Western blot.

### **2.12. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad basada en avidina**

Las muestras de S100 del medio condicionado fueron sometidas a 10 centrifugaciones consecutivas a 2000 x g durante 9 minutos a 4°C en unidades de ultrafiltración Amicon de 10K (Millipore) diluyendo cada vez el concentrado en 4 ml de tampón de homogeneización 1 para eliminar el exceso de AX-B libre aún presente. Estas nuevas fracciones se denominaron S100-10K. Para el

enriquecimiento en avidina se usaron esferas de agarosa combinadas con Neutravidina (Thermo Fisher) que se habían equilibrado previamente en tampón de homogeneización 1. Las fracciones de interés se incubaron con la Neutravidina durante 3 horas a 4°C en rotación. Se recogió la fracción no unida de la purificación por centrifugación a 3000 x g durante 2 minutos. Las esferas de agarosa unidas a proteínas modificadas por AX-B fueron lavadas tres veces con tampón de homogeneización 2 mediante centrifugación. El sobrenadante del último lavado se recogió como control. A continuación, las proteínas se eluyeron con tampón Laemmli 2X hirviendo las muestras a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas de interés fueron analizadas posteriormente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot.

### 2.13. Microscopía confocal

#### 2.13.1. Detección de AX-B en el interior de varios tipos celulares

Los diferentes tipos celulares se sembraron independientemente en placas p35 con fondo de cristal o en p12 con cubreobjetos de vidrio previamente depositados en el fondo de cada pocillo. Las células fueron tratadas con 0,5 mg/ml de AX-B durante 16 horas a 37°C en el medio correspondiente sin suero y sin antibióticos. Seguidamente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 30 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 20 minutos. Las células se incubaron con 1 µg/ml de Estrep-A488 durante 30 minutos y con DAPI a 3 µg/ml durante 20 minutos para marcar los núcleos. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS-SP2-AOBS del servicio de microscopía laser confocal y multidimensional *in vivo* del Centro de Investigaciones Biológicas, con un objetivo de 100 aumentos. Las secciones se obtuvieron cada 0,5 µm. En las figuras aparecen imágenes representativas de experimentos repetidos al menos tres veces. Las imágenes corresponden a un solo canal y a una sola sección del eje z, salvo que se indique lo contrario.

### 2.13.2. Internalización de vesículas extracelulares con AX-B en células BAEC

Las vesículas extracelulares utilizadas en este ensayo se obtuvieron a partir de células RPMI 8866 tratadas con AX-B (0,5 mg/ml) durante 16 horas. Tras este tiempo, se aislaron, se resuspendieron en PBS y se tiñeron con FITC 100  $\mu$ M durante 1 hora a temperatura ambiente para conseguir un marcaje general de las vesículas, y con Estrep-TXR 1:200 durante 30 minutos a temperatura ambiente para marcar específicamente las proteínas biotiniladas presentes en las vesículas. Las EVs, una vez marcadas, fueron añadidas al medio de cultivo de las células BAEC sembradas en placas p35 con fondo de cristal. Tras 3 horas de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 20 minutos. Para delimitar el área de la célula, la proteína RhoGDI se detectó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico (1:1000) preparado en una solución de 1% BSA en PBS. La incorporación de las vesículas a las células fue analizada en el microscopio confocal como se detalla en el apartado anterior.

### 2.13.3. Estudio de diferentes vías de tráfico intracelular

Las células RAW 264.7 y las células RPMI 8866 se trataron durante 16 h a 37°C con AX-B (0,5 mg/ml) en el medio correspondiente sin suero y sin antibióticos junto con ZLLL 100 nM, cloroquina 10  $\mu$ M, C6-ceramida 10  $\mu$ M, dihidro-C6-ceramida 10  $\mu$ M o GW4869 2  $\mu$ M. Tras el tratamiento, las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C con LTR 0,5  $\mu$ M para teñir compartimentos ácidos (endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares y lisosomas, a los que en conjunto nos referiremos como lisosomas para simplificar). Las células se fijaron como se describe anteriormente, y fueron incubadas con Estrep-A488, anticuerpo frente a ubiquitina o anticuerpo frente a CD63. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal como se ha descrito en el apartado 2.13.1.



### 2.14. Microscopía electrónica

Las EVs, obtenidas del tratamiento de células RPMI 8866 con AX-B (0,5 mg/ml) como se describe en el apartado 2.6, fueron analizadas mediante microscopía electrónica (They y col., 2006). Las vesículas se incubaron con partículas de oro conjugadas con estreptavidina para detectar la AX-B asociada y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos a 37°C. Una alícuota de 5 µl de esta preparación se depositó sobre gradillas de Formvar-carbono para microscopía electrónica y se dejó secar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las rejillas se lavaron con una gota de 100 µl de PBS y se transfirieron a una gota de 50 µl de glutaraldehído al 1% durante 5 minutos. Las rejillas se lavaron mediante contacto con gotas de 100 µl de agua destilada durante 2 minutos y este paso se repitió ocho veces. Para contrastar, las rejillas se incubaron durante 5 minutos en una gota de 50 µl de una solución de oxalato de uranilo a pH 7. Las rejillas se transfirieron a una gota de 50 µl de metil celulosa durante 10 minutos en hielo. Finalmente, se dejaron secar entre 5 y 10 minutos a temperatura ambiente.

Las vesículas con partículas de oro fueron observadas en un microscopio electrónico JEOL 1230 a 100 kV, del servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40000x.

### 2.15. Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado al menos tres veces. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar estadístico. Los estudios comparativos entre variables cuantitativas que seguían una distribución normal se valoraron mediante el test *t de Student* para muestras pareadas o no pareadas según el experimento. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se realizó usando el programa informático GraphPad Prism 6.



# V. Resultados



## 1. HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS RPMI 8866

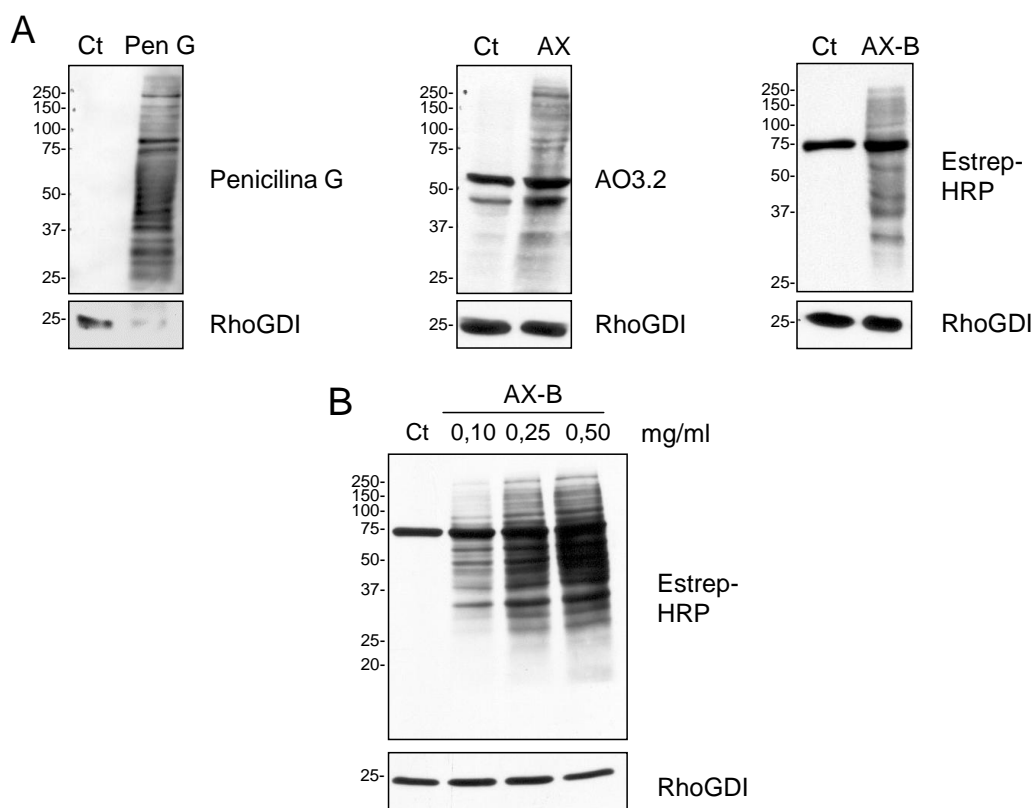
La haptización de proteínas por fármacos se ha considerado como una de las principales hipótesis que explican el desarrollo de efectos adversos de medicamentos (Zhou y col., 2005; Yang y col., 2006; Hinson y col., 1995). Según esta hipótesis, el fármaco o sus metabolitos deberían unirse a proteínas covalentemente (Castillo y col., 1995; Jenkins y col., 2009), formando el aducto proteína-fármaco que sería capaz de activar el sistema inmune. Comúnmente, la respuesta alérgica es uno de los principales efectos adversos a fármacos. Uno de los compuestos que más reacciones alérgicas produce, perteneciente al grupo de fármacos betaláctamicos, es la amoxicilina (Doña y col., 2012).

En nuestro grupo de laboratorio se ha llevado a cabo previamente la identificación de proteínas de suero humano que resultaban haptizadas por amoxicilina *in vitro* (Ariza y col., 2012). La principal diana identificada fue la albúmina. Aunque la información sobre la modificación de proteínas séricas por amoxicilina es relativamente abundante (Ariza y col., 2012; Ariza y col., 2014; Garzon y col., 2014; Meng y col., 2016; Ariza y col., 2015), al comenzar estos estudios, no se conocía qué proteínas intracelulares se haptizan por amoxicilina. Los fármacos o sus metabolitos pueden interactuar con numerosos tipos celulares a lo largo de sus vías de administración o distribución en el organismo. Por ello, la modificación de proteínas intracelulares por fármacos podría desempeñar un papel importante en los mecanismos de toxicidad de fármacos en general y, en particular en las reacciones alérgicas. El inicio de estas reacciones se produciría mediante la exposición del antígeno (proteína o péptido haptizado). Por ello, nos planteamos la identificación y confirmación de dianas celulares de amoxicilina.

### 1.1. Selectividad de la unión de betaláctamicos a proteínas intracelulares

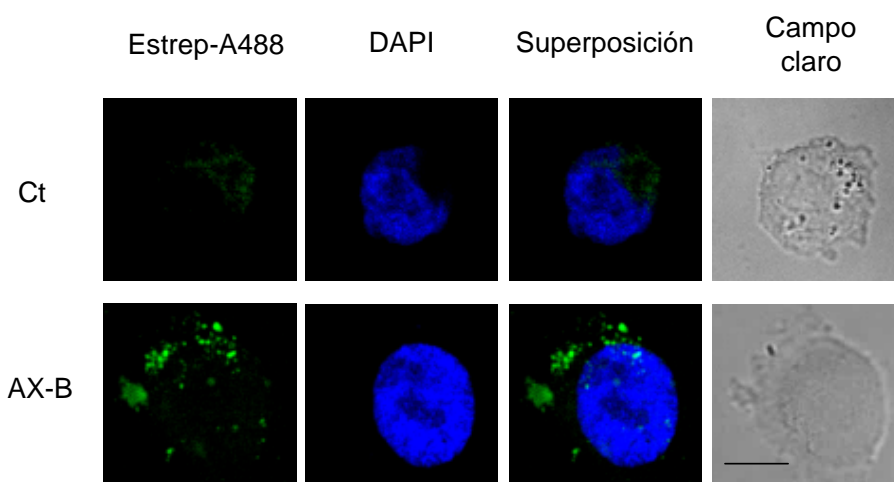
Con el objetivo de identificar proteínas intracelulares modificadas por betaláctamicos incubamos linfocitos B, tipo celular relacionado con el proceso de respuesta inmune y respuesta alérgica, con diferentes antibióticos. La

incubación de estas células con penicilina G (10 mg/ml), amoxicilina (AX, a 2,5 mg/ml) o con el análogo biotinilado de ésta (AX-B, a 0,5 mg/ml), produjo patrones variados de proteínas haptenizadas, según se aprecia en la electroforesis monodimensional (Figura 1A). Las bandas que aparecen en el control de los experimentos con AX o con AX-B corresponden a señal no específica del anticuerpo o a proteínas biotiniladas endógenas (Praul y col., 1998), respectivamente. Además, el uso de la AX-B, permitió una mejor detección de los aductos de amoxicilina gracias a la mayor sensibilidad de esta herramienta. De hecho, la concentración de AX-B necesaria para detectar los aductos de amoxicilina se puede reducir al menos hasta 0,1 mg/ml, que ya es próxima a la que se alcanza en regímenes terapéuticos (Akimoto y col., 1982; Witkowski y col., 1982), sin que se aprecie una alteración del patrón de proteínas modificadas (Figura 1B).



**Figura 1: Modificación de proteínas por antibióticos betalactámicos en linfocitos B.** Los linfocitos B RPMI 8866 se trataron durante 16 horas con penicilina G 10 mg/ml, con amoxicilina 2,5 mg/ml, o con AX-B 0,5 mg/ml (A) o a las concentraciones indicadas (B) en medio RPMI 1640 sin suero. Diez  $\mu$ g de proteína de lisado celular se cargaron en geles de poliacrilamida y la haptениzación de proteínas se analizó mediante Western blot detectando la señal de los antibióticos con los anticuerpos correspondientes o la señal de biotina con Estrep-HRP.

Estos resultados indican que la amoxicilina se une a proteínas celulares. Para confirmar la capacidad de la amoxicilina para entrar en el interior celular se llevaron a cabo experimentos de microscopía confocal (Figura 2). La incubación de linfocitos B con AX-B mostró un aspecto de localización particulada de la señal de biotina, posiblemente compatible con compartimentos vesiculares y/o con el procesamiento de las proteínas haptinizadas por este fármaco. También podría ser compatible con agregados de proteínas.



**Figura 2: Presencia de AX-B en el interior de linfocitos B.** Las células se incubaron con 0,5 mg/ml de AX-B en medio RPMI 1640 sin suero durante 16 horas. A continuación, las células se fijaron y se incubaron durante 30 minutos con estreptavidina acoplada a Alexa Fluor 488 (Estrep-A488). La señal correspondiente al ADN del núcleo se obtuvo mediante incubación con DAPI durante 15 minutos. Barra de escala: 10  $\mu$ m. En el control se observa señal verde correspondiente a las proteínas biotiniladas endógenas.

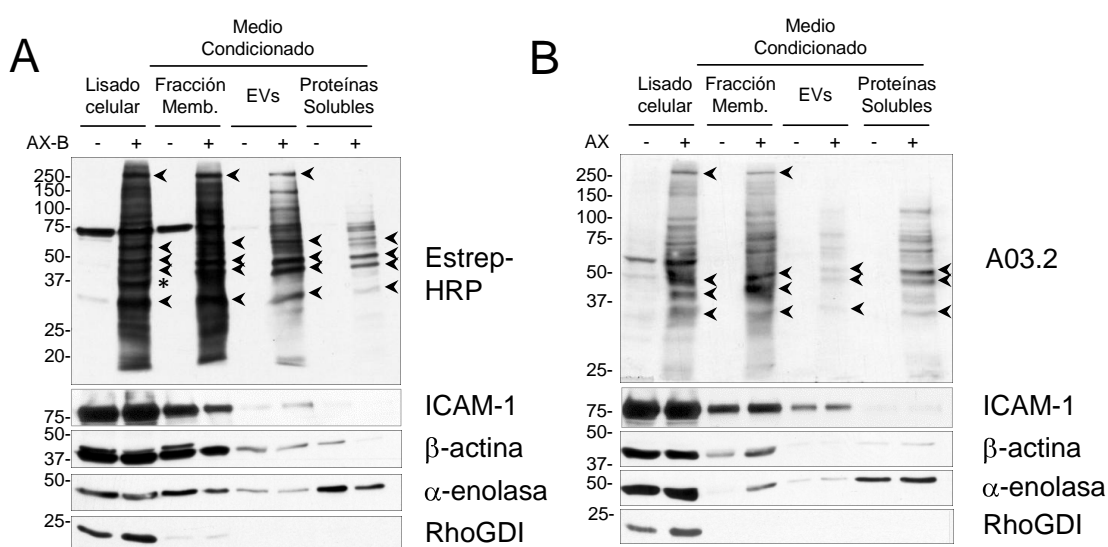
Ambas evidencias indican que los antibióticos no se unen de forma inespecífica a todas las proteínas celulares.

## 1.2. Detección de proteínas haptinizadas en linfocitos B

Con el fin de obtener una perspectiva más amplia de la modificación de proteínas intracelulares, analizamos diversas fracciones del cultivo de linfocitos B tratados con AX-B (0,5 mg/ml), incluyendo el medio condicionado, en el que se encuentran la fracción de restos celulares o “de membrana”, la fracción de vesículas extracelulares y la fracción de proteína soluble (Figura 3A). Detectamos un gran número de polipéptidos haptinizados por AX-B en todas

las fracciones. Muchos de ellos, marcados con flechas, se encontraban presentes en varias de las fracciones, mientras que otros, marcados con asteriscos, aparecían con mayor intensidad solo en algunas de ellas.

A su vez, realizamos el fraccionamiento de las células tratadas con AX (2,5 mg/ml) para confirmar el patrón obtenido con el análogo biotinilado (Figura 3B). En el análisis de electroforesis monodimensional observamos amplias similitudes con los patrones obtenidos en el tratamiento con AX-B. Además, como en el caso anterior, algunos polipéptidos están presentes en varias de las fracciones.



**Figura 3: Detección de proteínas haptizadas por amoxicilina en lisado celular y en el medio condicionado.** Las células se trataron con AX-B a 0,5 mg/ml (A) o AX a 2,5 mg/ml (B) durante 16 horas en medio RPMI 1640 sin suero. A continuación, se separaron las células del medio condicionado, que se sometió a centrifugaciones diferenciales para obtener la fracción de membranas, la fracción de vesículas extracelulares (EVs) y la fracción de proteínas solubles. El análisis de las proteínas modificadas se realizó mediante Western blot de todas las fracciones incubando las membranas con Estrep-HRP, con A03.2 para detectar la señal de amoxicilina o con anticuerpos frente a las proteínas indicadas como marcadores típicos de cada fracción. Algunas de las bandas presentes en todas las fracciones aparecen marcadas con puntas de flecha, mientras que bandas que muestran mayor intensidad en alguna fracción aparecen marcadas con asteriscos.

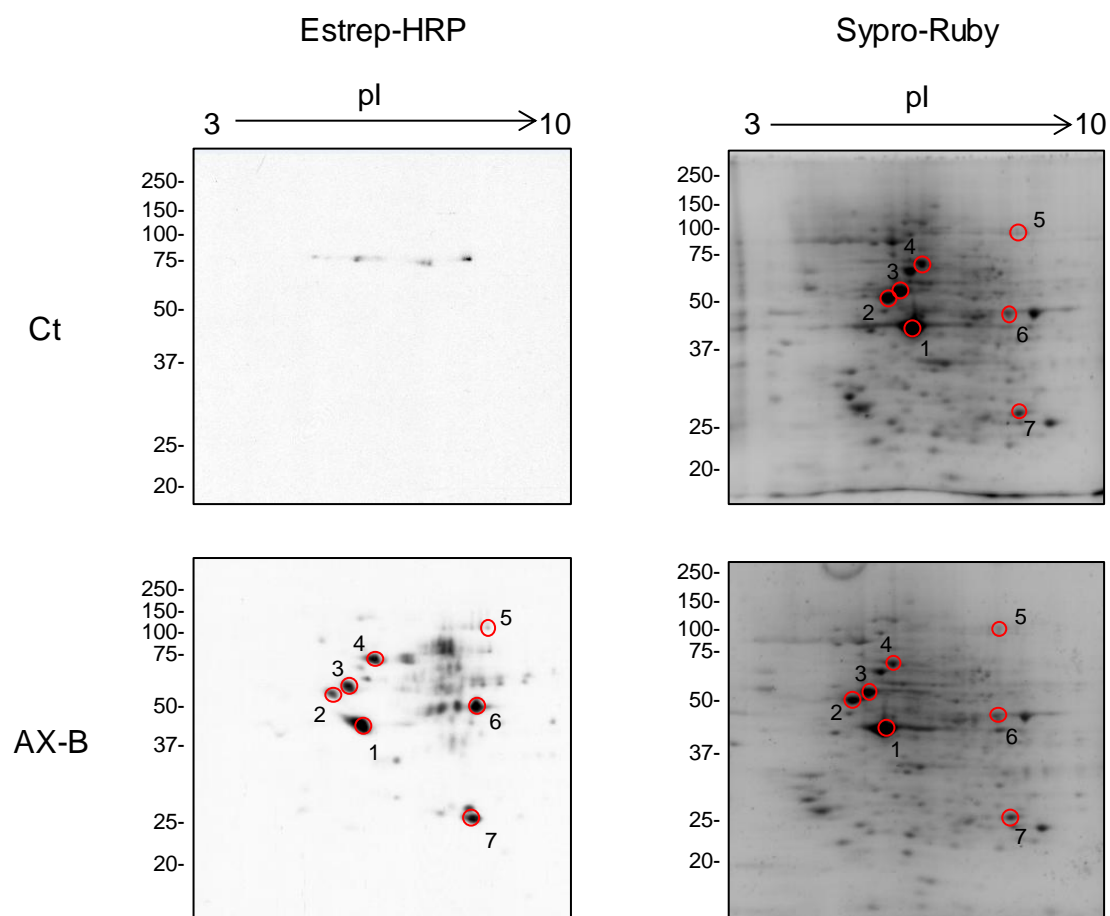
### 1.3. Identificación de proteínas haptizadas por amoxicilina en la fracción de proteínas solubles del medio condicionado

La presencia de proteínas haptizadas por amoxicilina en la fracción de proteínas solubles del medio condicionado resultaría de especial



importancia en procesos de comunicación intercelular. Las proteínas presentes en esta fracción, potencialmente secretadas por las células, serían reconocidas como antígenos por el sistema inmune y podrían provocar procesos inflamatorios o desencadenar la respuesta alérgica. Por este motivo, comenzamos a analizar la fracción de proteínas solubles del medio extracelular.

Para proceder a la identificación de las proteínas haptinizadas por amoxicilina, analizamos mediante electroforesis bidimensional la fracción de proteínas solubles del medio extracelular de células control y células tratadas con amoxicilina biotinilada (Figura 4).



**Figura 4: Detección de proteínas haptinizadas por amoxicilina biotinilada mediante electroforesis bidimensional de la fracción de proteínas solubles del medio condicionado.** La fracción de proteínas solubles del medio condicionado de células tratadas con 0,5 mg/ml AX-B se analizó por electroforesis bidimensional en geles procesados en paralelo. Uno de ellos se usó para Western blot con Estrep-HRP (paneles de la izquierda) y el gel duplicado se usó para tinción de proteína total con Sypro-Ruby (paneles de la derecha). Las manchas seleccionadas para la identificación por huella peptídica mediante MALDI-TOF MS se encuentran marcadas con un círculo rojo.

Obtuvimos un patrón complejo de proteínas con señal de biotina con manchas intensas, algunas de las cuales coincidían con la señal de proteína total obtenida mediante tinción con Sypro-Ruby. Las proteínas biotiniladas que aparecen en el control corresponden a las proteínas biotiniladas endógenas de las propias células (Praul y col., 1998). Además, se obtiene un patrón de proteína total reproducible, como se puede apreciar al comparar las dos tinciones con Sypro-Ruby.

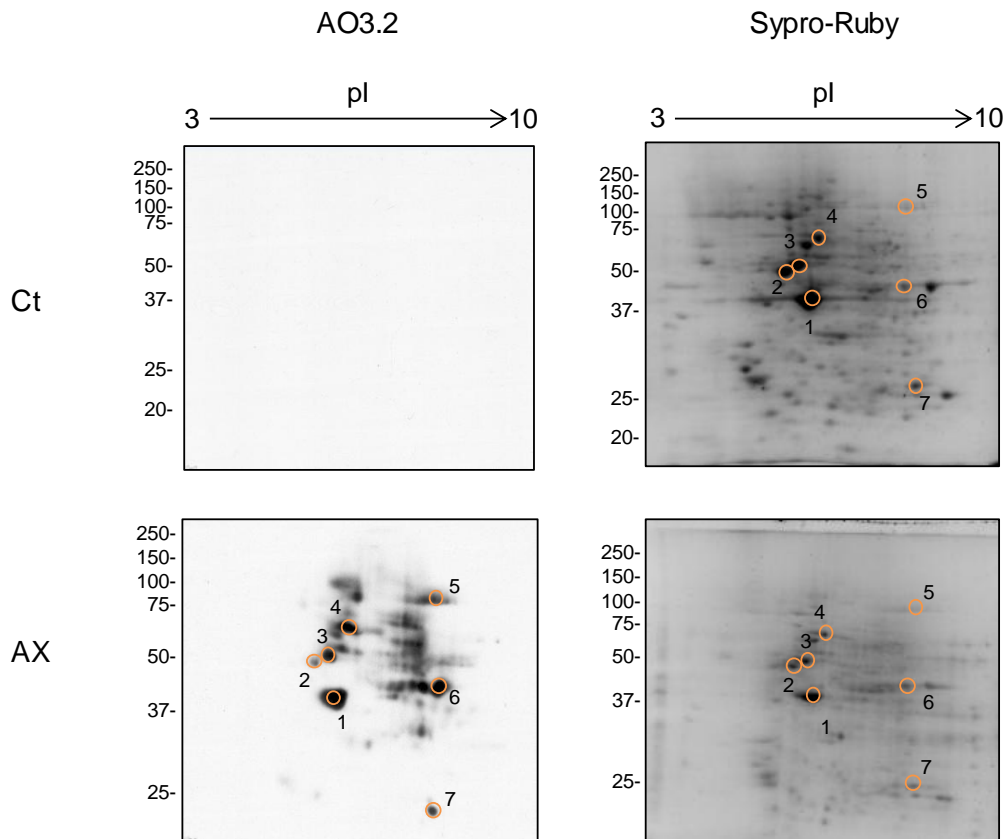
Del gel teñido con Sypro-Ruby escindimos 6 manchas que presentaban señal de biotina más intensa, marcadas con un círculo rojo en la Figura 4, para identificarlas mediante huella peptídica por MALDI-TOF MS (Tabla 4). Se identificaron proteínas estructurales como la  $\beta$ -actina y la  $\beta$ -tubulina, factores implicados en la síntesis de proteínas como el factor de elongación 2, enzimas metabólicas como la  $\alpha$ -enolasa, o chaperonas como HSP70.

Nº	Código de acceso	Proteína	Puntuación	Puntuación Límite	Peso molecular	Punto isoeléctrico
1	P60709	$\beta$ -actina ( <i>ACTB</i> )	351	59	40.536	5,55
2	P07437	$\beta$ -tubulina ( <i>TUBB</i> )	246	59	50.096	4,75
3	Q71U36	$\alpha$ -1A Tubulina ( <i>TBA1A</i> )	317	59	46.797	4,96
4	Q53GZ6	HSP70 ( <i>HSP70</i> )	157	59	71.083	5,28
5	P13639	EF-2 ( <i>EEF2</i> )	100	59	96.246	6,41
6	P06733	$\alpha$ -enolasa ( <i>ENOA</i> )	162	59	47.453	7,01
7	P49720	Subunidad $\beta$ del proteasoma ( <i>PSMB3</i> )	136	59	23.219	6,13

**Tabla 4: Identificación de proteínas modificadas por AX-B de la fracción de proteínas solubles del medio condicionado de linfocitos B tratados con 0,5 mg/ml AX-B.** En la tabla se incluye el número de la mancha correspondiente en el gel, el código de acceso de la proteína en UniProt, el nombre de la proteína junto con el nombre del gen, la puntuación obtenida en la identificación, la puntuación límite, es decir, a partir de la cual la identificación se considera significativa; el peso molecular expresado en daltons y el punto isoeléctrico.

La amoxicilina biotinilada es una herramienta de gran utilidad para la identificación de proteínas modificadas por este fármaco, sin embargo, este

compuesto no se usa en clínica. Para corroborar los resultados obtenidos con este compuesto, llevamos a cabo el mismo procedimiento utilizando amoxicilina y detectando las proteínas modificadas con el anticuerpo específico frente a este fármaco. En la Figura 5 se puede apreciar un patrón de proteínas modificadas que muestra claras similitudes con el obtenido con AX-B.

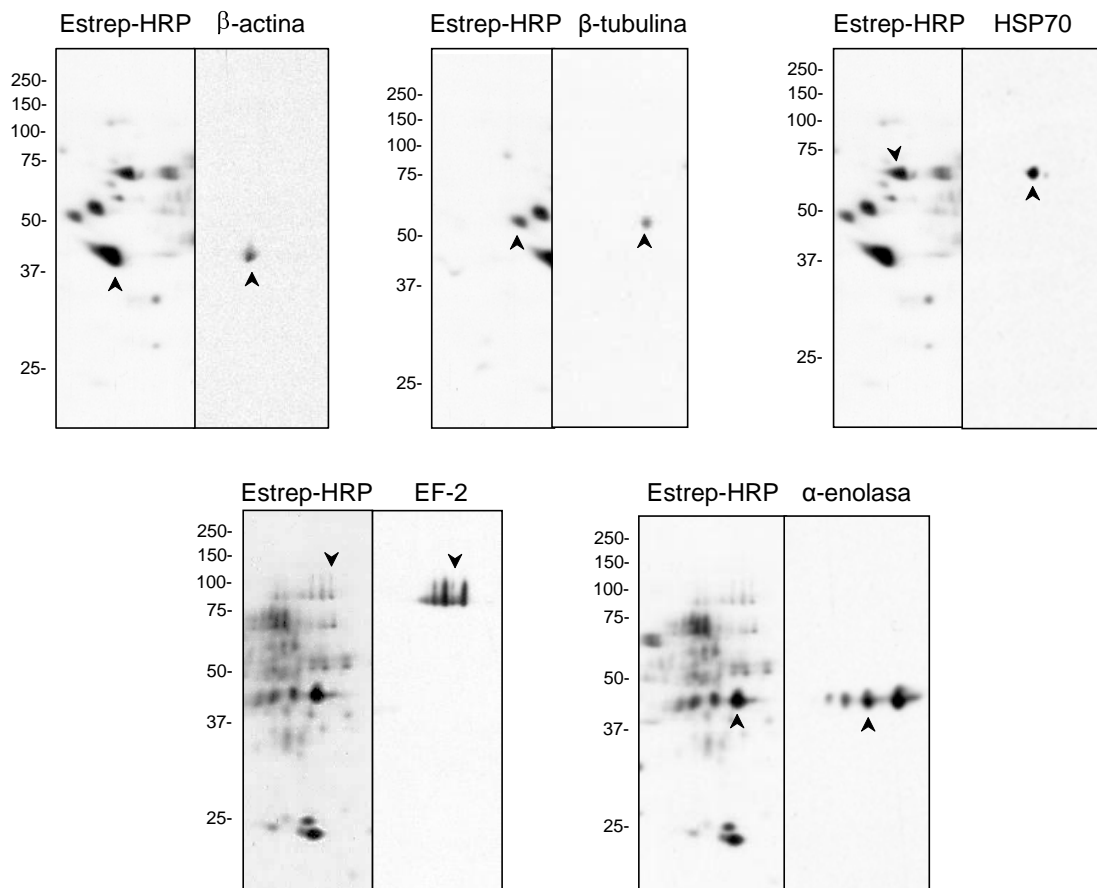


**Figura 5: Detección de proteínas mediante electroforesis bidimensional de la fracción de proteínas solubles del medio condicionado de células tratadas con AX a 2,5 mg/ml y de células control.** Las fracciones se analizaron por electroforesis bidimensional en geles procesados en paralelo. Uno de ellos se utilizó para inmunodetección con el anticuerpo que reconoce la AX, AO3.2 (paneles de la izquierda), y el gel duplicado se usó para tinción de proteína total con Sypro-Ruby (paneles de la derecha). Las manchas cuya posición coincide con las observadas tras el tratamiento con AX-B se encuentran marcadas con un círculo naranja y numeradas en el mismo orden.

### 1.3.1. Confirmación por inmunodetección de las proteínas identificadas

Un primer abordaje para validar la identificación realizada por espectrometría de masas consistió en la inmunodetección de las proteínas de interés en las membranas de las electroforesis bidimensionales.

Mediante esta técnica, conseguimos confirmar cinco de las siete proteínas identificadas (Figura 6). Las distintas manchas observadas tanto para EF-2 como para la  $\alpha$ -enolasa pueden ser debidas a la presencia de modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la metilación o la acetilación que pueden alterar el punto isoelectrico de estas proteínas (Zhou y col., 2010). Además, observamos que estas formas resultan haptenizadas en distinta proporción, posiblemente debido a la presencia de dichas modificaciones postraduccionales.



**Figura 6: Inmunodetección de las proteínas previamente identificadas mediante espectrometría de masas a partir de la fracción de proteína soluble del medio condicionado de células tratadas con AX-B a 0,5 mg/ml.** La fracción de proteína soluble del medio condicionado se analizó por electroforesis bidimensional. Las proteínas modificadas se detectaron en primer lugar mediante Western blot con Estrep-HRP (paneles de la izquierda) y, a continuación, por inmunodetección con los anticuerpos indicados (paneles de la derecha). Mediante este experimento se pudieron confirmar, por coincidencia de señal,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, HSP70, EF-2 y  $\alpha$ -enolasa. Las flechas marcan las señales cuya posición es coincidente en los dos tipos de detección.

Aunque la electroforesis bidimensional proporciona una elevada resolución, la información que arroja este experimento no constituye una

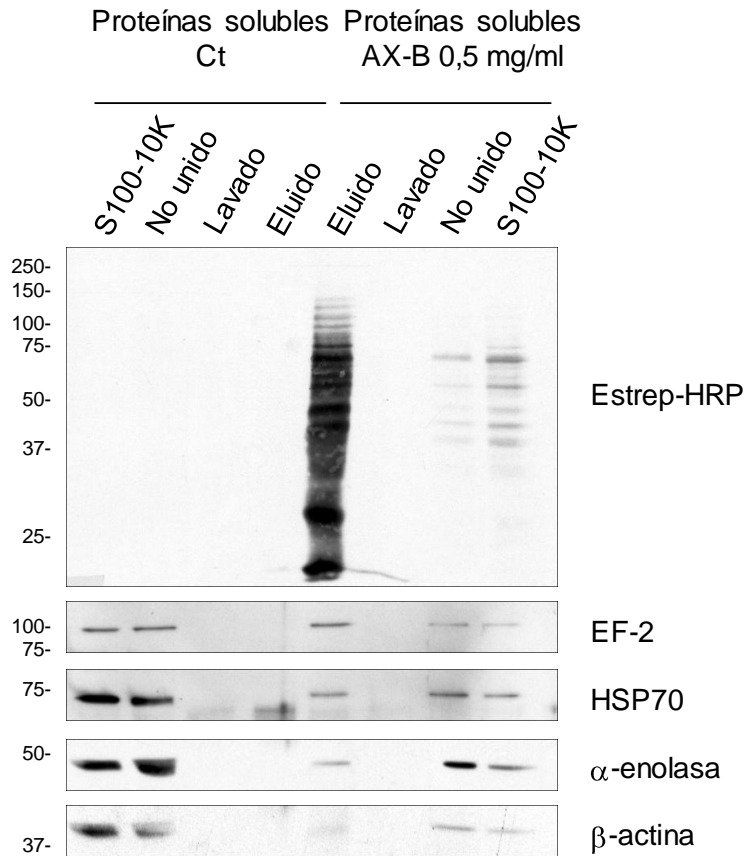
confirmación definitiva de la modificación por AX-B, ya que en una misma mancha podrían coincidir varias proteínas. Por este motivo, nos propusimos emplear abordajes adicionales para confirmar las proteínas identificadas por espectrometría de masas, como pueden ser la purificación por cromatografía de afinidad basada en avidina o la inmunoprecipitación.

### 1.3.2. Confirmación por cromatografía de afinidad en avidina de las proteínas identificadas

Mediante esta confirmación, se persigue purificar las proteínas que tienen unida AX-B separándolas de este modo de las que no la tienen. La cromatografía se realizó, por un lado, a partir de la fracción de proteína soluble S100-10K de linfocitos tratados con AX-B (0,5 mg/ml). Por otro lado, en paralelo, se realizó el mismo procedimiento con la fracción de proteína soluble del medio condicionado de células control, para obtener información sobre la posible retención inespecífica de proteínas en la resina.

Como se muestra en la Figura 7, la fracción eluida de la purificación mostró un enriquecimiento de la señal de biotina con respecto a la fracción S100-10K. Esto indica una purificación efectiva de la fracción de proteínas modificadas.

A continuación, se incubó la membrana con anticuerpos frente a las proteínas identificadas por espectrometría de masas. Este abordaje confirmó que el factor de elongación 2, HSP70,  $\alpha$ -enolasa y  $\beta$ -actina se habían purificado en la fracción eluida.



**Figura 7: Purificación por cromatografía de afinidad basada en avidina de la fracción de proteína soluble del medio condicionado desalada (S100-10K) de células tratadas con 0,5 mg/ml de AX-B y células control.** La purificación se realiza mediante esferas de agarosa recubiertas con Neutravidina. La fracción S100-10K se incubó con estas esferas durante 3 horas a 4°C y se separó la fracción “no unida” de la fracción enriquecida con las proteínas haptinizadas por AX-B (eluido). El análisis de la purificación se realizó mediante Western blot, incubando la membrana con Estrep-HRP y, a continuación, por inmunodetección de varias de las proteínas previamente identificadas por espectrometría de masas.

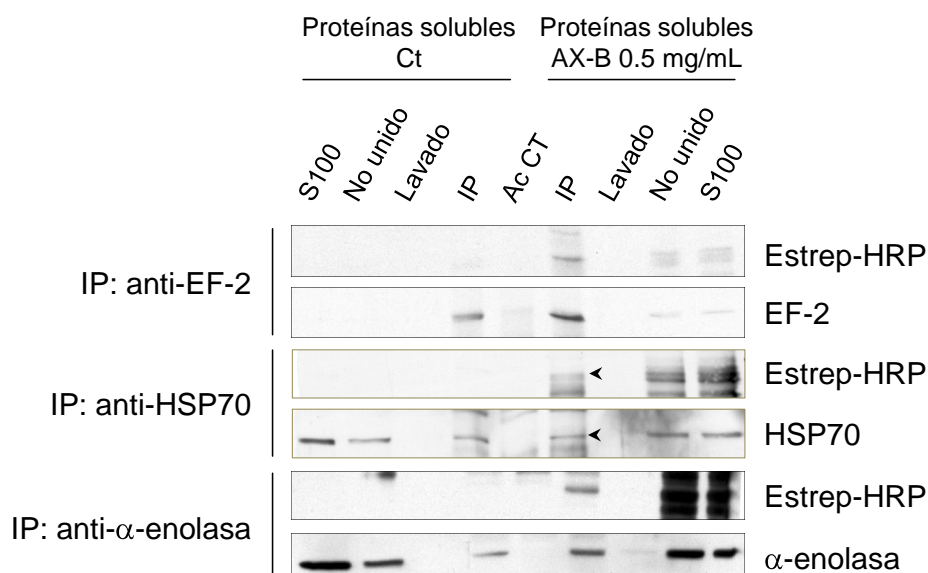
### 1.3.3. Confirmación por inmunoprecipitación de las proteínas identificadas

Por último, validamos las dianas identificadas por espectrometría de masas mediante inmunoprecipitación, observando posteriormente si presentaban señal de biotina.

Como observamos en la Figura 8, las proteínas inmunoprecipitadas, en concreto, EF-2, HSP70 y  $\alpha$ -enolasa, mostraron señal de biotina en las muestras procedentes de células tratadas con AX-B, pero no en el caso de las células

control. Con esta técnica, por tanto, se consiguió una confirmación adicional de la haptización de dichas proteínas por AX-B.

En resumen, el conjunto de abordajes presentados en las Figuras 6, 7 y 8 confirma la modificación por AX-B de las proteínas previamente identificadas mediante espectrometría de masas.

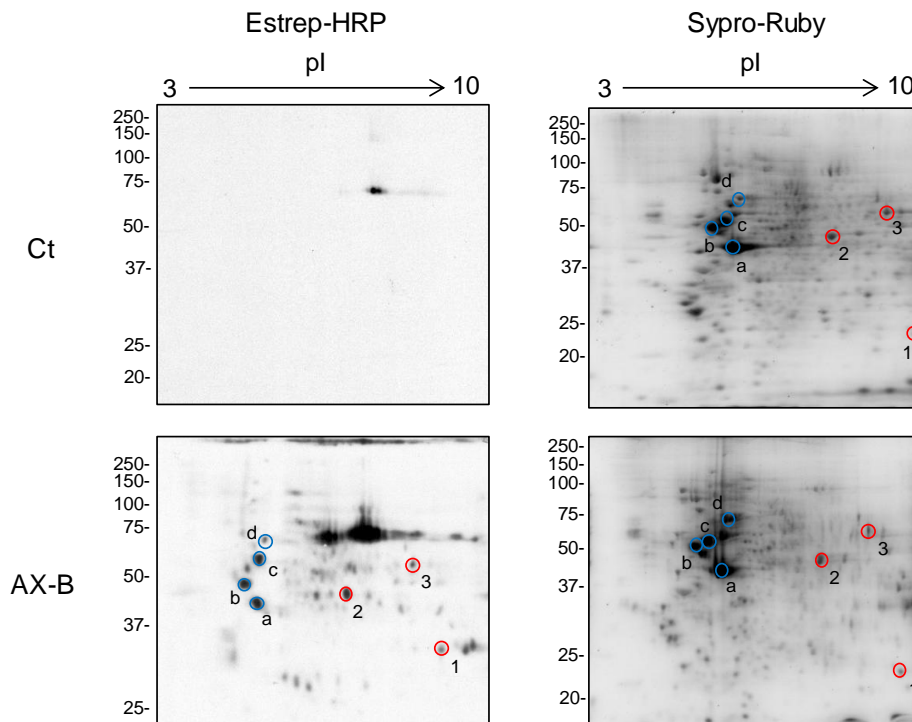


**Figura 8: Inmunoprecipitación de las proteínas de interés mediante los anticuerpos indicados.** La inmunoprecipitación (IP) se realizó mediante esferas recubiertas con los anticuerpos especificados en cada caso. La fracción S100 se incubó con estas esferas durante 4 horas y se separó la fracción no unida de la fracción unida a los respectivos anticuerpos. El análisis de la inmunoprecipitación se realizó por Western blot incubando la membrana en primer lugar con Estrep-HRP y a continuación con el anticuerpo correspondiente a cada proteína de interés. Ac CT, anticuerpo conjugado con proteína G como control de señal inespecífica del propio anticuerpo o de la proteína G.

#### 1.4. Identificación de proteínas haptizadas por AX-B en la fracción de lisado celular

Según la hipótesis del hapteno, la AX-B podría haptizar proteínas del exterior celular que luego serían internalizadas en la célula o, por el contrario, el fármaco podría ser internalizado y modificar proteínas intracelulares. Por esto, dado el especial interés del estudio detallado de la haptización en la fracción de lisado celular, llevamos a cabo la detección de proteínas modificadas por AX-B en esta fracción mediante electroforesis bidimensional.

Obtuvimos un patrón de proteínas modificadas por AX-B que presentaba algunas similitudes con el detectado en la fracción S100 del medio condicionado (Figura 9). En concreto, aparecen señales positivas de proteínas cuyo peso molecular y pI coinciden con los de manchas previamente identificadas por espectrometría de masas como  $\beta$ -actina,  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, HSP70 y  $\alpha$ -enolasa.



**Figura 9: Análisis de lisados de células tratadas con AX-B a 0,5 mg/ml mediante electroforesis bidimensional y detección de proteínas con señal positiva de biotina.** Las células RPMI 8866 se trataron durante 16 horas con 0,5 mg/ml de AX-B. Tras el tratamiento se lisaron como se describe en la sección de Material y Métodos. La fracción de lisado se analizó por electroforesis bidimensional en geles procesados en paralelo. Uno de ellos se utilizó para Western blot con Estrep-HRP (paneles de la izquierda) y el gel duplicado para tinción de proteína total con Sypro-Ruby (paneles de la derecha). Las manchas señaladas con un círculo rojo se identificaron por huella peptídica mediante espectrometría de masas. Las manchas señaladas con un círculo azul son algunas de las que coinciden con las que ya se identificaron anteriormente: actina (a), tubulina (b y c) y HSP70 (d).

De este gel se extrajeron 3 nuevas proteínas con una señal de biotina intensa y con una cantidad de proteína suficiente para proceder a su identificación mediante huella peptídica (Tabla 5). En esta fracción se identificaron proteínas que están directamente relacionadas con el sistema inmune como es el caso de la cadena V Kappa de la inmunoglobulina, y enzimas glucolíticas como la piruvato quinasa y la  $\alpha$ -enolasa. Esta última ya



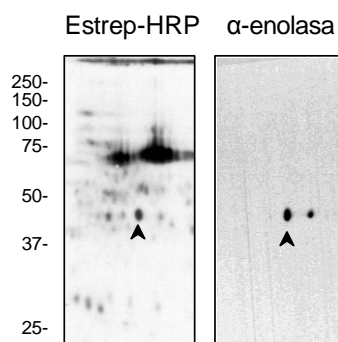
había sido identificada y confirmada previamente en la fracción S100 del medio condicionado, lo que podría indicar que es una diana importante de amoxicilina.

Nº	Código de acceso	Proteína	Puntuación	Puntuación Límite	Peso molecular	Punto isoelectrico
1	P04206	Cadena V Kappa, región III de Ig (IGKV3-20)	288	59	11.937	9,34
2	P06733	$\alpha$ -enolasa (ENOA)	237	59	47.481	7,01
3	P14618	Piruvato quinasa (PKM)	368	59	58.470	7,96

**Tabla 5: Identificación de proteínas modificadas por AX-B en la fracción de lisados de linfocitos B tratados con AX-B a 0,5 mg/ml.** En la tabla se incluye el número de la mancha correspondiente en el gel, el código de acceso de la proteína, el nombre de la proteína junto con el nombre del gen, la puntuación obtenida en la identificación, la puntuación límite, el peso molecular expresado en daltons y el punto isoelectrico.

#### 1.4.1. Confirmación de las proteínas identificadas mediante inmunodetección

Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas se detectaron mediante anticuerpos específicos frente a las mismas. De nuevo observamos una coincidencia en la posición de la señal de biotina y la señal la  $\alpha$ -enolasa (Figura 10). Las otras dos proteínas no se pudieron detectar con los anticuerpos disponibles.



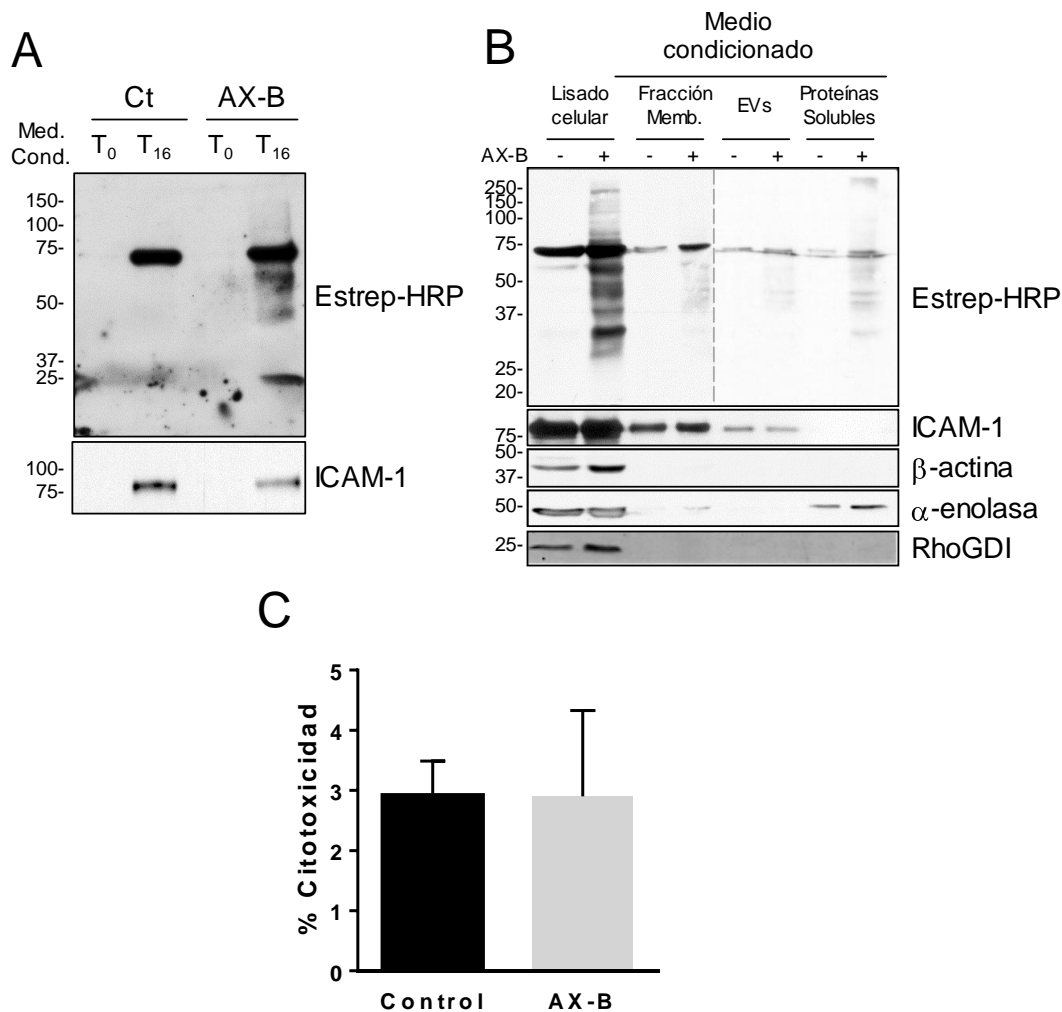
**Figura 10: Inmunodetección de  $\alpha$ -enolasa en el lisado de células tratadas con AX-B a 0,5 mg/ml.** La fracción de lisado se analizó por electroforesis bidimensional. En primer lugar, se observó la señal de biotina por Western blot con Estrep-HRP (panel de la izquierda) y, a continuación, la correspondiente a la  $\alpha$ -enolasa por inmunodetección con el anticuerpo específico (panel de la derecha). Las cabezas de flecha marcan la posición de las señales coincidentes.

### **1.5. Estudio de la secreción activa de proteínas modificadas por AX-B por linfocitos B**

Las proteínas modificadas por amoxicilina presentes en la fracción extracelular de linfocitos B estarían potencialmente implicadas en la respuesta alérgica. Estas proteínas serían transportadas ya sea en forma soluble, o encapsuladas en vesículas, como los exosomas, y participarían en la activación de otras células. Dado su interés, nos planteamos explorar su origen con más detalle. En concreto, estas proteínas podrían proceder de la lisis celular durante el tratamiento o de un proceso de secreción activa.

Para estudiar la secreción de proteínas haptinizadas por AX-B, se llevó a cabo un experimento de pulso-caza en el que, tras el tratamiento de las células con AX-B durante 16 horas, la AX-B se eliminó del medio extracelular y las células se mantuvieron durante otras 16 horas en medio fresco. Se obtuvieron muestras del medio de cultivo a tiempo cero y 16 horas después de la eliminación de la AX-B del medio extracelular (Figura 11A). A continuación, analizamos las distintas fracciones del medio condicionado obtenido en el experimento de pulso-caza. En la Figura 11B observamos proteínas haptinizadas tanto en la fracción de vesículas extracelulares (EVs) como en la fracción de proteínas solubles. La presencia de proteínas procedentes de lisis celular en estas fracciones parece poco probable dado que la proteína citosólica RhoGDI, que se liberaría con la lisis, solo se detecta en los lisados celulares y está ausente en el resto de fracciones del medio condicionado. Al analizar la toxicidad de los tratamientos, el llevado a cabo con AX-B no indujo un aumento de la citotoxicidad en las condiciones empleadas (Figura 11C), lo que indica que no hay una pérdida significativa de la integridad celular. Curiosamente, observamos un enriquecimiento de la proteína  $\alpha$ -enolasa en la fracción de proteína soluble del medio condicionado (Figura 11B), lo que sugiere un posible proceso de secreción activa de esta proteína.

Estos resultados apoyan la idea de que las proteínas podrían resultar haptinizadas en el interior celular y a continuación secretadas al exterior, ya sea en forma soluble o en vesículas extracelulares.



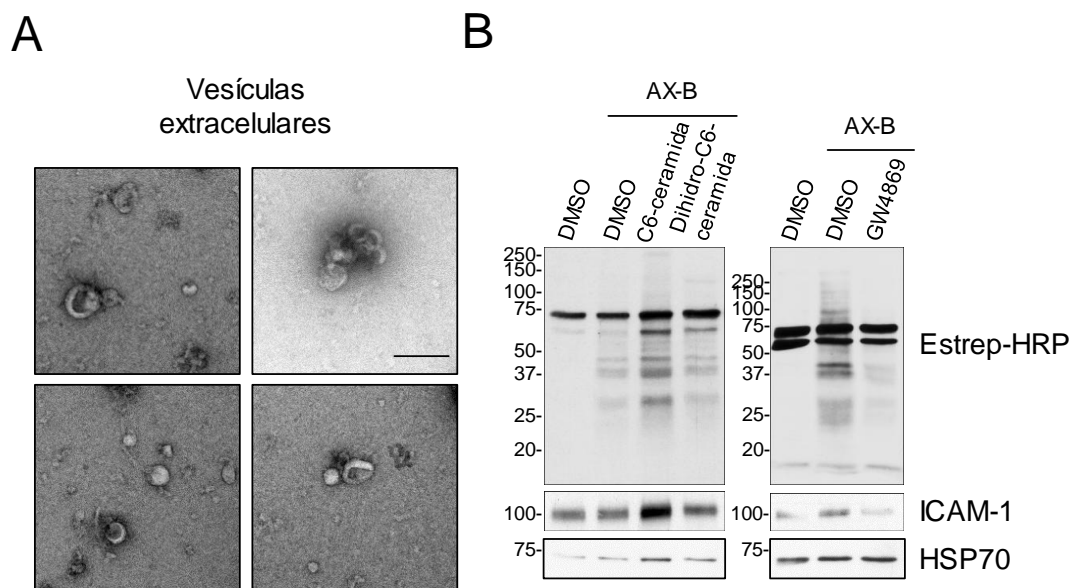
**Figura 11: Aparición de proteínas modificadas por AX-B en el medio extracelular de linfocitos B.** (A) Las células se trataron durante 16 horas con 0,5 mg/ml de AX-B. Tras el tratamiento, se lavaron exhaustivamente con medio RPMI 1640 mediante centrifugaciones sucesivas. A continuación, las células se incubaron durante otras 16 horas en medio sin suero y sin antibióticos. El análisis de la aparición de proteínas modificadas en el medio condicionado (Med. Cond.) se realizó por Western blot del medio recogido al comienzo y al final de la incubación con el medio fresco. (B) Las células tratadas con AX-B se lavaron exhaustivamente con medio RPMI 1640 mediante sucesivas centrifugaciones y se cultivaron durante 24 horas con medio nuevo sin suero y sin antibióticos. Por un lado, se lisaron las células para obtener el lisado celular, por otro, se fraccionó el medio, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. El análisis de las distintas fracciones se realizó mediante Western blot por incubación con Estrep-HRP y a continuación con diferentes anticuerpos frente a proteínas representativas de cada fracción. En la incubación con Estrep-HRP se muestra una exposición de 30 segundos de la membrana para panel izquierdo y una de 2 minutos para el panel derecho. EVs, fracción de vesículas extracelulares del medio condicionado. (C) La muerte celular se estimó contando las células positivas para azul de tripán tras el tratamiento con AX-B y la incubación en medio sin suero durante 16 horas. No se observaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas con AX-B.

### 1.5.1. Análisis y regulación de la secreción de vesículas extracelulares por linfocitos B

Para analizar la naturaleza de las vesículas extracelulares, observamos la fracción correspondiente mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 12A). Comprobamos que tanto el tamaño como la morfología de las vesículas se correspondían con los que presentan típicamente los exosomas (Raposo y Stoorvogel, 2013).

La secreción de exosomas es un proceso regulado. Por ello, comprobamos a continuación si la presencia de proteínas haptinizadas en la fracción de vesículas extracelulares podía ser modulada por agentes que estimulan la liberación de exosomas, en concreto por la C6-ceramida (Raposo y Stoorvogel, 2013). Observamos que la C6-ceramida (Figura 12B) inducía un aumento de los niveles de proteínas haptinizadas por AX-B en la fracción de vesículas extracelulares, así como también un aumento en los niveles de proteínas que se consideran marcadores de exosomas como ICAM-1, en el caso de células inmunes, y HSP70, que es un marcador general de exosomas. Este efecto no se observó usando la dihidro-C6-ceramida, que es un análogo de la C6-ceramida pero carece de actividad, como control negativo.

Por otro lado, la liberación de estas vesículas se puede bloquear con el inhibidor de la esfingomielinasa neutra, GW4869 (Li y col., 2013; Kulshreshtha y col.). Como se aprecia en la Figura 12B este tratamiento redujo los niveles de proteínas haptinizadas y del marcador ICAM-1 en esta fracción.



**Figura 12: Caracterización y regulación de la secreción de vesículas extracelulares por linfocitos B.** (A) Las vesículas extracelulares del medio condicionado se observaron mediante microscopía electrónica como se describe en la sección de Material y Métodos. Se muestran imágenes representativas de la forma y tamaño de estas vesículas procedentes de varios experimentos. Barra de escala, 200 nm. (B) Los linfocitos B fueron tratados durante 16 horas con AX-B a 0,5 mg/ml. Tras el tratamiento, las células se lavaron con RPMI 1640 para eliminar la AX-B que no hubiera reaccionado. A continuación, las células se trataron durante 24 horas con C6-ceramida 10  $\mu$ M, dihidro-C6-ceramida 10  $\mu$ M, o GW4869 5  $\mu$ M. Las vesículas extracelulares se analizaron por Western blot incubando la membrana con Estrep-HRP para detectar la presencia de proteínas haptinizadas y con anticuerpos frente a los marcadores de exosomas ICAM-1 y HSP70.

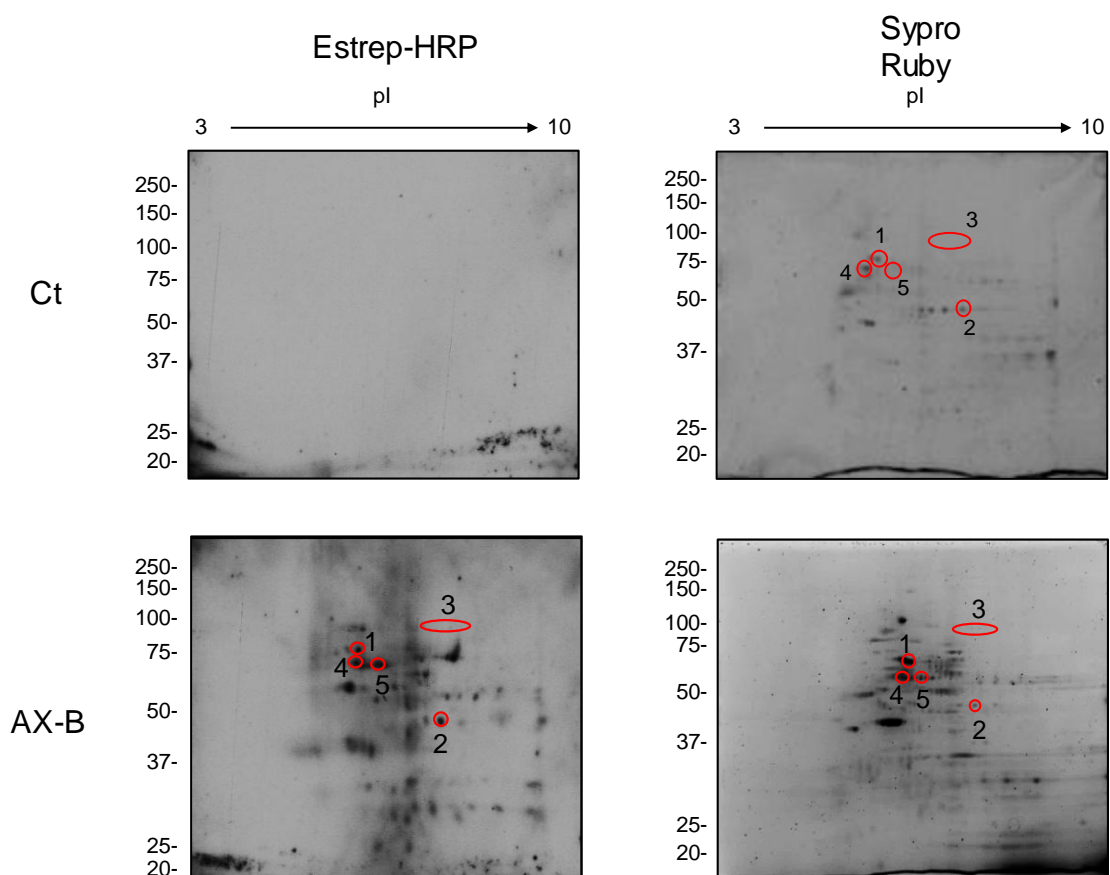
El conjunto de estos resultados indica que las proteínas haptinizadas son secretadas en exosomas, puesto que la regulación de la secreción de estos altera los niveles de proteínas modificadas presentes en la fracción de EVs. También muestra que esta secreción de proteínas haptinizadas puede ser regulada químicamente a través de la modulación de la producción de exosomas.

#### 1.5.2. Detección e identificación de proteínas haptinizadas por AX-B en exosomas de linfocitos B

La presencia de proteínas haptinizadas en exosomas y la regulación la liberación de exosomas al medio condicionado mediante el uso de diversos

compuestos nos llevó a estudiar con mayor detalle las proteínas presentes en la fracción de vesículas extracelulares.

En primer lugar, realizamos electroforesis bidimensional de dicha fracción para detectar e identificar las proteínas haptenizadas. Como se observa en la Figura 13, obtuvimos un patrón reproducible con varias manchas intensas, algunas de ellas con señal de biotina. Este patrón, sin embargo, es diferente del de la fracción de proteínas solubles del medio condicionado y del obtenido del lisado celular, aunque algunas de las principales manchas son coincidentes.



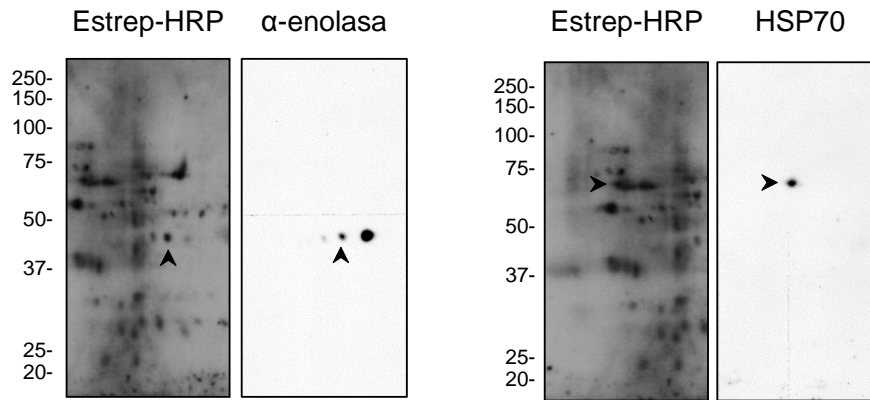
**Figura 13: Análisis de la fracción de vesículas extracelulares de linfocitos tratados con AX-B a 0,5 mg/ml mediante electroforesis bidimensional y detección de proteínas con señal positiva de biotina.** Las células RPMI 8866 se trataron durante 16 horas con 0,5 mg/ml de AX-B. Tras el tratamiento se aisló la fracción de vesículas extracelulares como se describe en la sección de Material y Métodos. Dicha fracción se analizó por electroforesis bidimensional en geles procesados en paralelo. Uno de ellos se utilizó para Western blot con Estrep-HRP (paneles de la izquierda) y el gel duplicado para tinción de proteína total con Sypro-Ruby (paneles de la derecha). Las manchas señaladas con un círculo rojo se identificaron por huella peptídica mediante espectrometría de masas.

Seguidamente, procedimos a identificar por espectrometría de masas algunas de las proteínas que presentaron señal de biotina. La identificación mediante esta técnica (Tabla 6) confirmó que la  $\alpha$ -enolasa, HSP70 y EF-2, entre otras, eran secretadas en exosomas hacia el exterior celular como proteínas haptinizadas por AX-B.

Nº	Código de acceso	Proteína	Puntuación	Puntuación Límite	Peso molecular	Punto isoeléctrico
1	P08133-2	Isoforma 2 de la Anexina A6 (ANXA6)	73	59	72.720	5,42
2	P06733	$\alpha$ -enolasa (ENOA)	83	59	47.453	7,01
3	P14618	EF2 (EEF2)	195	59	96.246	6,41
4	Q53GZ6	HSP70 (HSP70)	69	59	71.083	5,28
5	P50990	Subunidad $\theta$ del complejo T (CCT8)	139	59	60.153	5,42

**Tabla 6: Identificación de proteínas haptinizadas por AX-B presentes en la fracción de vesículas extracelulares del medio condicionado de linfocitos B tratados con AX-B a 0,5 mg/ml.** En la tabla se incluye el número de la mancha correspondiente en el gel, el código de acceso de la proteína, el nombre de la proteína junto con el nombre del gen, la puntuación obtenida en la identificación, la puntuación límite, el peso molecular expresado en daltons y el punto isoeléctrico.

Como en experimentos anteriores, para confirmar la modificación de las proteínas identificadas llevamos a cabo inmunodetección con anticuerpos frente a las proteínas de interés (Figura 14). Así, pudimos confirmar la coincidencia de las señales de  $\alpha$ -enolasa y HSP70 con las señales de biotina. En este caso, dada la escasa cantidad de proteína en la fracción de vesículas extracelulares, las purificaciones por inmunoprecipitación o por cromatografía de afinidad basada en avidina no se pudieron llevar a cabo.

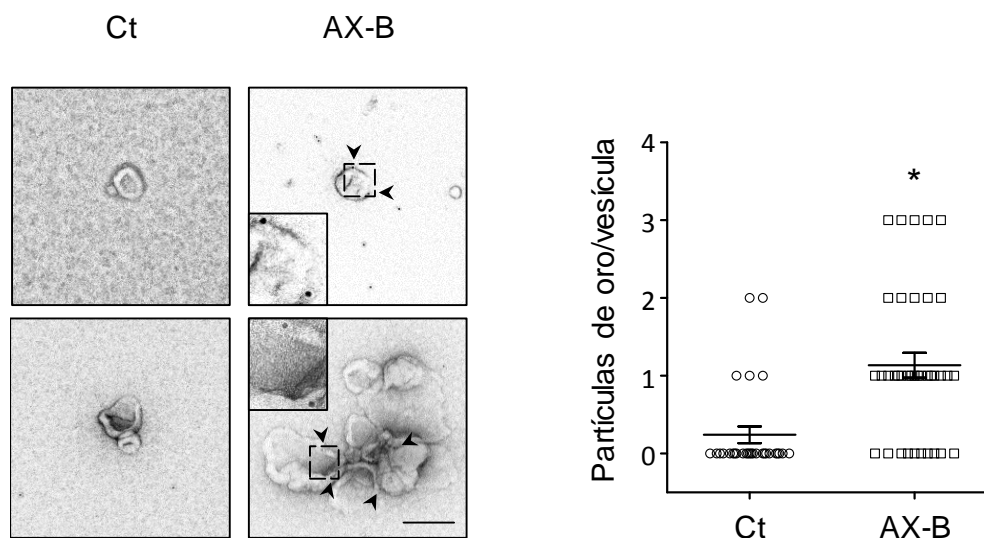


**Figura 14: Inmunodetección de las proteínas previamente identificadas mediante espectrometría de masas a partir de la fracción de vesículas extracelulares del medio condicionado de células tratadas con AX-B a 0,5 mg/ml.** La fracción de vesículas extracelulares del medio condicionado se analizó por electroforesis bidimensional. En primer lugar, se detectó la señal de biotina con Estrep-HRP (paneles de la izquierda) y, a continuación, se realizó inmunodetección con los anticuerpos indicados (paneles de la derecha). Las flechas marcan la posición de las señales coincidentes.

### 1.5.3. Análisis de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica

A continuación, nos propusimos observar directamente la presencia de proteínas haptenizadas en exosomas mediante microscopía electrónica. Para ello, los exosomas secretados al medio extracelular provenientes de células control o tratadas con AX-B se incubaron con estreptavidina conjugada con partículas de oro. Mediante esta técnica, pudimos detectar la presencia de biotina sobre estas estructuras (Figura 15). Para apoyar la hipótesis de que la señal detectada se debe a la AX-B, cuantificamos el número de partículas de oro asociadas a los exosomas de células control y de células incubadas con AX-B. El análisis estadístico mediante t de Student muestra que las diferencias entre el control y el tratamiento con AX-B, en cuanto al número de partículas de oro en las vesículas, son significativas. Este resultado sugiere que el marcaje por estreptavidina oro es selectivo y no el resultado de que estas partículas puedan haber quedado depositadas sobre vesículas que no contengan biotina por azar durante la preparación.



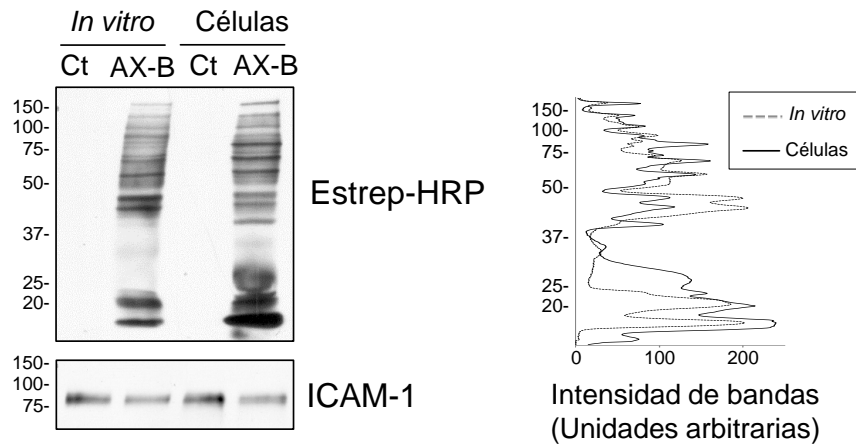


**Figura 15: Las vesículas extracelulares secretadas contienen proteínas o estructuras modificadas por AX-B.** Las vesículas extracelulares secretadas al medio condicionado de linfocitos B tratados o sin tratar con AX-B a 0,5 mg/ml se incubaron con partículas de oro de 10 nm conjugadas con moléculas de estreptavidina. A continuación, las vesículas fueron observadas por microscopía electrónica como se describe en la sección de Material y Métodos. Las flechas señalan algunas de las partículas unidas a las vesículas. Se muestran imágenes representativas de varios experimentos. Barra de escala, 200 nm. El gráfico muestra la media  $\pm$  error estándar del número de partículas de oro por vesícula. \*  $P < 0,05$  frente al control. Se contaron un total de 29 vesículas en el control y 37 en el tratamiento con AX-B.

#### 1.5.4. Análisis de las diferencias de haptización entre las proteínas de exosomas *in vitro* y en células

Dado que el plasma sanguíneo contiene exosomas secretados por diversos tipos de células tanto en condiciones normales como en ciertas enfermedades (Tang y Wong, 2015), las proteínas o estructuras presentes en los exosomas circulantes pueden ser también dianas de haptización por fármacos. Por este motivo, estudiamos la modificación de proteínas de exosomas previamente aislados de linfocitos B incubados con AX-B *in vitro* y la comparamos con los aductos presentes en los exosomas secretados por las células tratadas con este compuesto. Como observamos en la Figura 16, la AX-B también se une a proteínas de exosomas aislados. El patrón de polipéptidos con señal de biotina muestra claras diferencias con respecto al de los exosomas secretados por células tratadas con AX-B. Estos resultados sugieren que algunas proteínas haptizadas intracelularmente pueden ser dirigidas a

exosomas mientras que en los exosomas aislados es posible que se modifiquen las proteínas más accesibles.

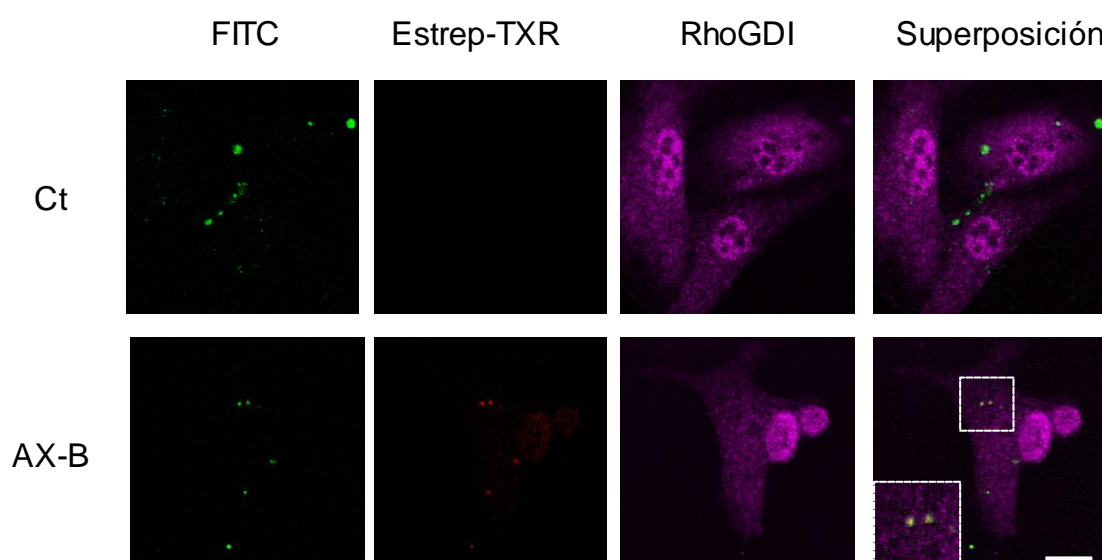


**Figura 16: Análisis de las diferencias en los patrones de proteínas haptinizadas por AX-B en exosomas incubados *in vitro* o procedentes de células tratadas con el antibiótico.** Los linfocitos B se trataron con o sin AX-B a 0,5 mg/ml y se aislaron las vesículas extracelulares según se describe en la sección de Material y Métodos. Exosomas procedentes de células sin tratar fueron incubados *in vitro* durante 16 horas a 37°C con AX-B a 0,5 mg/ml. Las diferencias entre los exosomas provenientes de células y los incubados *in vitro* se analizaron mediante Western blot y detección con Estrep-HRP. Se usó ICAM-1 como marcador de exosomas. La señal de biotina se densitómetró y se representó para comparar los patrones obtenidos mediante ambos abordajes. La línea de puntos corresponde a la unión de AX-B en exosomas en incubaciones *in vitro*, y la línea continua a exosomas obtenidos de células tratadas con AX-B. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

#### 1.5.5. Transporte de proteínas haptinizadas en vesículas extracelulares a células diana

La comunicación intercelular es un proceso crítico en la fisiología celular en el que moléculas como hormonas o ARN mensajero son transportados entre células en forma soluble o en el interior de vesículas (Novikov y col., 2015; Ismail y col., 2013). Se ha descrito que los exosomas pueden jugar un papel primordial en estos procesos. Partiendo de estos precedentes y teniendo en cuenta las evidencias obtenidas sobre la presencia de proteínas haptinizadas por amoxicilina en exosomas, nos propusimos evaluar la internalización de exosomas secretados por linfocitos B en otro tipo celular. Para ello, aislamos vesículas extracelulares de linfocitos B control y tratados con AX-B. Estas vesículas fueron teñidas con FITC, como trazador, e incubadas con Estrep-TXR, para poder observar específicamente la biotina presente. Las vesículas

se añadieron al medio de cultivo de células BAEC. Como células endoteliales, estas células pueden actuar como células presentadoras de antígenos no profesionales (Bagai y col., 2005). Mediante microscopía confocal, observamos vesículas en el interior de estas células en diferentes etapas de internalización, bien cerca de la membrana celular o en zonas cercanas al núcleo de la célula (Figura 17). Además, como se aprecia en la figura, en la condición control las vesículas únicamente presentan la señal verde correspondiente a FITC, mientras que las vesículas procedentes de linfocitos B tratados con AX-B muestran tanto la señal correspondiente a FITC como la señal roja de Estrep-TXR, indicando que estas vesículas contienen proteínas haptenizadas por AX-B.



**Figura 17: Internalización de exosomas de linfocitos B cargados con moléculas de AX-B en células BAEC.** Las vesículas extracelulares secretadas por linfocitos B tratados o sin tratar con 0,5 mg/ml de AX-B se aislaron y se incubaron con FITC y con Estrep-TXR. Las células BAEC se incubaron después con la preparación de vesículas durante 3 horas. La proteína RhoGDI, detectada mediante inmunofluorescencia, se utilizó para delimitar los límites de la célula. Las células endoteliales se observaron mediante microscopía confocal de fluorescencia para estudiar la presencia de vesículas extracelulares en su interior. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos diferentes. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

El conjunto de estos resultados demuestra que las vesículas cargadas con proteínas modificadas por AX-B y secretadas al medio extracelular por linfocitos B pueden ser captadas e internalizadas por otros tipos celulares. Estas observaciones sugieren que los exosomas pueden jugar un papel importante en el transporte o presentación de proteínas modificadas por

fármacos y como consecuencia en la respuesta alérgica frente a dichos fármacos.

## **2. ANÁLISIS DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR OTROS FÁRMACOS Y EN OTROS TIPOS CELULARES**

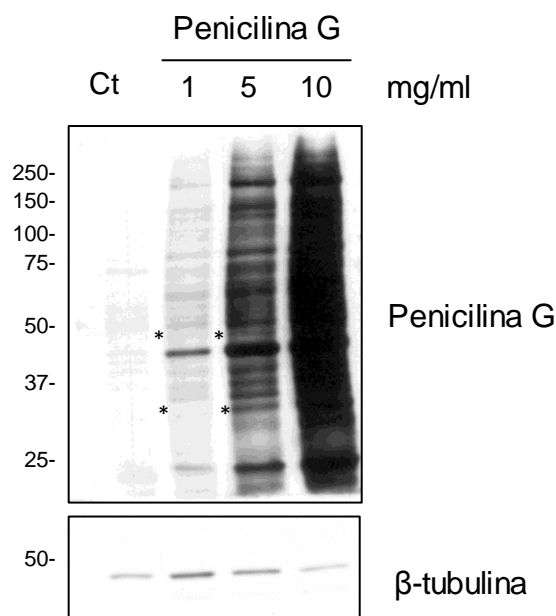
La formación de aductos de proteínas con fármacos puede ser un proceso independiente del tipo celular o del tipo de fármaco o presentar características selectivas tanto de los fármacos como de las células diana. En esta sección analizaremos, de manera general, la haptениización de proteínas en diferentes tipos celulares potencialmente implicados en la alergia como los macrófagos o las células endoteliales. Además, analizaremos la haptениización de los linfocitos B por penicilina G, que es otro antibiótico betalactámico de uso clínico.

### **2.1. Haptениización de proteínas de linfocitos B por penicilina**

Con el fin de detectar y obtener el patrón de proteínas haptениizadas por penicilina, en primer lugar, realizamos un experimento con varias concentraciones de este antibiótico en linfocitos B y, mediante detección inmunológica, observamos haptениización de proteínas, aunque con concentraciones del antibiótico sensiblemente superiores a las que se alcanzan farmacológicamente (Frentz y col., 1984).

Detectamos numerosos polipéptidos modificados por penicilina, con un patrón similar, en presencia de las distintas concentraciones empleadas, aunque observamos algunas diferencias en cuanto a señal relativa de algunas de las bandas (marcadas con asteriscos) (Figura 18).

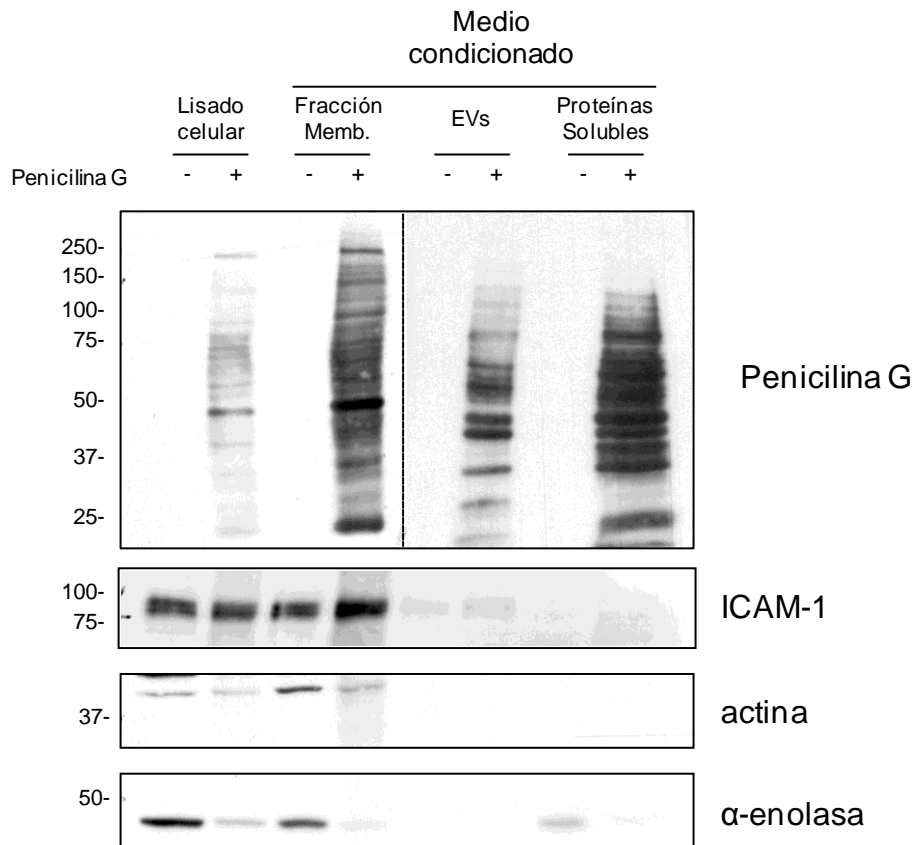
La concentración que se utilizó para los experimentos posteriores en células fue de 10 mg/ml. Aunque es una concentración elevada de fármaco, es la óptima para obtener señal fácilmente detectable mediante técnicas de inmunodetección.



**Figura 18: Haptización de proteínas de linfocitos B por distintas concentraciones de penicilina G.** Se trataron RPMI 8866 con diferentes concentraciones de Penicilina G en medio sin suero y sin antibióticos durante 16 horas a 37° C. Tras el tratamiento, se lisaron las células y se cargaron 10 µg de lisado de cada condición en geles de poliacrilamida. Los polipéptidos haptizados por penicilina se observaron mediante inmunoblot por incubación con un anticuerpo frente a penicilina G. Los asteriscos señalan polipéptidos cuya señal relativa difiere con las distintas concentraciones.

Para obtener una visión más detallada de la haptización de proteínas por penicilina, realizamos fraccionamiento del medio condicionado de linfocitos B tratados con 10 mg/ml de este fármaco.

El fraccionamiento muestra patrones característicos de cada una de las fracciones (Figura 19), al igual que con el tratamiento con amoxicilina, aunque los patrones de modificación por ambos antibióticos son diferentes. En este caso, se detecta menor proporción de enolasa en el medio extracelular que tras el tratamiento con amoxicilina. Además, comprobamos la correcta obtención de cada una de las fracciones mediante marcadores característicos de exosomas como ICAM-1, que aparece en las fracciones de vesículas extracelulares, fracción de membrana o restos celulares y lisado celular, y marcador característico del interior celular como la actina, presente en el lisado celular y en la fracción de membrana.



**Figura 19: Detección de proteínas haptinizadas por penicilina en lisado celular y en el medio condicionado.** Las células se trataron con penicilina G a 10 mg/ml durante 16 horas en medio RPMI 1640 sin suero. A continuación, se separaron las células del medio condicionado, que se sometió a centrifugaciones diferenciales para obtener la fracción de membranas, las vesículas extracelulares (EVs) y la fracción de proteínas solubles. El análisis de las proteínas modificadas se realizó mediante Western blot de todas las fracciones incubando las membranas con un anticuerpo frente a penicilina o con anticuerpos frente a las proteínas indicadas para confirmar la separación adecuada de cada fracción. En la incubación con el anticuerpo frente a penicilina se muestran dos tiempos de exposición diferentes, 30 segundos para las calles de la izquierda y 2 minutos para las la derecha.

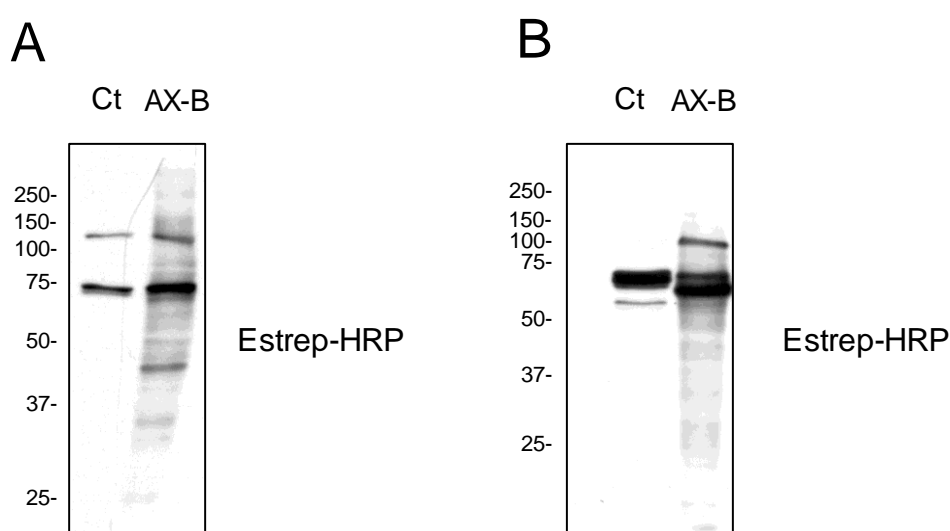
Este resultado apuntaría a que tanto la modificación global de las proteínas como los patrones de fraccionamiento, muestran un comportamiento diferente según el fármaco empleado incluso con fármacos de la misma familia.

## 2.2. Haptización de proteínas de células MCF-7 por amoxicilina

Las células epiteliales tumorales de glándula mamaria MCF-7 son también un buen modelo para estudiar la posible secreción de proteínas haptinizadas tanto por vesículas extracelulares como en forma soluble, dada

su naturaleza secretora (Gomes y col., 2017; Wang y col., 2017a). En base a esto, estudiamos la localización de proteínas haptinizadas por amoxicilina en MCF-7 mediante microscopía confocal de fluorescencia y la detección de estas proteínas por Western blot.

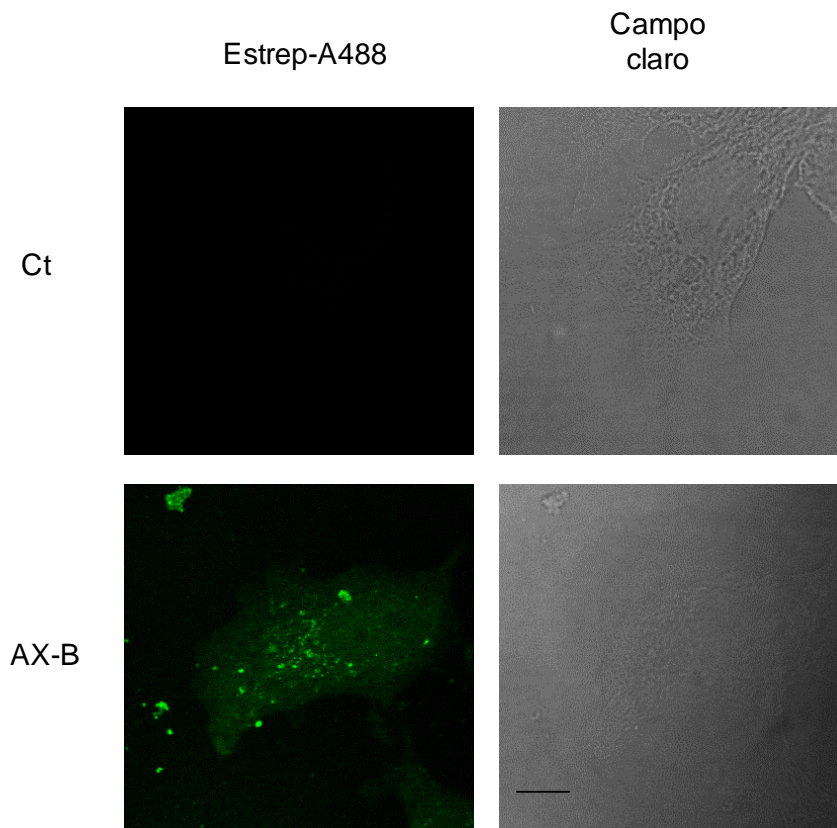
Observamos un patrón de polipéptidos variado característico de cada una de las fracciones por Western blot (Figura 20A y 20B). En el control se observa la señal correspondiente a las proteínas biotiniladas endógenas. Los patrones obtenidos son completamente diferentes a los que se obtuvieron en el apartado 1.2 de resultados en linfocitos B.



**Figura 20: Haptización de proteínas de MCF-7 en lisado celular y en vesículas extracelulares.** Las células MCF-7 se trataron durante 16 horas con 0,5 mg/ml de AX-B. Tras el tratamiento, las células se lisaron. La fracción de vesículas extracelulares se obtuvo como se describe en la sección de Material y Métodos. Se analizó la modificación de las fracciones de lisado (A) y de EVs (B) mediante SDS-PAGE y posterior incubación con Estrep-HRP.

Al analizar la localización de proteínas o estructuras modificadas por AX-B en el interior celular mediante microscopía confocal, observamos una señal difusa y homogénea con pequeños acúmulos en el citoplasma de la célula (Figura 21). Este resultado muestra algunas diferencias con el obtenido en linfocitos B en el apartado de resultados 1.1, donde la señal no es tan difusa y homogénea.

Estos resultados apuntarían a que la amoxicilina también es capaz de hapténizar las proteínas tanto a nivel celular como a nivel subcelular en vesículas que potencialmente serían secretadas al medio extracelular.



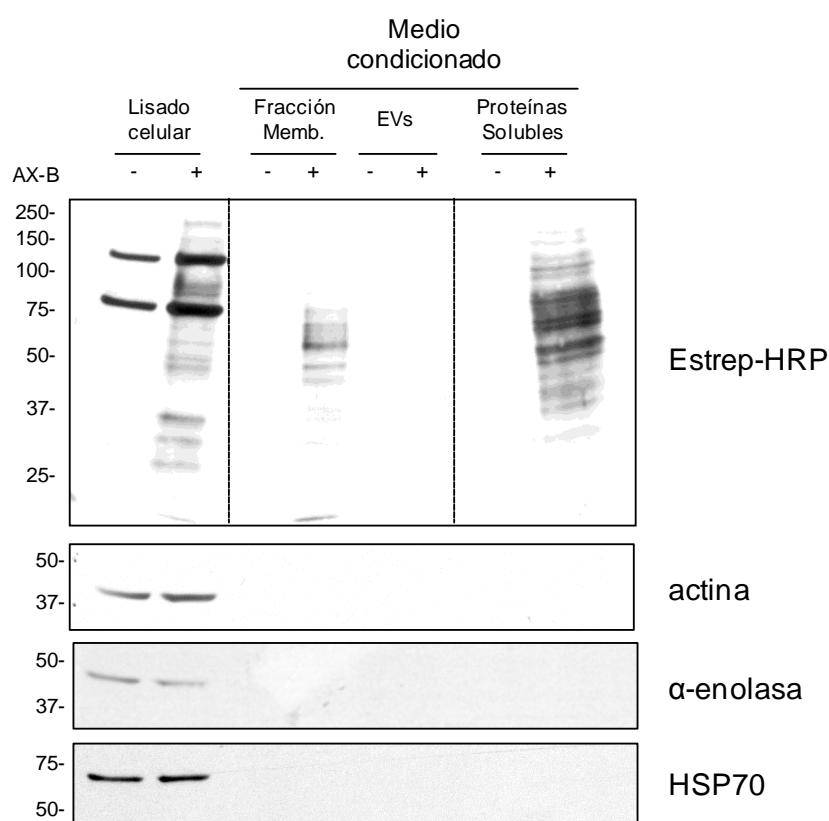
**Figura 21: Presencia de AX-B en el interior de células MCF-7.** Las células se incubaron con 0,5 mg/ml de AX-B en medio DMEM sin suero durante 16 horas. A continuación, tras fijarlas, se incubaron durante 30 minutos con estreptavidina acoplada a Alexa Flúor 488. Se observa el contorno de la célula en campo claro. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 2.3. Hapténización de proteínas de células RAW 264.7 por amoxicilina

Los macrófagos participan directamente en la respuesta inmunitaria y pueden estar implicados en la respuesta alérgica (Jiang y Zhu, 2016; Robbe y col., 2015). En procesos de inflamación, la presencia de patógenos puede producir la liberación de interleuquina 12 o quimioquinas (CCL15) por los macrófagos. La expresión de estos mediadores puede inducir la activación de linfocitos T o atraer a linfocitos, monocitos y eosinófilos, potenciando así la respuesta inmunitaria (Trinchieri, 2003; Martínez y col., 2006; Mosser y Edwards, 2008). Además, en condiciones de asma atópica se ha comprobado



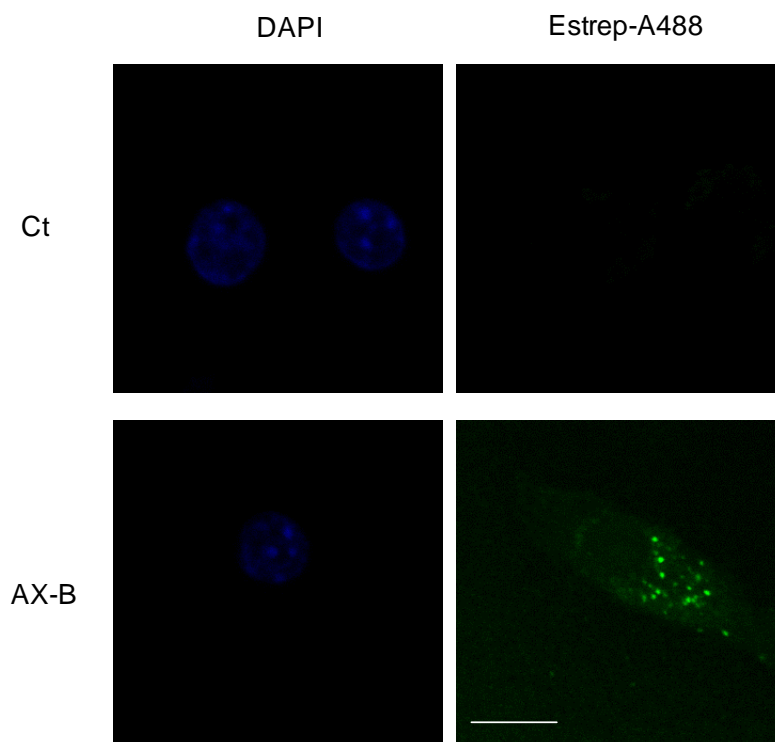
que los macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígenos en el contexto del MHC de tipo II (Caulfield y col., 1999; Janssen y col., 2002). Dada la importancia de este tipo celular en la respuesta inmune, estudiamos la haptización de proteínas por amoxicilina en el lisado celular y en las distintas fracciones del medio condicionado. Como se observa en el fraccionamiento en la Figura 22, se obtiene un patrón de proteínas haptizadas diferente en cada una de las fracciones. Por otro lado, en este tipo celular, no detectamos  $\alpha$ -enolasa en el medio condicionado.



**Figura 22: Detección de proteínas haptizadas por amoxicilina biotinilada en lisado celular y en el medio condicionado de células RAW 264.7.** Las células se trataron con AX-B a 0,5 mg/ml durante 16 horas. A continuación, se separaron las células del medio condicionado, que se sometió a centrifugaciones diferenciales para obtener la fracción de membranas, la fracción de vesículas extracelulares (EVs) y la fracción de proteínas solubles. El análisis de las proteínas modificadas se realizó mediante Western blot de todas las fracciones incubando las membranas con Estrep-HRP para detectar la señal de biotina de AX-B. El control de carga se realizó mediante incubación con el anticuerpo frente a actina,  $\alpha$ -enolasa y HSP70. En la incubación con Estrep-HRP se muestran tres tiempos de exposición diferentes, 1 minuto para las calles de la izquierda, 2 minutos para las centrales y 30 segundos para las de la derecha.

A continuación, estudiamos la distribución de las proteínas haptizadas en el interior celular mediante microscopía confocal. Observamos

que el patrón de estas proteínas presentaba un aspecto particulado junto con una señal difusa en el citoplasma (Figura 23). Este patrón es similar al que se ha obtenido en las células MCF-7 en el apartado anterior, sin embargo, es distinto al obtenido en linfocitos B, en los que la señal difusa no es tan evidente.



**Figura 23: Presencia de AX-B en el interior de macrófagos murinos RAW 264.7.** Las células se incubaron con 0,5 mg/ml de AX-B en medio DMEM sin suero durante 16 horas. A continuación, tras fijarlas, se incubaron durante 30 minutos con estreptavidina acoplada a Alexa Flúor 488 y, posteriormente, con DAPI durante 15 minutos. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Estos experimentos establecen que la haptениzación de proteínas por antibióticos betalactámicos presenta particularidades que dependen del tipo celular. Además, no es un proceso único de las aminopenicilinas, ya que la penicilina G también es capaz de unirse a proteínas celulares.

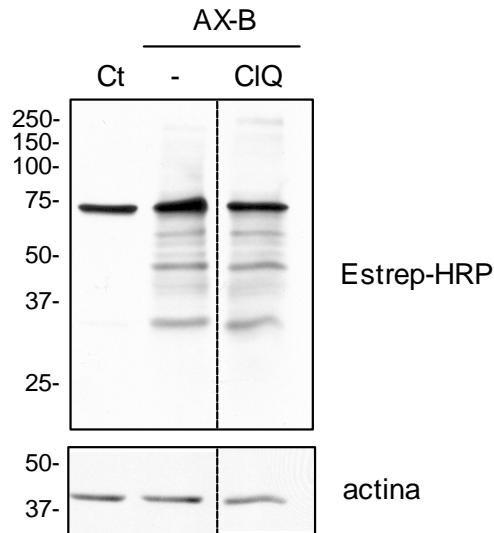
### **3. ANÁLISIS DEL PROCESAMIENTO CELULAR DE PROTEÍNAS HAPTENIZADAS POR AMOXICILINA**

Según la hipótesis del hapteno, los lisosomas degradarían las proteínas que se han modificado por fármacos fuera de la célula, mientras que la vía proteasomal procesaría las proteínas que se han modificado en el interior celular. Sin embargo, se dan excepciones a esta regla ya que, en las células dendríticas, el proteasoma puede también procesar proteínas procedentes de la vía endosomal. Los péptidos resultantes pueden unirse al MHC de tipo I en el retículo endoplasmático o en compartimentos ácidos, en lo que se conoce como vía de presentación cruzada (Segura y Villadangos, 2011; Rodríguez y col., 1999; Mantegazza y col., 2013). El procesamiento de las proteínas determinaría la formación del péptido unido al fármaco que sería expuesto como antígeno. En esta sección analizamos el papel que juegan estas vías en el procesamiento de las proteínas haptenizadas en diversos tipos celulares.

#### **3.1. Degradación por vía lisosomal de las proteínas haptenizadas en linfocitos B**

Para analizar la posible degradación de estas proteínas por esta vía, incubamos las células con AX-B y con un inhibidor de la acidificación lisosomal, la cloroquina (Dunmore y col., 2013; Long y col., 2013; Solomon y Lee, 2009). La cloroquina se protona en ambientes ácidos y se internaliza en los lisosomas provocando un aumento del pH lisosomal y, de este modo, inhibiendo la actividad de las enzimas (Slater, 1993; Homewood y col., 1972). Como consecuencia, las células tratadas con este compuesto no podrán llevar a cabo la degradación mediante lisosoma y presentarán un aumento de tamaño de estos orgánulos debido a la acumulación de material no degradado.

Al inhibir la degradación lisosomal, observamos mediante Western blot que no se habían producido grandes cambios ni en el patrón ni en los niveles de proteínas haptenizadas (Figura 24). Esto sugiere que si la vía lisosomal está participando en el procesamiento de las proteínas haptenizadas por AX-B, los efectos de su inhibición no son apreciables en este modelo celular.

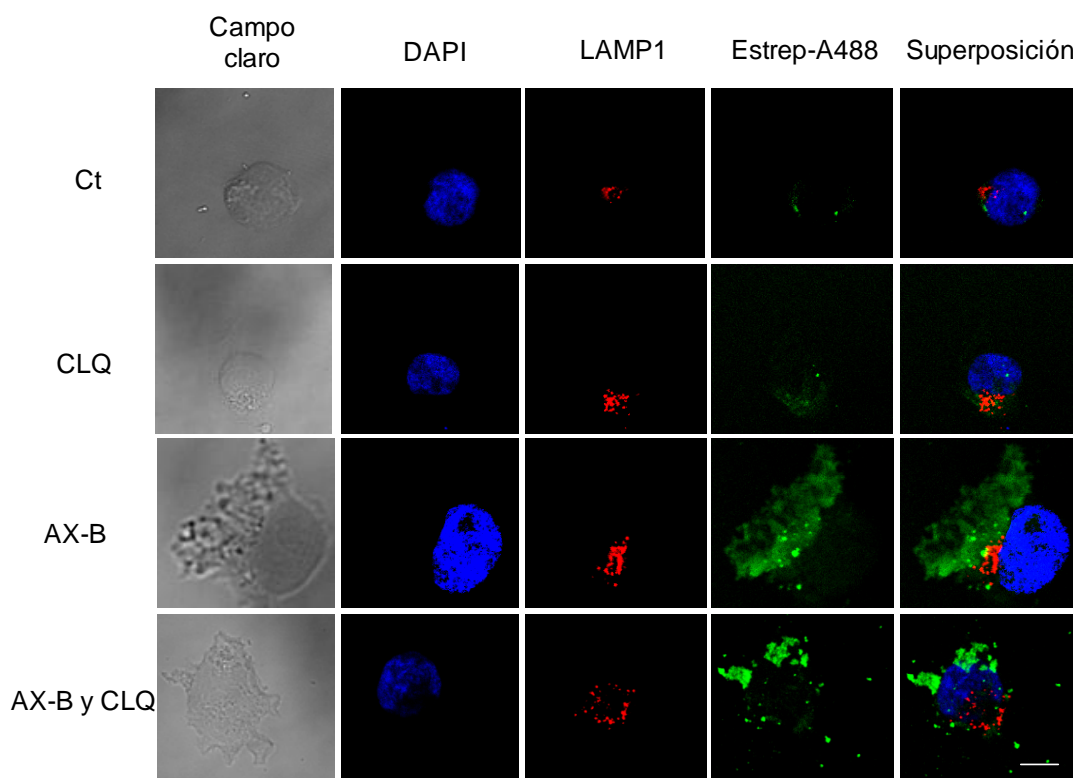


**Figura 24: Efecto de la inhibición de la vía lisosomal en los niveles de proteínas haptенizadas.** Las células RPMI 8866 se incubaron con cloroquina (CLQ) 10  $\mu$ M y con AX-B a 0,5 mg/ml durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se lisaron y los niveles de proteínas haptенizadas por AX-B se analizaron mediante Western blot y detección con Estrep-HRP. El nivel de carga de proteína se estimó por incubación de la misma membrana con anticuerpo frente a actina. La línea de puntos indica donde se han acercado dos calles del mismo gel.

A continuación, estudiamos la posible colocación de los lisosomas con las proteínas haptенizadas por AX-B. Para ello, los lisosomas se observaron mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo frente a la proteína LAMP1 (Figura 25), que es una proteína de la membrana interna de lisosomas y otros compartimentos ácidos de la célula (Pryor, 2012).

Al tratar las células con AX-B se observa un aumento en la señal de biotina, mientras que en las células sin tratar se observa señal de biotina probablemente asociada con las proteínas biotiniladas endógenas. Por otro lado, la señal de LAMP1 aumenta con todos los tratamientos. Sin embargo, en ningún caso se observa que la señal correspondiente a LAMP1 y la señal de biotina correspondiente a la AX-B colocalicen claramente.

Estos resultados parecerían indicar que el procesamiento por vía lisosomal de las proteínas haptенizadas por AX-B en este tipo celular no tiene una función relevante en el procesamiento de dichas proteínas.



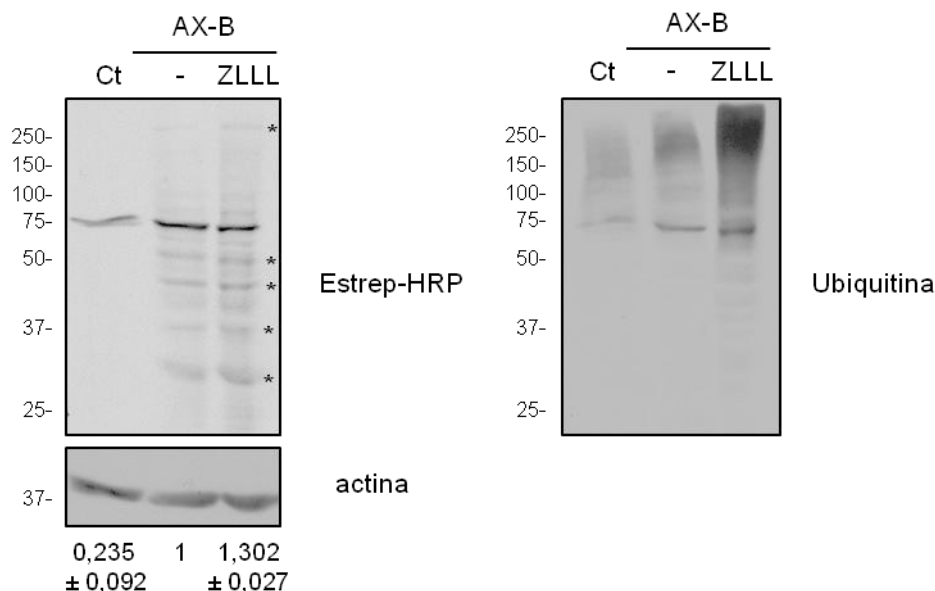
**Figura 25: Localización intracelular de las proteínas haptizadas por AX-B y de lisosomas.** Las células RPMI 8866 fueron tratadas con cloroquina 10  $\mu$ M y con AX-B a 0,5 mg/ml durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con Estrep-A488 para detectar la señal de biotina. Se incubaron además con anticuerpo frente a LAMP1 para observar la localización de los lisosomas y con DAPI para observar los núcleos. Se muestra una sola sección del eje z en un plano medio de la célula. Barra, 10  $\mu$ m.

### 3.2. Degradación por vía proteasomal de las proteínas haptizadas en linfocitos B

Según la hipótesis del hapteno, el proteasoma degradaría proteínas modificadas intracelularmente. Para explorar esta vía de procesamiento incubamos linfocitos B con un inhibidor del proteasoma, ZLLL (MG132) (Tsubuki y col., 1996), y analizamos las señales de biotina y de ubiquitina por SDS-PAGE y posterior inmunodetección con Estrep-HRP y anticuerpo frente a ubiquitina, respectivamente.

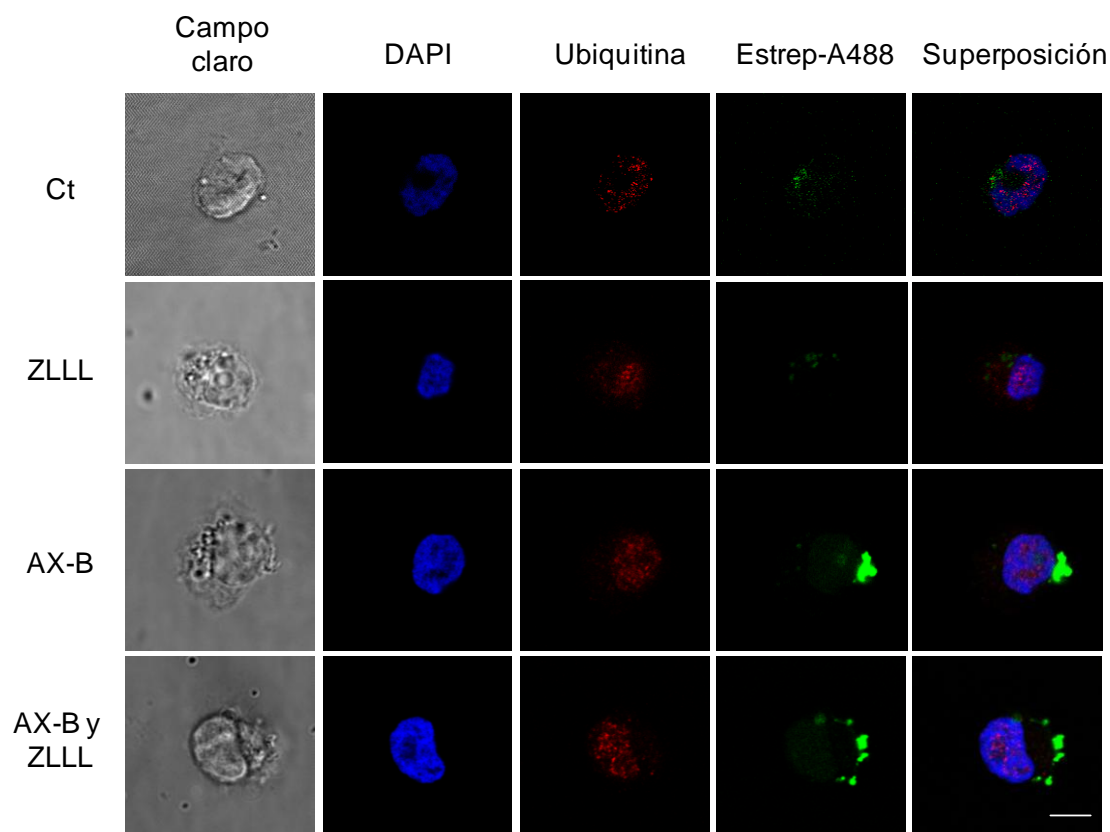
Observamos que el inhibidor del proteasoma indujo un ligero aumento de la señal de biotina en comparación con las células tratadas solo con AX-B (Figura 26), mientras que el patrón de bandas, de las cuales las más características están señaladas con asteriscos, se mantuvo. El tratamiento con

AX-B indujo un ligero aumento de la señal de ubiquitina, Por último, la adición de ZLLL a las células tratadas con AX-B indujo un potente aumento de la señal de ubiquitina. Este resultado parecería sustentar la idea de que en este tipo celular las proteínas haptinizadas por AX-B pueden estar siendo procesadas por el proteasoma.



**Figura 26: Efecto de la inhibición de la vía proteasomal en los niveles de proteínas haptinizadas.** Las células RPMI 8866 se incubaron con AX-B a 0,5 mg/ml en presencia o ausencia de ZLLL 50 nM durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se lisaron y los niveles de proteínas haptinizadas y ubiquitinadas se analizaron mediante Western blot con incubación con Estrep-HRP. El control de carga de proteína se estimó por incubación de la misma membrana con anticuerpo frente a actina y se estimó la señal relativa de biotina de cada tratamiento, reflejado en la parte inferior, como la media normalizada  $\pm$  error estándar de tres experimentos similares.

A su vez, estudiamos la posible colocación de la ubiquitina con la señal de biotina procedente de la AX-B mediante microscopía confocal de fluorescencia. De nuevo, observamos un aumento considerable de la señal de biotina con los tratamientos con AX-B (Figura 27). Además, la intensidad de la señal procedente de las proteínas ubiquitinadas aumentaba al tratar las células con ZLLL en comparación con las células control. Sin embargo, tampoco se observó colocación entre la señal de biotina y la de ubiquitina.



**Figura 27: Localización intracelular de las proteínas modificadas por AX-B y de proteínas ubiquitinadas.** Las células RPMI 8866 fueron tratadas con 0,5 mg/ml de AX-B y/o con ZLLL 50 nM durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con Estrep-A488 para detectar la señal de biotina. Se incubaron además con anticuerpo frente a ubiquitina para visualizar las proteínas ubiquitinadas y con DAPI para observar los núcleos. Se muestra una sola sección del eje z en el plano medio de la célula. Barra, 10  $\mu$ m.

En este modelo celular los resultados obtenidos no son lo suficientemente claros como para proponer de forma inequívoca la implicación de una de las dos vías de degradación en el procesamiento de las proteínas haptinizadas por amoxicilina. Por este motivo, decidimos estudiar estos procesos en otro tipo celular, en el que podrían operar mecanismos distintos.

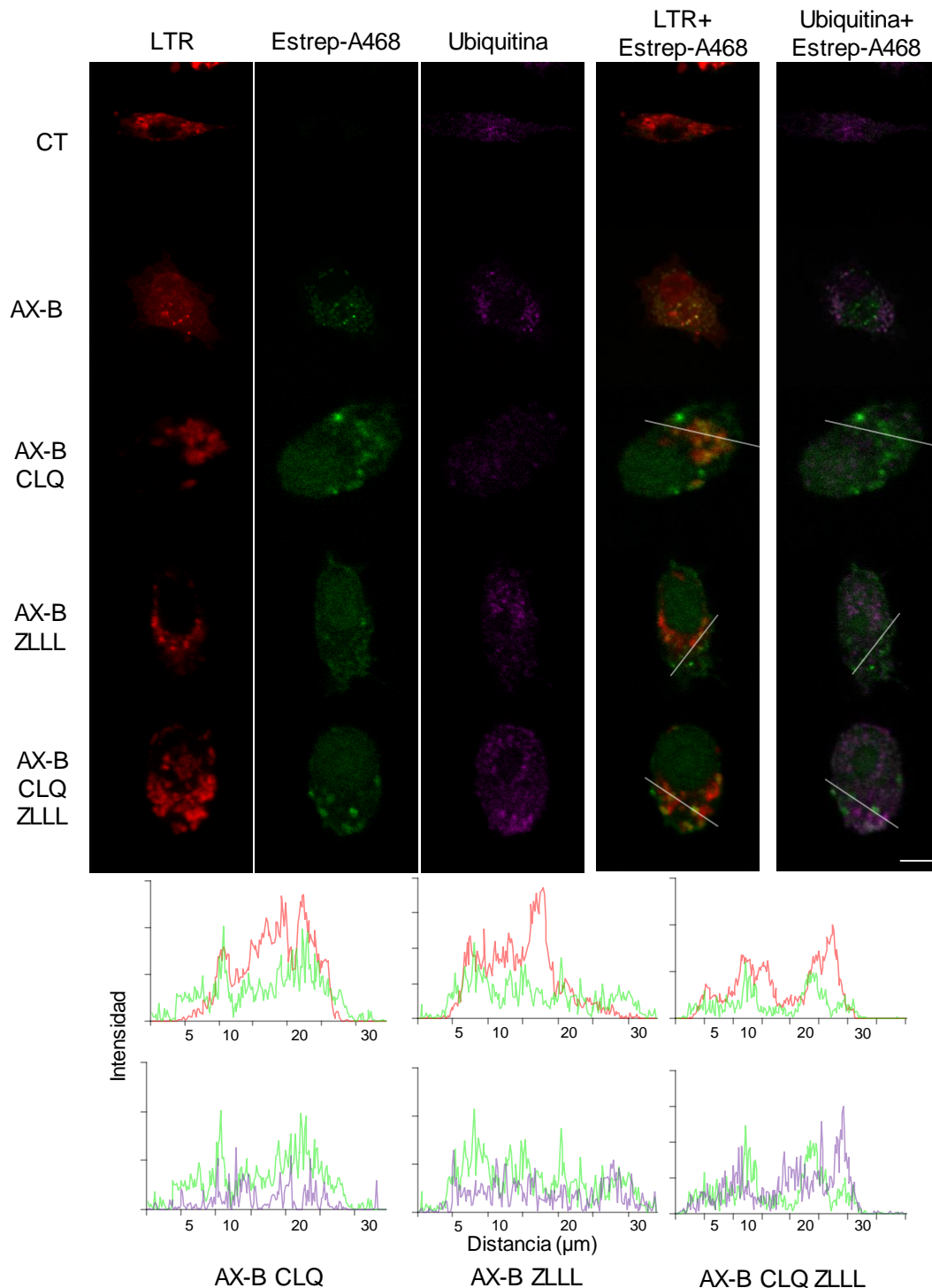
### 3.3. Degradación por vía lisosomal y proteasomal de las proteínas haptinizadas en macrófagos murinos

Como se ha comprobado en apartados anteriores, las células RAW 264.7 presentan también un patrón variado de proteínas haptinizadas por amoxicilina. Los macrófagos son células especializadas en fagocitar cuerpos

extraños como patógenos o restos celulares formando fagosomas. Los fagosomas formados se pueden fusionar con lisosomas para proceder a la degradación (Fairn y Grinstein, 2012; Gao y col., 2017). Por este motivo, estas células constituyen un excelente modelo para el estudio de vías de degradación o procesamiento.

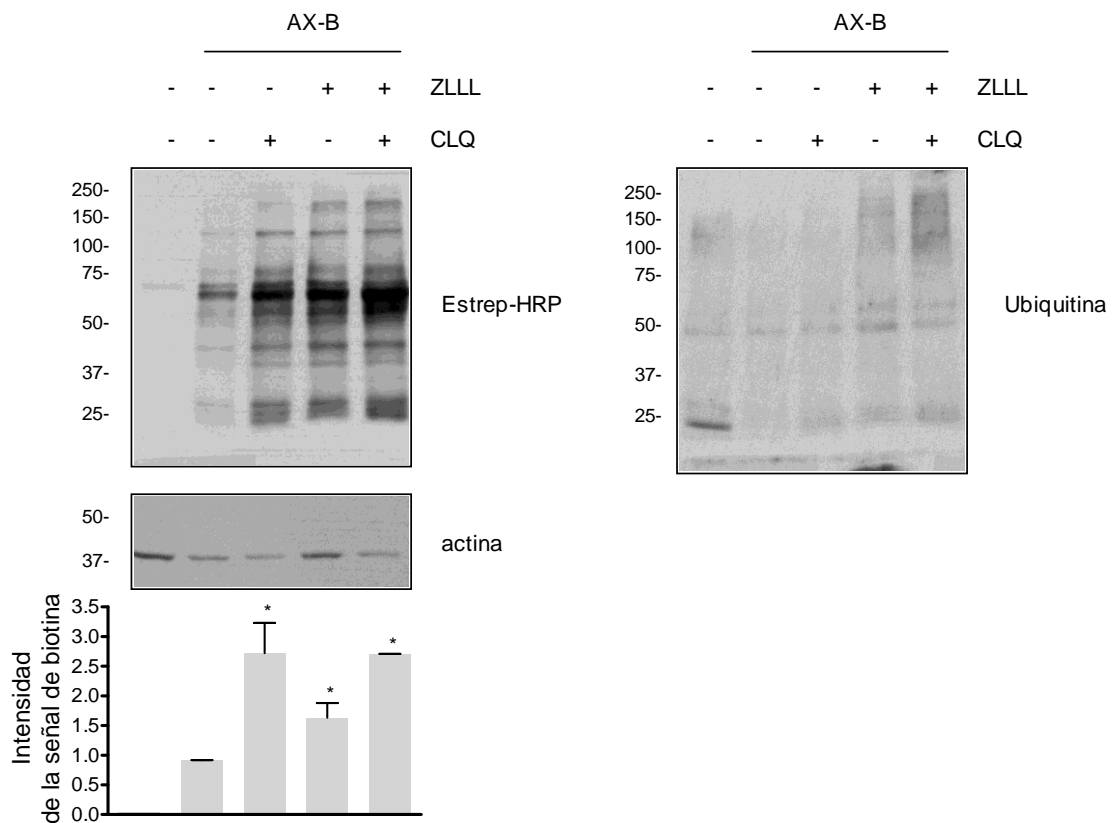
En primer lugar, analizamos la disposición en la célula de los compartimentos ácidos, proteínas haptinizadas y proteínas ubiquitinadas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Como se observa en la Figura 28, hay un aumento en la señal de biotina al tratar las células con amoxicilina biotinilada. Además, al inhibir las rutas de degradación lisosomal o proteasomal se observan acúmulos de lisosomas y de proteínas ubiquitinadas. Es importante destacar que, en este caso, podemos observar una clara colocalización entre la señal procedente de proteínas haptinizadas por AX-B y de la señal de lisosomas, lo que indicaría que, en estas células, las proteínas modificadas por este fármaco se están degradando por vía lisosomal. Sin embargo, la colocalización entre proteínas ubiquitinadas y haptinizadas no parece estar tan clara, observándose mayoritariamente en zonas donde la señal de biotina es menos intensa en la célula. Para obtener una representación objetiva de la distribución de estas proteínas, representamos los perfiles de intensidad de fluorescencia de las señales correspondientes (Figura 28, paneles inferiores), en los que se pueden observar los puntos de coincidencias entre ellas.





**Figura 28: Localización en células RAW 264.7 de proteínas modificadas por AX-B, de proteínas ubiquitinadas y de lisosomas.** Los macrófagos se trataron durante 16 horas con AX-B a 0,5 mg/ml, en presencia o ausencia de ZLLL 50 nM o CLQ 10 μM. Tras el tratamiento, los lisosomas de las células se tiñeron durante 15 minutos a 37°C con LTR 25 nM. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con Estrep-A488 para detectar la señal de biotina. Además, se incubaron con anticuerpo frente a ubiquitina para observar las proteínas ubiquitinadas. Se muestra una sola sección del eje z en el plano medio de la célula. Barra, 10 μm. En los paneles inferiores se muestra la intensidad de las señales de los canales a lo largo de la línea dibujada en las imágenes.

A continuación, analizamos lisados celulares de macrófagos tratados en las mismas condiciones experimentales con el fin de comprobar si se producía una acumulación de proteínas haptinizadas por amoxicilina al inhibir las rutas de degradación.



**Figura 29: Efecto de la inhibición de la vía proteasomal y de la vía lisosomal en los niveles de proteínas haptinizadas.** Las células RAW 264.7 se incubaron con AX-B a 0,5 mg/ml, con ZLLL 50 nM o con cloroquina 10  $\mu$ M durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se lisaron y los niveles de proteínas haptinizadas por AX-B se analizaron mediante Western blot con incubación con Estrep-HRP. El grado de ubiquitinación se analizó por detección con anticuerpo frente a ubiquitina sobre la misma membrana. El nivel de carga de proteína se estimó por incubación de la misma membrana con anticuerpo frente a actina. Se muestran imágenes representativas de un total de 3 experimentos. \*  $P < 0,05$  con respecto al tratamiento con AX-B.

Como se observa en la Figura 29, hay un claro aumento en los niveles de proteínas haptinizadas por AX-B al inhibir las rutas de degradación lisosomal o proteasomal con sus respectivos inhibidores. Además, este incremento se mantiene cuando se inhiben ambas rutas de degradación.

Este resultado, junto con el obtenido a partir de microscopía confocal, parecería indicar que en este tipo celular las proteínas haptinizadas por amoxicilina se podrían procesar por ambas vías, aunque la vía de degradación

lisosomal parece tener una implicación más clara dado el aumento de proteínas haptinizadas al inhibir la degradación lisosomal y la clara colocalización de estas proteínas con los lisosomas.

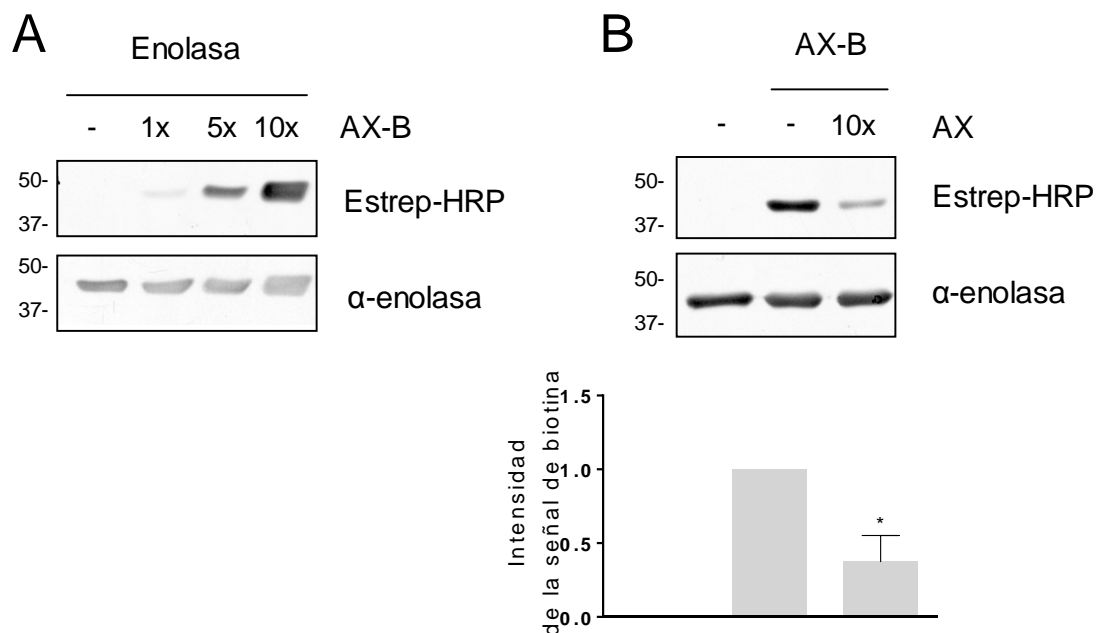
#### **4. ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE $\alpha$ -ENOLASA POR AMOXICILINA**

La  $\alpha$ -enolasa es una de las principales proteínas modificadas por amoxicilina, como se ha descrito en la sección 1 de Resultados. Esta proteína dimerica es una metaloenzima encargada de la transformación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la glucolisis. En este apartado analizaremos la haptenización de esta proteína por fármacos más detalladamente.

##### **4.1. Haptenización de $\alpha$ -enolasa por amoxicilina *in vitro***

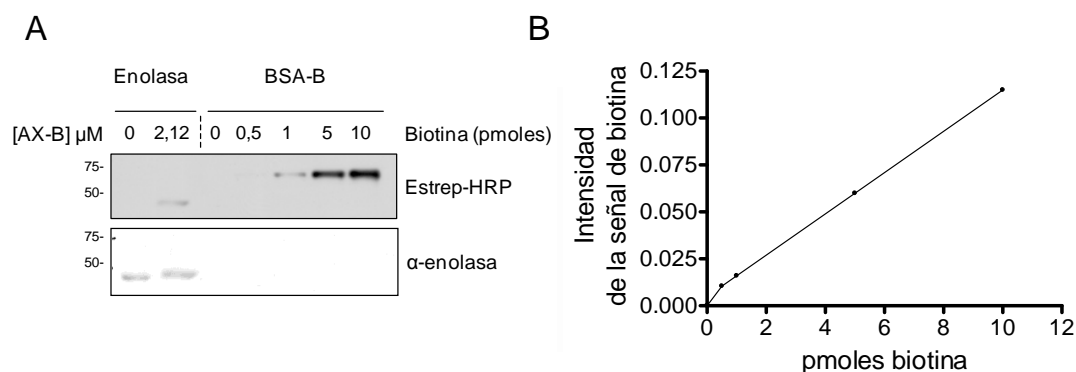
En primer lugar, confirmamos la modificación de la  $\alpha$ -enolasa por el análogo biotinilado de la amoxicilina *in vitro*. Como se observa en la Figura 30A, la incubación con AX-B da lugar a un incremento en la señal de biotina asociada a la proteína, dependiente de la concentración de AX-B en la reacción. Esto indica una incorporación de AX-B a la molécula de  $\alpha$ -enolasa estable en las condiciones de electroforesis monodimensional.

A continuación, exploramos la capacidad de AX de impedir la incorporación de AX-B para lo que incubamos en primer lugar la proteína con AX en exceso molar, con respecto a AX-B, y a continuación con AX-B. En este ensayo (Figura 30B), observamos una disminución de la señal de biotina, indicativa de una menor incorporación de AX-B en la proteína. Este resultado sugiere que ambos compuestos podrían estar compitiendo por la unión a los mismos sitios o residuos de la  $\alpha$ -enolasa.



**Figura 30: Haptización de  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina *in vitro*.** (A) Se incubó 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa a una concentración final de 2,12  $\mu$ M con los excesos molares indicados de AX-B durante 2 horas a 37° C en PBS. (B) Para el ensayo de competición se incubó 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa a una concentración final de 2,12  $\mu$ M con un exceso molar de 10 veces de AX durante 2 horas a 37° C. A continuación, la proteína se incubó con AX-B a 2,12  $\mu$ M, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. La gráfica muestra la cuantificación de la señal de biotina, detectada con Estrep-HRP y expresada como el cociente con la señal de  $\alpha$ -enolasa presente en la incubación detectada con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. \*  $P < 0,05$  con respecto al control.

Para estimar la incorporación de AX-B a la  $\alpha$ -enolasa comparamos la señal de biotina con la proporcionada por una curva patrón de albúmina sérica bovina biotinilada (BSA-B). En la Figura 31, estimamos que la incorporación es alrededor de 0,7 picomoles de AX-B en 21,2 picomoles de  $\alpha$ -enolasa (1:30,3 AX-B: $\alpha$ -enolasa). Este método semicuantitativo proporciona una estimación de la incorporación que persiste en condiciones de electroforesis monodimensional.

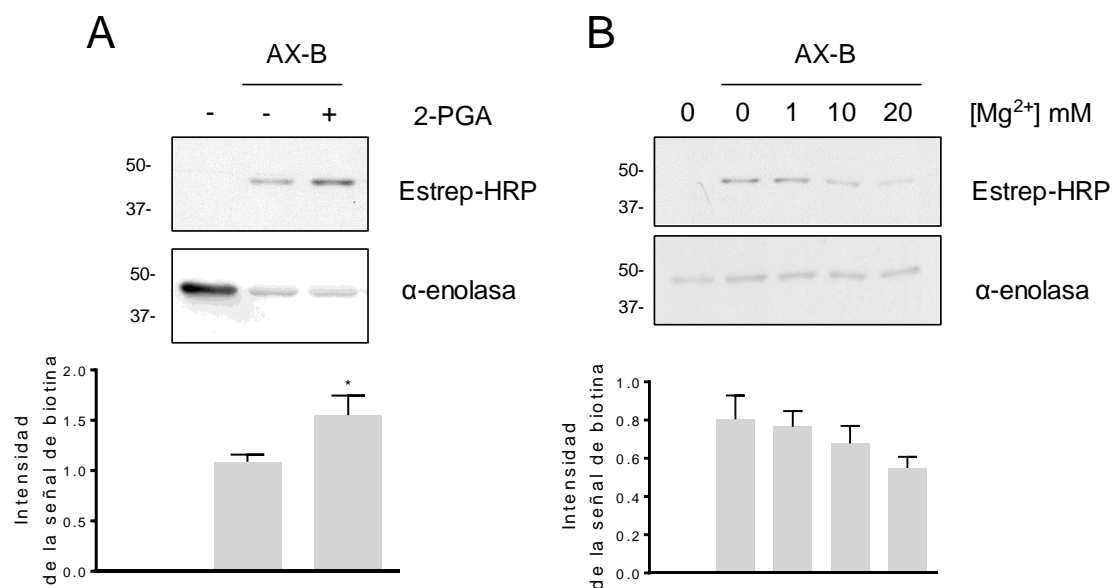


**Figura 31: Estimación de la haptización de  $\alpha$ -enolasa por AX-B.** (A) La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se incubó con AX-B 21,2  $\mu$ M en PBS durante 1 hora a 37 $^{\circ}$  C. La  $\alpha$ -enolasa con AX-B incorporada y alícuotas de albúmina sérica bovina biotinilada equivalentes a los picomoles de biotina indicados, se separaron en geles de poliacrilamida. La señal de biotina se detectó con Estrep-HRP. La intensidad de la señal de biotina se cuantificó con el programa informático Scion Image. (B) La incorporación de AX-B en la  $\alpha$ -enolasa se estimó por comparación con la curva patrón de BSA-B. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos similares.

#### 4.2. Efecto de cofactores y sustratos de la $\alpha$ -enolasa en la modificación por amoxicilina

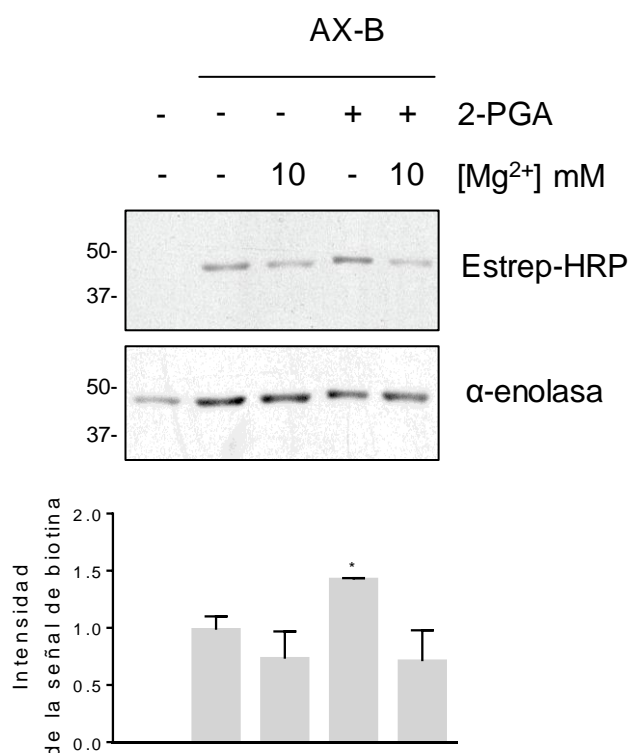
La  $\alpha$ -enolasa cataliza la transformación del 2-fosfoglicerato (2-PGA) en fosfoenolpiruvato, usando  $Mg^{2+}$  como cofactor en una reacción de hidratación. En este apartado estudiamos la modificación de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina en las condiciones de reacción.

En primer lugar, analizamos el efecto de la presencia del sustrato 2-PGA sobre la modificación de la  $\alpha$ -enolasa (Figura 32A). Al incubar la proteína con concentraciones milimolares del sustrato que son las típicamente empleadas en los ensayos enzimáticos (Fukano y Kimura, 2014), apreciamos un leve incremento en la incorporación de AX-B en la proteína. Además, estudiamos el efecto de la presencia del cofactor de esta enzima. El  $Mg^{2+}$  es necesario para la coordinación del sustrato con los aminoácidos del sitio catalítico. En la Figura 32B, se observa una tendencia a la disminución de la incorporación de AX-B a medida que aumenta la concentración de  $Mg^{2+}$ .



**Figura 32: Efecto del 2-PGA y del Mg<sup>2+</sup> en la modificación por amoxicilina.** (A) Se incubó 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa (2,12  $\mu$ M) en PBS con o sin 2-PGA 2,12 mM durante 1 hora a 37°C. A continuación, la proteína se incubó con AX-B 21,2  $\mu$ M en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. (B) Se incubó 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa (2,12  $\mu$ M) en PBS con diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> durante 1 hora a 37° C. Seguidamente, la proteína fue incubada con AX-B 21,2  $\mu$ M durante el mismo tiempo y a la misma temperatura. El análisis de la modificación se realizó en ambos casos por SDS-PAGE y posterior Western blot. La gráfica muestra la cuantificación de la señal de biotina, detectada con Estrep-HRP y expresada como el cociente con la señal de  $\alpha$ -enolasa detectada con el anticuerpo específico. \*  $P < 0,05$  con respecto a la incubación con AX-B.

A continuación, estudiamos la repercusión conjunta del cofactor y el sustrato sobre la haptización. Como se aprecia en la Figura 33, el efecto conjunto del sustrato y el cofactor bloquea el incremento de la incorporación de AX-B en la proteína por el sustrato.

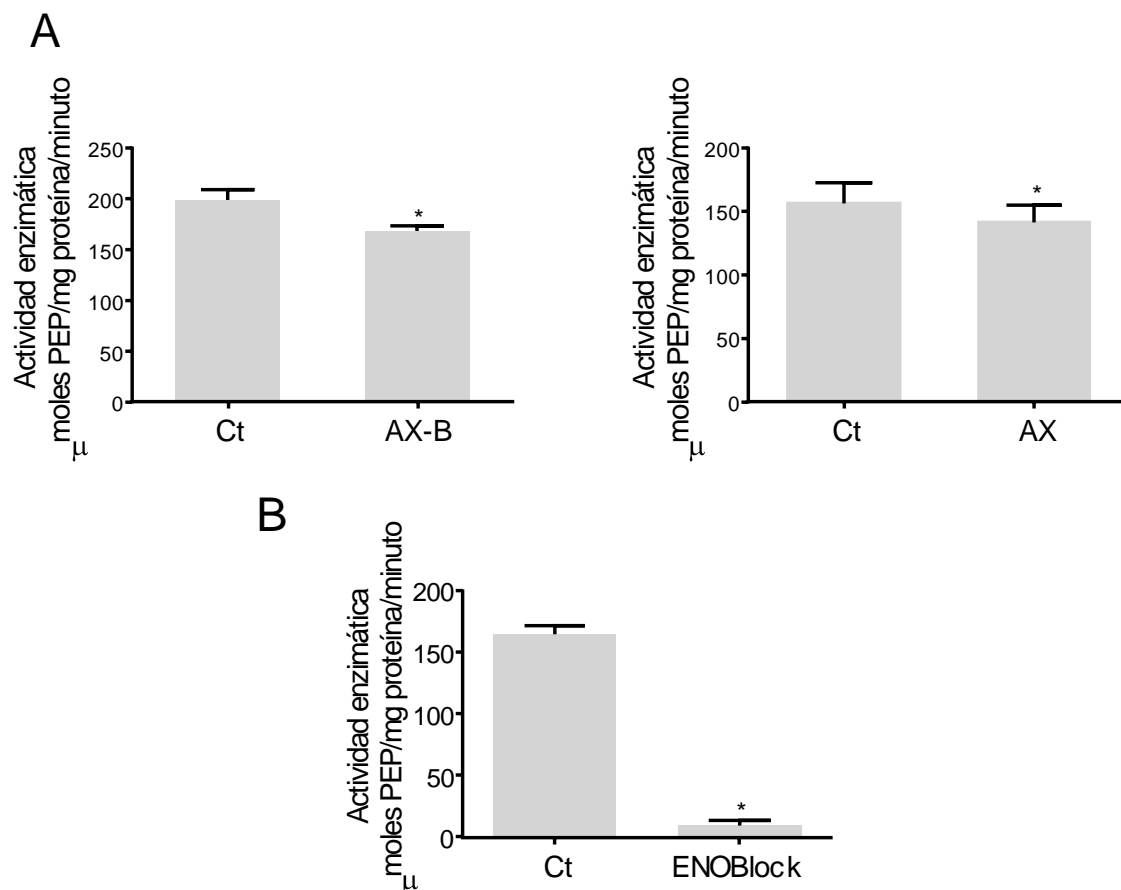


**Figura 33: Efecto conjunto del  $Mg^{2+}$  y el 2-PGA sobre la haptización de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina.** Se incubó 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa (2,12  $\mu$ M) en PBS en presencia o ausencia de 2-PGA 2,12 mM y/o  $Mg^{2+}$  10 mM durante 1 hora a 37° C. A continuación, la proteína se incubó con AX-B 21,2  $\mu$ M en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. El análisis de la modificación se realizó por SDS-PAGE y posterior Western blot y detección de la señal de biotina con Estrep-HRP e inmunodetección de la  $\alpha$ -enolasa. La gráfica muestra la cuantificación de la señal de biotina expresada como el cociente con la señal de  $\alpha$ -enolasa. \*  $P < 0,05$  con respecto a la incubación con AX-B.

#### 4.3. Efecto de la AX o AX-B sobre la actividad enzimática de la $\alpha$ -enolasa

La modificación de una proteína por diferentes compuestos o motivos estructurales puede alterar su función. Modificaciones como la fosforilación, acetilación o metilación pueden activar o inactivar distintas enzimas. En este apartado nos centraremos en la repercusión que tiene la presencia de amoxicilina en la función de la  $\alpha$ -enolasa.

La incubación de la  $\alpha$ -enolasa en presencia de AX o AX-B se tradujo en una reducción de la actividad enzimática como se muestra en la Figura 34A. El control positivo del bloqueo de la actividad de la enzima se realizó mediante incubación con el inhibidor no análogo al sustrato ENOBlock (Figura 34B), con el que se obtuvo una inhibición enzimática casi total.



**Figura 34: Análisis de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -enolasa.** (A) La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se incubó en presencia o ausencia de AX 21,2  $\mu$ M o AX-B 21,2  $\mu$ M durante 1 hora a 37 $^{\circ}$  C. A continuación, la actividad de la proteína se midió en 1 ml de tampón de reacción en presencia de  $Mg^{2+}$  y el sustrato 2-PGA. La cantidad de producto fosfoenolpiruvato (PEP) formado se analizó midiendo la absorbancia a 220 nm. Se representa la media de cinco experimentos. (B) El control positivo del bloqueo de la actividad enzimática se realizó en 1 ml de tampón de reacción en presencia de 1  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa y ENOBlock 100  $\mu$ M. \* $P < 0,05$  en todos los casos con respecto al control.

La presencia de AX o de AX-B redujo la actividad total de la proteína, de forma leve pero significativa, en torno a un 10% o un 15% respectivamente. Esta disminución podría estar provocada por cambios conformacionales en la proteína o por un bloqueo parcial del sitio catalítico.

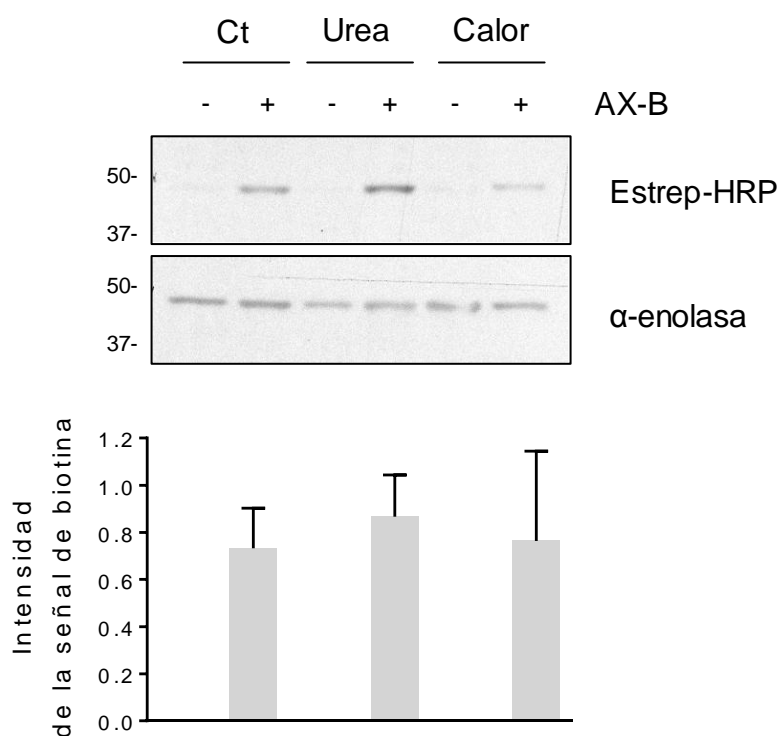
#### 4.4. Relación entre la integridad de la proteína y la modificación por amoxicilina

La desnaturalización de proteínas implica la pérdida de la estructura terciaria, provocando la exposición de residuos o sitios que pueden ser



susceptibles de ser modificados por fármacos. Para explorar si la modificación por amoxicilina dependía de la conservación de la estructura de la proteína, la  $\alpha$ -enolasa se desnaturizó mediante incubación con urea a 7 M o incubación a 95°C durante 10 minutos.

No se apreciaron diferencias significativas en el nivel de modificación de esta proteína con ninguno de los tratamientos de desnaturización (Figura 35). Este resultado podría indicar que la desnaturización no conlleva la exposición de más sitios susceptibles de modificación. También sugeriría que la modificación no requiere un sitio conformacional especial.

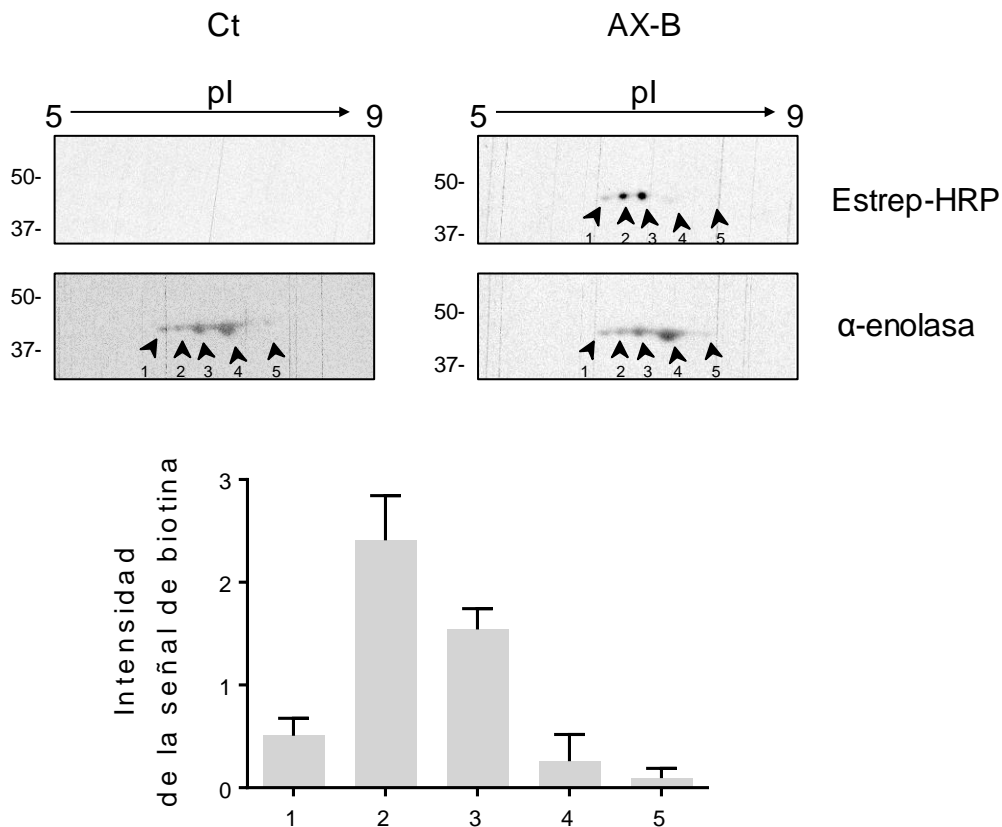


**Figura 35: Efecto de la desnaturización de la  $\alpha$ -enolasa sobre la modificación por AX-B.** La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se desnaturizó con urea 7 M o con calor a 95°C durante 10 minutos. A continuación, la proteína se incubó a una concentración de 2,12  $\mu$ M con AX-B 21,2  $\mu$ M durante 1 hora a 37°C. El grado de modificación se analizó por SDS-PAGE y posterior detección con Estrep-HRP. La proteína presente en la incubación se detectó con un anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos. No se encontraron diferencias significativas.

#### 4.5. Estudio de la incorporación de AX-B a formas de la enolasa con distinto punto isoeléctrico

Como observamos en el apartado de Resultados 1.3, la  $\alpha$ -enolasa que se obtiene de linfocitos se separa por electroforesis bidimensional en varias formas que difieren en su punto isoeléctrico. Estas distintas formas podrían deberse a la presencia de modificaciones postraduccionales. Además, no todas las formas se modifican por AX-B en la misma proporción.

En este apartado analizamos más detalladamente la modificación de dichas formas *in vitro*. Para ello, realizamos electroforesis bidimensional de la proteína recombinante modificada con AX-B (Figura 36).



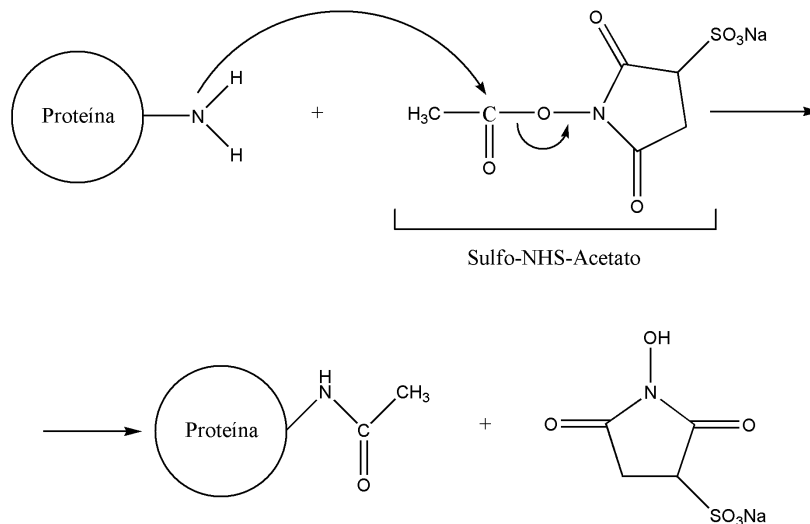
**Figura 36: Cuantificación de la modificación de las formas de la  $\alpha$ -enolasa por AX-B.** Se incubaron 4  $\mu$ g de  $\alpha$ -enolasa con AX-B 21,2  $\mu$ M durante 1 hora a 37 $^{\circ}$  C. A continuación, la proteína se precipitó con el protocolo metanol/cloroformo y se analizó mediante electroforesis bidimensional basada en isoelectroenfoque en un rango de pH de 3 a 10. La modificación de las formas de la  $\alpha$ -enolasa, numeradas del 1 al 5, se detectó con Estrep-HRP. La  $\alpha$ -enolasa se detectó mediante Western blot. La gráfica muestra la intensidad de la señal de biotina como valores medios  $\pm$  el error estándar de la media de 3 experimentos.

La inmunodetección de la  $\alpha$ -enolasa muestra un patrón de 5 manchas que es similar en el control y en la muestra tratada. Con respecto a la modificación por AX-B, hay una mayor haptización de las formas que tienen un punto isoelectrico más ácido, posiblemente debido a modificaciones postraduccionales como fosforilación o acetilación, entre otras. Estas modificaciones podrían favorecer la unión de la AX-B a la proteína.

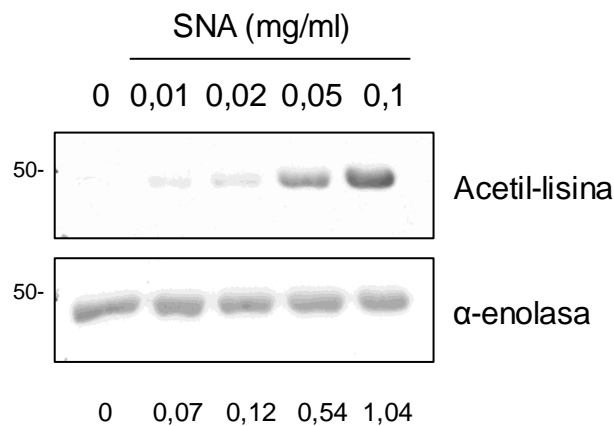
#### **4.6. Efecto de la acetilación en la modificación de $\alpha$ -enolasa por amoxicilina**

La  $\alpha$ -enolasa puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales, como fosforilación, metilación o acetilación, que pueden alterar su punto isoelectrico. Además, se han detectado patrones específicos de estas modificaciones en diversas situaciones fisiopatológicas (Capello y col., 2011). En particular, la acetilación ocurre más frecuentemente en lisinas, que son los aminoácidos más susceptibles de modificación por amoxicilina (Ariza y col., 2012). Por ello, en este apartado, exploramos la repercusión de la acetilación inducida *in vitro* sobre la haptización de la  $\alpha$ -enolasa por AX-B.

En primer lugar, incubamos la proteína con concentraciones crecientes del reactivo de acetilación sulfo-NHS-acetato (SNA), que reacciona con aminas primarias de la proteína (Esquema 10). La proteína, una vez acetilada, fue analizada por SDS-PAGE y Western blot (Figura 37). Esto demostró un incremento en el grado de acetilación de la proteína dependiente de la concentración del compuesto sulfo-NHS-acetato. Sin embargo, bajo estas condiciones, no observamos señal de acetilación en el control.



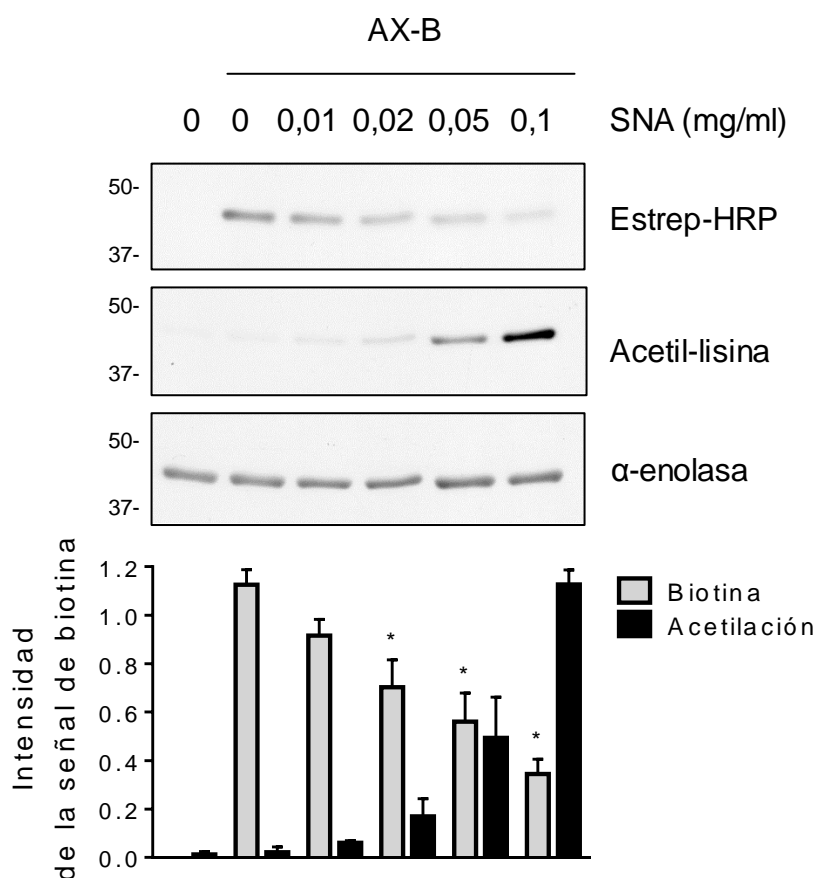
**Esquema 10: Reacción de acetilación producida por el compuesto sulfo-NHS-acetato en grupos amino de las proteínas.** El nitrógeno del grupo amino de la proteína reacciona con el carbono del grupo acetilo del reactivo, resultando en un enlace covalente entre el grupo amino y el acetil y, por tanto, acetilando la proteína.



**Figura 37: Acetilación de  $\alpha$ -enolasa por SNA *in vitro*.** La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se incubó a una concentración de 2,12  $\mu$ M con diferentes concentraciones de Sulfo-NHS-Acetato en excesos molares de 18X, 36X, 90X y 180X durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se añadió Tris a una concentración equivalente a la de SNA. El grado de acetilación se estimó por SDS-PAGE y posterior Western blot con un anticuerpo frente a acetil-lisina y la cantidad de proteína por incubación de la membrana con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la señal de acetil-lisina con respecto de la señal de  $\alpha$ -enolasa de un experimento representativo.

A continuación, exploramos el efecto de concentraciones crecientes de SNA sobre la modificación de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina biotilada. Tras la incubación con SNA, la  $\alpha$ -enolasa fue incubada con AX-B 21.2  $\mu$ M y las mezclas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot. En la Figura

38 podemos observar, un aumento progresivo de la acetilación al aumentar la cantidad del reactivo SNA. A su vez, se aprecia una disminución progresiva de la señal de biotina a medida que aumenta la acetilación de la proteína. La reducción de la haptización resulta significativa a partir de una concentración de SNA de 0,02 mg/ml. Este resultado sugiere una correlación entre el bloqueo de lisinas o de otros aminoácidos por acetilación y la disminución de la incorporación de AX-B en esta proteína.

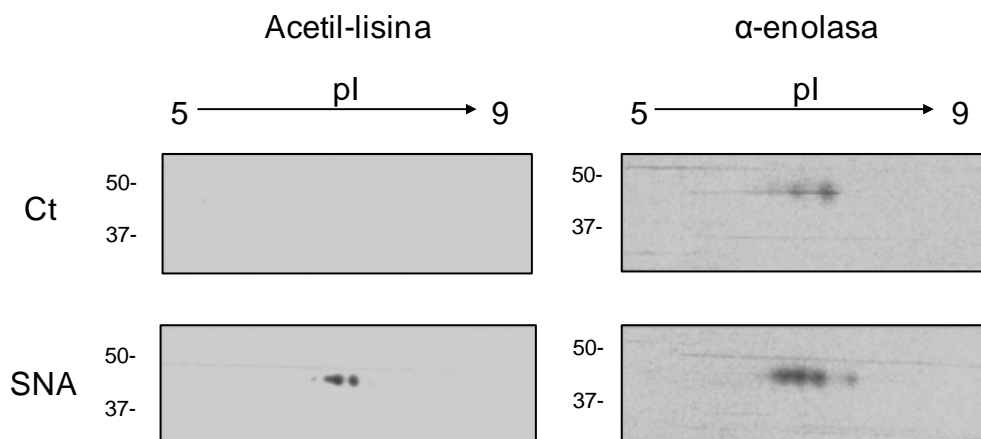


**Figura 38: Bloqueo de la haptización de  $\alpha$ -enolasa por AX-B por acetilación.** La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se acetiló con diferentes concentraciones de SNA en excesos molares de 18X, 36X, 90X y 180X durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la acetilación, se añadió Tris en cantidad equivalente a la de SNA. El Tris añadido a la reacción no afectó a la modificación por amoxicilina. A continuación, la proteína se incubó con AX-B 21,2  $\mu$ M durante 1 hora a 37° C. El grado de modificación se analizó por SDS-PAGE y posterior Western blot con Estrep-HRP. La señal correspondiente a la acetilación se obtuvo por inmunodetección con el anticuerpo frente a acetil-lisina 1:5000 y el control de carga por incubación de la membrana con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos similares. \* $P < 0.05$  con respecto a la incubación con AX-B sin SNA.

#### 4.6.1. Repercusión de la acetilación *in vitro* en las distintas formas modificadas de la proteína

La posible importancia de la acetilación en la haptización de la  $\alpha$ -enolasa por AX-B nos llevó a estudiar con más detalle la acetilación *in vitro* de las distintas formas de la proteína que se separan mediante electroforesis bidimensional.

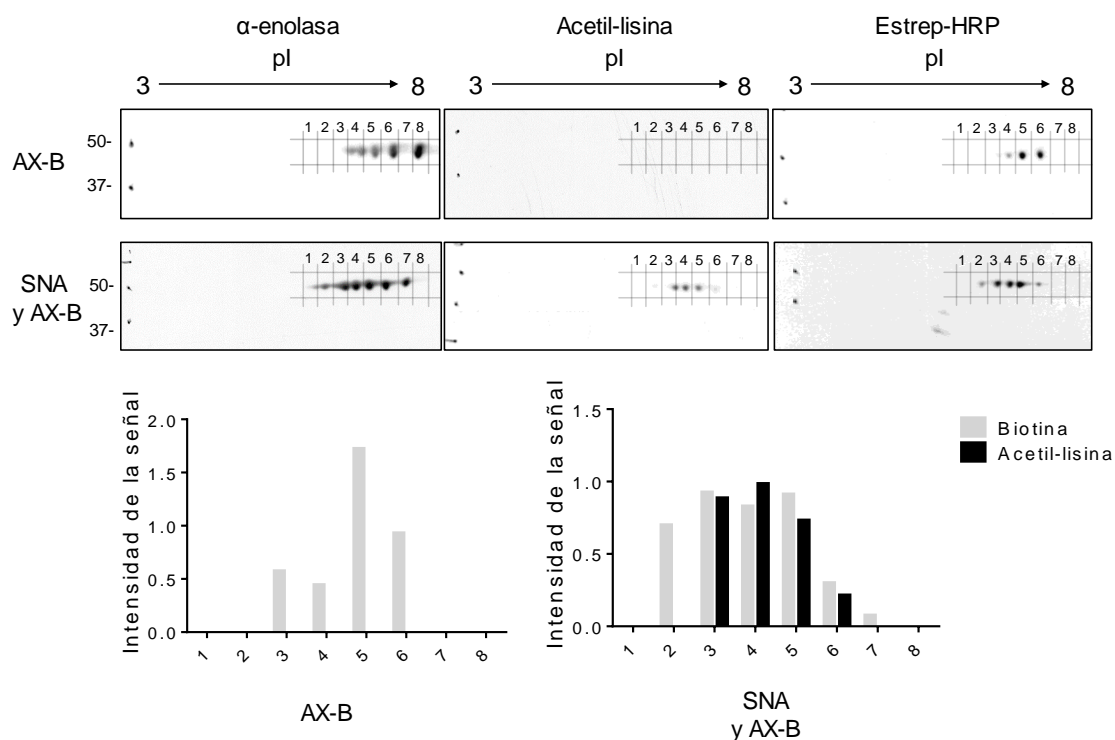
Tras la acetilación *in vitro*, observamos un cambio en el patrón de la proteína, con un incremento en la abundancia de formas de punto isoelectrónico más bajo que, además, presentan señal positiva con el anticuerpo frente a acetil-lisina (Figura 39). Este efecto concuerda con el hecho de que la acetilación conlleva potencialmente una disminución de las cargas positivas de la proteína.



**Figura 39: Electroforesis bidimensional de  $\alpha$ -enolasa recombinante acetilada *in vitro*.** Se acetilaron 4  $\mu$ g de proteína con 0,4  $\mu$ g de SNA (en un exceso molar de 180X) durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína se precipitó con metanol-cloroformo y se analizó mediante electroforesis bidimensional. El grado de modificación por acetilación se analizó mediante Western blot con anti acetil-lisina. El control de carga se realizó por incubación con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. Se muestra una imagen representativa de un total de tres experimentos similares.

A continuación, realizamos electroforesis bidimensional de la proteína acetilada *in vitro* e incubada con AX-B. En este caso observamos de nuevo un desplazamiento de las manchas de proteína hacia pI más bajos inducido por la acetilación (Figura 40). Además, curiosamente, se observan algunas diferencias en cuanto al patrón de modificación. Para apreciar mejor estas diferencias se ha representado una cuadrícula que marca las posiciones

equivalentes en los geles. En la representación gráfica de la intensidad de la señal de biotina con respecto al punto isoeléctrico de las manchas apreciamos una mayor haptización por AX-B de las formas de la proteína situadas en puntos isoeléctricos más bajos cuando se acetila previamente, es decir, la señal de biotina se desplaza hacia la izquierda.



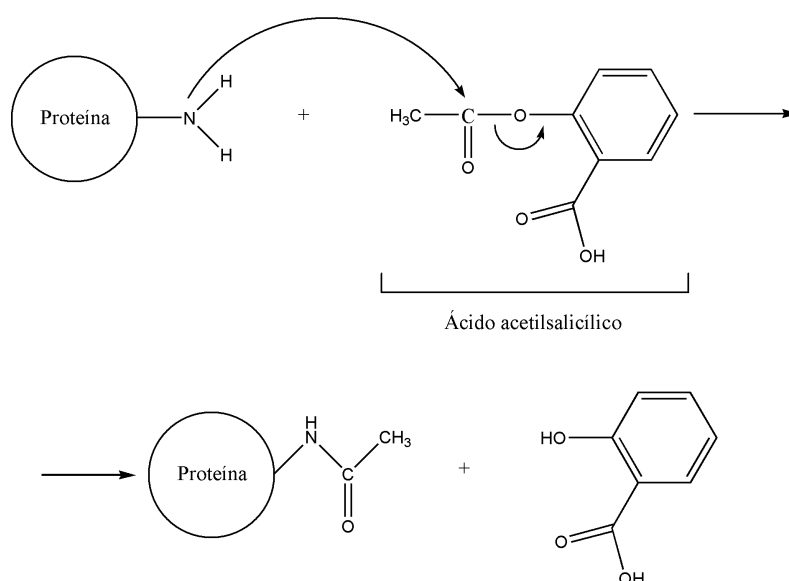
**Figura 40: Electroforesis bidimensional de  $\alpha$ -enolasa recombinante acetilada *in vitro* y haptizada por AX-B.** Se acetilaron 4  $\mu$ g (2,12  $\mu$ M) de proteína con 4  $\mu$ g (0,38 mM) de sulfo-NHS-acetato durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la acetilación, se añadió Tris en cantidad equivalente a la de SNA. A continuación, la proteína se modificó con AX-B 21,2  $\mu$ M durante 1 hora a 37° C. La proteína se precipitó con el protocolo metanol/cloroformo y se realizó electroforesis con el objetivo de separar las distintas formas modificadas de la proteína en función de su punto isoeléctrico. La modificación por AX-B o por acetilación se analizó mediante Western blot e incubación con Estrep-HRP o con anticuerpo frente a acetil-lisina, respectivamente. El control de carga se realizó por incubación con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa. Se muestra una imagen representativa de un total de tres experimentos similares. En la parte inferior se representa la intensidad de señal de biotina o de acetil-lisina correspondiente a cada cuadrícula de este experimento corregida por la señal de  $\alpha$ -enolasa.

#### 4.6.2. Acetilación de $\alpha$ -enolasa por ácido acetilsalicílico *in vitro*

La acetilación de proteínas puede ocurrir de forma enzimática mediante la acción de enzimas N-alfa-acetiltransferasas (Van Damme y col., 2011), o no enzimática por exposición a ciertos fármacos. En concreto, se ha descrito que

el ácido acetilsalicílico es capaz de acetilar proteínas (Ai y col., 2016; Liyasova y col., 2010).

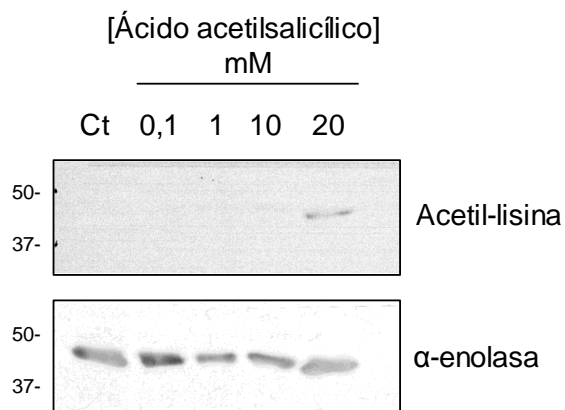
Por ello exploramos la acetilación de la  $\alpha$ -enolasa por acción de la aspirina. Estos ensayos tienen la doble utilidad de servir como un control adicional y además de plantear la posibilidad de interacción entre la haptización de proteínas y otros tipos de modificación inducidos por fármacos. La reacción de acetilación de la aspirina se produce como se representa en el Esquema 11. Esta reacción resulta ser idéntica teóricamente a la producida por el SNA.



**Esquema 11: Reacción de acetilación producida por el ácido acetilsalicílico en grupos amino de las proteínas.**

Para estimar el grado de acetilación producido por el ácido acetilsalicílico en la  $\alpha$ -enolasa, incubamos la proteína con diferentes concentraciones de este fármaco y llevamos a cabo detección por Western blot (Figura 41). Observamos señal correspondiente a la acetilación de lisinas con una concentración de aspirina de 20 mM, es decir, fue necesario emplear concentraciones muy altas del fármaco para poder observar la acetilación en condiciones *in vitro*.



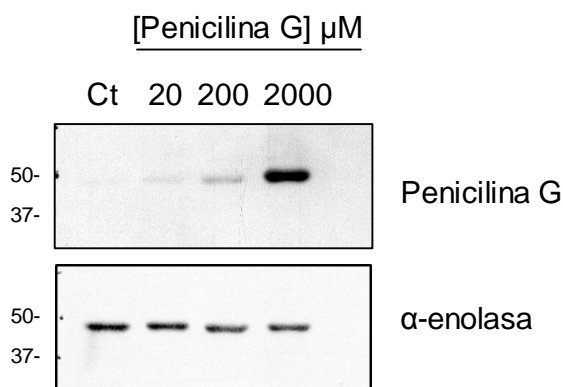


**Figura 41: Acetilación *in vitro* de  $\alpha$ -enolasa por ácido acetilsalicílico.** La  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se incubó en PBS a una concentración de 2,12  $\mu$ M con distintas concentraciones de aspirina durante 1 hora a 37° C. La señal correspondiente a la acetilación se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo frente a acetil-lisina. El control de carga se analizó por incubación con anticuerpo frente a  $\alpha$ -enolasa.

Este resultado sugiere que la acetilación por ácido acetilsalicílico no es tan efectiva como la producida por el SNA, sin embargo, ambos compuestos son capaces de acetilar la  $\alpha$ -enolasa.

#### 4.7. Modificación de $\alpha$ -enolasa por penicilina

La haptización de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina parece ser una reacción específica que afecta a su función y depende de otras modificaciones, sin embargo, no se conoce si esta proteína se haptiza solo por este betaláctamico, o también por otros fármacos de la misma familia. Para comprobarlo, incubamos la proteína con excesos molares crecientes de penicilina G. Observamos un incremento en la incorporación de penicilina detectada mediante Western blot con un anticuerpo selectivo frente a este antibiótico (Figura 42). Sin embargo, dada la distinta sensibilidad de los métodos de detección empleados, este tipo de ensayo no nos permite establecer si la haptización de la  $\alpha$ -enolasa por la penicilina es más o menos eficiente que la haptización por amoxicilina. Se requerirían estudios de espectrometría de masas para poder corroborar cuál de los dos fármacos se une más eficientemente a la  $\alpha$ -enolasa.



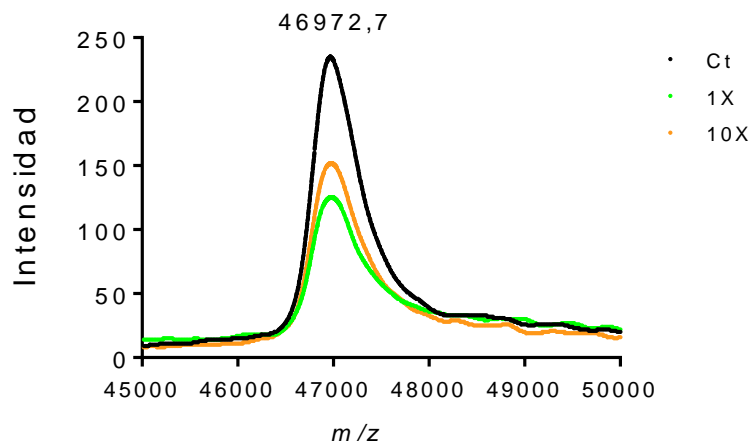
**Figura 42: Haptización de α-enolasa recombinante por penicilina G *in vitro*.** La α-enolasa (1 µg) se incubó en PBS a una concentración de 2,12 µM con distintas concentraciones de penicilina G durante 1 hora a 37° C. La señal correspondiente a la modificación por penicilina G se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo frente a este fármaco. El control de carga se analizó por incubación con anticuerpo frente a α-enolasa.

#### 4.8. Análisis de la α-enolasa modificada por AX *in vitro* mediante espectrometría de masas

Nuestros resultados indican que la α-enolasa es una de las principales dianas celulares de amoxicilina. Por este motivo, realizamos un análisis más detallado de su haptización mediante espectrometría de masas. En primer lugar, se realizó MALDI-TOF MS y ESI-MS para comprobar el aumento de masa en la proteína debido a la incorporación del fármaco. En segundo lugar, se procedió a la identificación de los residuos que resultaban modificados por amoxicilina mediante análisis con un espectrómetro de masas de alta resolución LTQ Orbitrap XL.

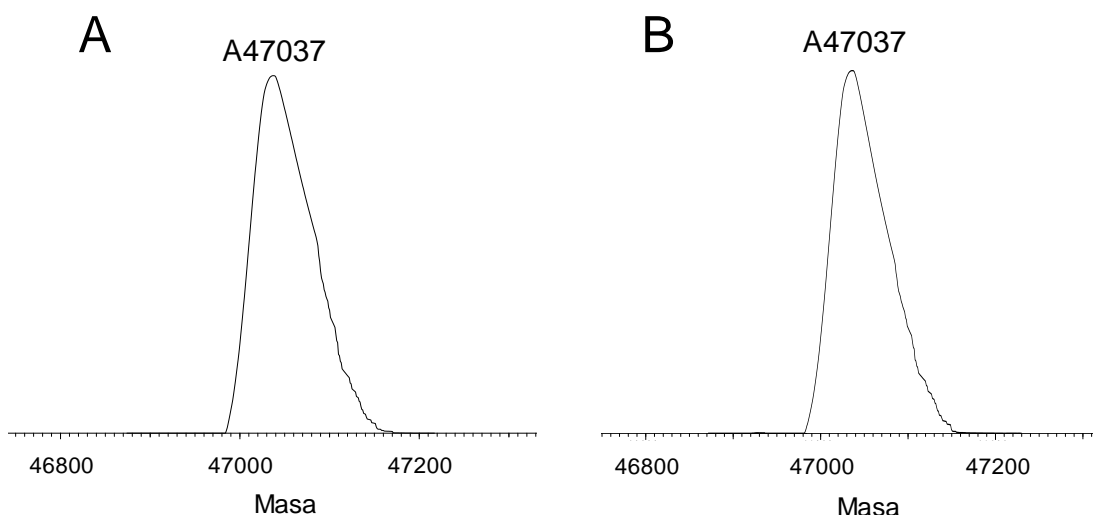
##### 4.8.1. Caracterización de la haptización de α-enolasa mediante MALDI-TOF MS y ESI-MS

El abordaje llevado a cabo por MALDI-TOF MS (Figura 43) mostró un pico en torno a 47 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína; sin embargo, no se apreciaron otros picos que pudiesen corresponder con el aumento de masa producido por la incorporación de la amoxicilina.



**Figura 43: Análisis de la  $\alpha$ -enolasa por MALDI-TOF MS.** La proteína  $\alpha$ -enolasa (1  $\mu$ g) se incubó a una concentración de 2,12  $\mu$ M con amoxicilina a 2,12  $\mu$ M (1X) o con 21,2  $\mu$ M (10X) durante 1 hora a 37° C, y la mezcla se analizó mediante MALDI-TOF MS.

Por otro lado, en el análisis mediante ESI-MS, el espectro deconvolucionado de la muestra no modificada presentó un pico de 47037 Da correspondiente a la  $\alpha$ -enolasa (Figura 44A). Sin embargo, en el espectro deconvolucionado de la proteína tras 3 horas de incubación con amoxicilina no mostró diferencias aparentes (Figura 44B). Los resultados obtenidos tanto por MALDI-TOF MS como por ESI-MS pueden ser debidos a una baja proporción de la modificación en las condiciones de incubación, a que esta técnica no sea la más adecuada en este caso o que la proteína modificada se ionice peor.

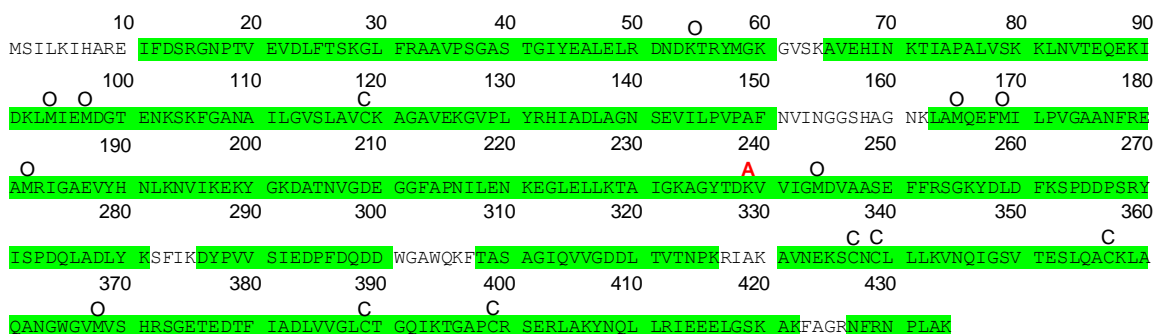


**Figura 44: Análisis de la  $\alpha$ -enolasa mediante ESI-MS.** Espectro de MS deconvolucionado obtenido a partir de la infusión directa de  $\alpha$ -enolasa incubada previamente con AX durante 3 horas a 37°C en PBS a una proporción molar  $\alpha$ -enolasa:AX de 1:10. Los picos que se muestran corresponden a la proteína al comienzo de la incubación (A) y transcurridas las 3 horas de incubación (B).

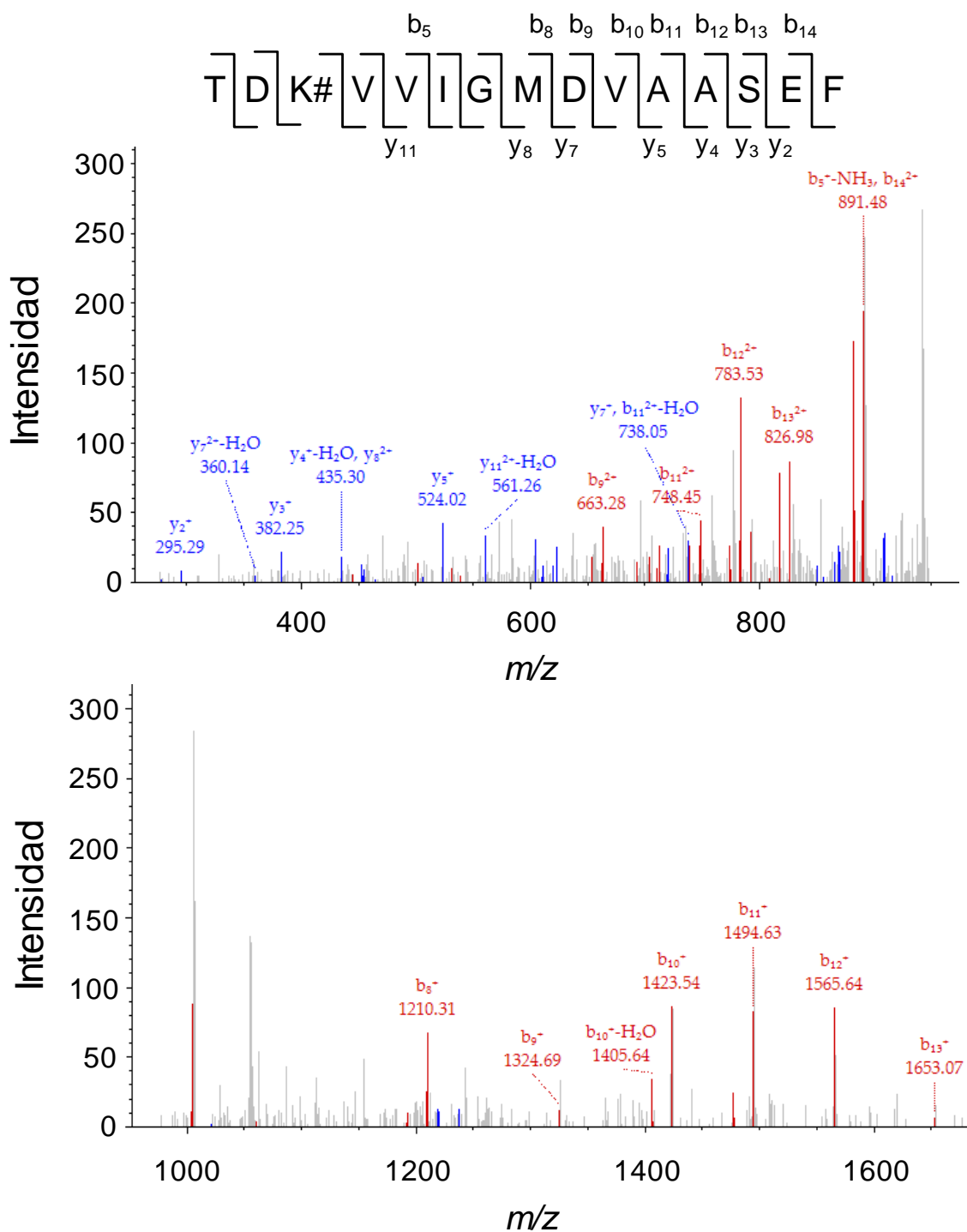
#### 4.8.2. Identificación de los sitios de modificación de la $\alpha$ -enolasa por AX mediante LTQ Orbitrap XL

Dado que los abordajes utilizando la proteína completa (“*top-down*”) no nos permitieron observar la modificación por AX, llevamos a cabo abordajes utilizando la proteína digerida (“*bottom-up*”) para intentar detectar péptidos modificados. Para llevar a cabo la identificación de los posibles péptidos modificados, la proteína recombinante se incubó a una proporción  $\alpha$ -enolasa:AX de 1:1000 durante 16 horas a 37°C. A continuación, se procedió a la digestión de la proteína en gel de electroforesis mediante tripsina y quimotripsina. Esta última enzima se utilizó debido a la pérdida de efectividad de la tripsina sobre las lisinas modificadas y para evitar de este modo que se obtuviesen péptidos demasiado largos.

La identificación de los péptidos modificados por amoxicilina se basó en la incorporación de la molécula a aminoácidos nucleofílicos como la histidina, serina, cisteína y, principalmente, la lisina. Esta incorporación debería producir un aumento de masa de 365 Da, correspondiente al peso molecular de la amoxicilina. La digestión de la proteína proporcionó una cobertura del 89,40% de la secuencia total, incluyendo de este modo la mayoría de lisinas susceptibles de ser haptenizadas (Figura 45). De los péptidos que se obtuvieron a partir de la digestión, uno de ellos, <sup>237</sup>TDKVVIGMDVAASEF<sup>251</sup>, presentó un aumento de masa compatible con la incorporación de amoxicilina.



**Figura 45: Cobertura de la secuencia de la  $\alpha$ -enolasa.** Resaltadas en verde se muestran las zonas de la secuencia identificada. En la parte superior de la secuencia se detallan las modificaciones detectadas: carbamidometilaciones (C), oxidaciones (O), haptениización por amoxicilina (A).



**Figura 46: Espectro de MS/MS del péptido modificado  $^{237}\text{TDK}\#\text{VVIGMDVAASEF}^{251}$  (K239-AX) con  $m/z$  973,95;  $z=2$ .** El espectro fue recogido en el modo de disociación inducida por colisión (CID) en un rango de 150 a 950  $m/z$  en la parte superior y de 950 a 1650  $m/z$  en la parte inferior. El espectro se caracteriza por la presencia de las series “b” e “y” de iones, cuyo análisis es compatible con la modificación de la lisina 239 por amoxicilina.

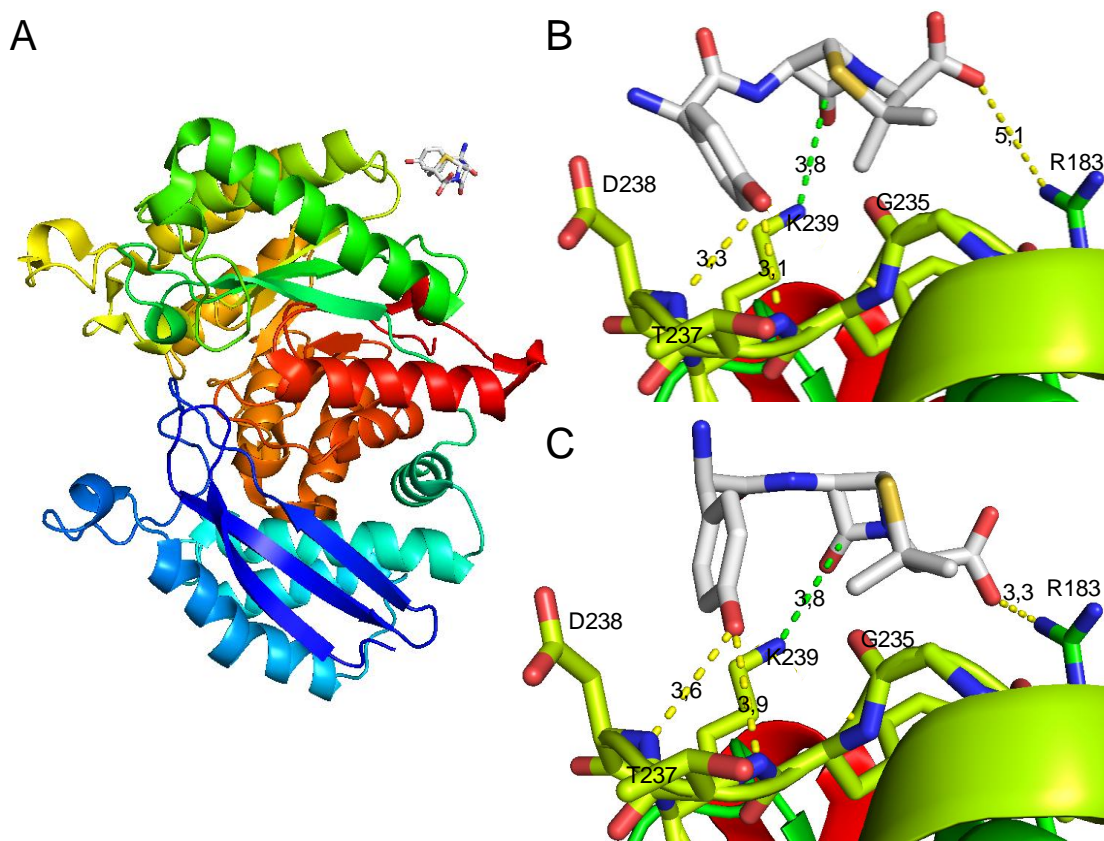
Al analizar en detalle el espectro de masas de este péptido (Figura 46), observamos que todos los iones de la serie “b” detectados presentaban un

aumento de masa de 365 Da al compararlos con los obtenidos en la fragmentación teórica del péptido sin la modificación. Todos estos iones incluyen la Lys 239, incluso el péptido más pequeño detectado (b5). En cambio, ninguno de los iones de la serie “y”, de los cuales se detectó hasta el ion y11, presentaron incremento de masa. Estos resultados indican que la incorporación de amoxicilina se produce en uno de los cuatro primeros aminoácidos, probablemente en la lisina 239.

#### 4.9. Modelado molecular

La caracterización de la interacción entre la amoxicilina y su residuo diana ayudaría no solo a identificar nuevos residuos de esta u otras proteínas susceptibles de ser modificados por amoxicilina, sino también al diseño de moléculas que puedan interferir en la unión del fármaco a la proteína con el objetivo de evitar las reacciones adversas a fármacos. De este modo, decidimos explorar las posibles interacciones entre la Lys239 y la amoxicilina mediante modelado molecular usando el programa de ajuste molecular (“docking”) Autodock Vina (Trott y Olson, 2010).

En la Figura 47A se representa la localización del único sitio de unión de la amoxicilina a la  $\alpha$ -enolasa que hemos identificado hasta el momento, y que se encuentra situado en una zona superficial correspondiente a la región central de la secuencia de la proteína. Mediante el programa de modelado se obtuvieron en total nueve modos de unión de la amoxicilina con energías favorables, en dos de los cuales (Figura 47B y 47C) el carbonilo del anillo betalactámico se encontraba en la proximidad del grupo amino de la lisina. Además, ambas estructuras presentaron energías de afinidad muy similares. La cercanía entre estos dos grupos podría favorecer que se produjera el ataque nucleofílico que daría lugar a la formación del aducto. Además, la interacción de la amoxicilina en esta región de la proteína resultaría estabilizada mediante interacciones de sus grupos químicos con otros aminoácidos de la proteína. En concreto, habría interacciones entre el grupo carboxilo con la arginina 183 y entre el hidroxilo del grupo fenol con el aspártico 238 y con la treonina 237.



**Figura 47: Modelado molecular de la interacción de la amoxicilina con la Lys239 en la estructura de la  $\alpha$ -enolasa (PDB: 2PSN, cadena A) (Hyo y col., 2008).** (A) Visión general de la interacción del fármaco con la proteína. El gradiente de color muestra el sentido de la secuencia de aminoácidos (azul hacia el N terminal y rojo hacia el C terminal). Se muestran dos estructuras con energías de afinidad de -3,7 kcal/mol (B) y -3,6 kcal/mol (C) en las que el anillo betalactámico se sitúa próximo a la lisina 239. La línea verde discontinua muestra la distancia en angstroms entre el grupo carbonilo del anillo betalactámico de la amoxicilina y el grupo amino de la lisina, mientras que las líneas amarillas muestran la distancia de posibles interacciones de algunos grupos del fármaco con aminoácidos de la proteína.

El conjunto de estos resultados ilustra la interacción entre la amoxicilina y la  $\alpha$ -enolasa. Sin embargo, serán necesarios más estudios para obtener una caracterización detallada de la interacción y de su repercusión fisiopatológica.





# VI. Discusión



## 1. ANÁLISIS DE LA HAPTENIZACIÓN DE PROTEÍNAS INTRACELULARES POR FÁRMACOS

Los mecanismos por los que los fármacos pueden desencadenar reacciones adversas en el organismo son diversos y en algunos casos están bien caracterizados; sin embargo, en otros, no se conocen bien. El análisis de estos resultados ayudará a comprender mejor qué procesos pueden estar involucrados en el desarrollo de hipersensibilidad a medicamentos. De este modo, se podrán diseñar estrategias terapéuticas para poder prevenir las reacciones adversas a medicamentos. En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio de la modificación de proteínas intracelulares por antibióticos betalactámicos.

Se postulan diversas hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de las reacciones de hipersensibilidad. Una de ellas, la más aceptada por la comunidad científica, es la hipótesis del hapteno (Landsteiner y Jacobs, 1935). Esta hipótesis parte de la idea de que los fármacos son estructuras demasiado pequeñas como para ser reconocidos por el sistema inmunitario. Por tanto, deberían unirse de manera covalente a proteínas para poder iniciar la reacción alérgica. Se conocen numerosos ejemplos en la literatura científica en los que se ha demostrado que los fármacos se pueden unir de forma covalente a proteínas (Geisslinger y col., 1989; Castillo y col., 1995; Hammond y col., 2014; Almeida y col., 2008). Sin embargo, en las últimas décadas también se han formulado otras hipótesis como el concepto de las “interacciones farmacológicas” (Pichler, 2008) o el de la “señal de peligro” (Matzinger, 1994). El fármaco antiviral abacavir proporciona un ejemplo interesante de interacciones no covalentes. Este medicamento se une al antígeno leucocitario humano HLA-B\*57:01, alterando la cantidad o la calidad de los péptidos que reconoce este antígeno lo que resulta en nuevos determinantes antigénicos y la inducción de autoinmunidad (Norcross y col., 2012). Además, este fármaco interacciona directamente con receptores característicos del sistema inmune, como los MHC de las células presentadoras de antígenos, activando así a los linfocitos T (Bell y col., 2013). En el caso de la hipótesis de la señal de peligro se ha comprobado que las células que sufren necrosis por el efecto citotóxico

de los fármacos, pueden liberar proteínas de choque térmico como las proteínas HSP70 o HSP90, que actúan como señales de peligro y activando a las células dendríticas (Basu y col., 2000).

En relación con la hipótesis del hapteno, el uso de análogos derivatizados de algunos fármacos ha permitido mejorar la detección y la identificación de proteínas modificadas. El análogo biotinilado de la amoxicilina ha permitido identificar dianas séricas como la albúmina (Ariza y col., 2014). En este trabajo, hemos utilizado este análogo biotinilado para identificar otras proteínas hapténizadas por este fármaco, con el objetivo de contribuir a comprender mejor las bases moleculares de la hapténización. Además, hemos realizado un estudio de la localización celular de estas proteínas y de su posible destino, con el fin de poder estudiar potenciales vías para regular la respuesta ante su hapténización.

### **1.1. Estudio de la hapténización de proteínas por amoxicilina en linfocitos B**

Como ya se mencionó en la revisión de literatura científica reflejada en la introducción, la mayoría de los trabajos sobre hapténización de proteínas se han centrado en el estudio de las proteínas séricas (Ariza y col., 2012; Jenkins y col., 2009; Whitaker y col., 2011; Castillo y col., 1995; Hammond y col., 2014; Meng y col., 2014). Sin embargo, la información sobre hapténización de proteínas intracelulares por fármacos, en general, es muy escasa (Bhaiya y col., 2006; Roychowdhury y col., 2007). La presencia de fármacos en el torrente sanguíneo puede favorecer su incorporación en el interior de la mayoría de tipos celulares del organismo, hapténizando de este modo las proteínas intracelulares. La modificación de estas proteínas puede conllevar su procesamiento para dar lugar a una serie de determinantes antigénicos que inducirían la respuesta alérgica frente al medicamento.

El primer abordaje en relación con la modificación de proteínas intracelulares por amoxicilina establece la presencia de este fármaco en el interior celular formando mayoritariamente agregados (Figura 2). Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente en macrófagos murinos,

en los que se observa el mismo tipo de patrón con una señal casi despreciable en la membrana celular (Ariza y col., 2014). De este modo, se confirmaría la entrada de este fármaco en el interior de los linfocitos B, aunque no se puede determinar si la entrada depende de si, previamente, el fármaco se ha unido covalentemente a proteínas o a otras estructuras macromoleculares que la puedan facilitar mediante endocitosis. Por otro lado, el fármaco podría entrar en la célula mediante transportadores de péptidos (Sala-Rabanal y col., 2006; Sala-Rabanal y col., 2008; Tamai y col., 1985) y unirse intracelularmente a proteínas.

A continuación, nos centramos en la propia haptización de proteínas por este fármaco con el objetivo de identificar qué proteínas intracelulares se modifican por amoxicilina. Los estudios de Western blot reflejaron la presencia de proteínas haptizadas no solo en el interior celular, la fracción de lisado, sino también en las diferentes fracciones extracelulares (Figura 3). Por un lado, la señal de proteínas haptizadas en el interior de la célula podría conllevar un procesamiento de las mismas para formar el antígeno. Por otro lado, la detección de proteínas modificadas en el exterior celular, tanto en la fracción de microvesículas como en la de proteína soluble, podría indicar que las proteínas se estuviesen modificando directamente en el entorno extracelular o incluso que estuviesen siendo secretadas activamente por las células en microvesículas o en forma soluble. La modificación de las proteínas presentes en forma soluble en el medio condicionado de la célula conllevaría una respuesta similar a la que se produciría a partir de las proteínas haptizadas de suero. En cuanto a las modificadas en el interior celular, la célula puede llevar a cabo un proceso selectivo de las que van a ser procesadas para la formación y secreción de los determinantes antigénicos. Finalmente, una vez formados estos determinantes, serán reconocidos por las células efectoras de la respuesta inmune.

Mediante estudios basados en electroforesis bidimensional pudimos analizar con más detalle el patrón de proteínas haptizadas por amoxicilina biotinilada en la fracción de proteína soluble de linfocitos B. Este patrón resultó tener una buena reproducibilidad en todas las fracciones donde se analizó. Es interesante destacar que el patrón de haptización por amoxicilina es

específico, es decir, no todas las proteínas presentes resultan ser modificadas por este fármaco. La especificidad de unión a proteínas de este fármaco ya se observó con anterioridad al analizar la haptización en suero de pacientes, tanto por el fármaco original como por el análogo biotinilado (Ariza y col., 2012; Ariza y col., 2014). Además, al comparar el patrón obtenido con AX-B con el que se obtiene con AX, se observa la presencia de más de 20 manchas de las cuales, al menos 7, son dianas comunes a ambos compuestos, lo que hace que los patrones sean muy parecidos. Esto indica que ambos compuestos tienen un comportamiento similar en cuanto a la haptización de proteínas y que la molécula de biotina del análogo no impide que se una a las dianas más características de la amoxicilina.

Por otro lado, analizamos el patrón de proteínas haptizadas en la fracción de lisado celular (Figura 9). Las diferencias entre este patrón y el obtenido de la fracción de proteína soluble podrían ser debidas a la cantidad relativa de cada proteína en una fracción y otra y a la regulación de cada una de las formas de la proteína durante su secreción.

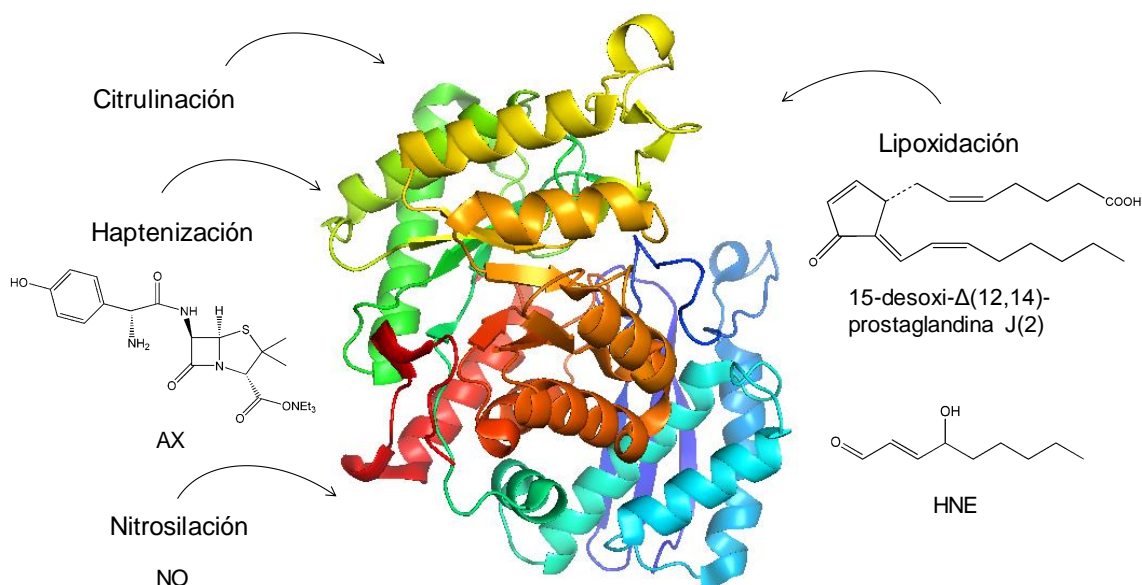
#### 1.1.1. Naturaleza de las proteínas haptizadas por amoxicilina

Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas, entre las que se incluyen la  $\alpha$ -enolasa, HSP70 y el factor de elongación 2 (Tabla 4 y Tabla 5) constituyen nuevas dianas para este fármaco nunca antes descritas, que pueden resultar importantes en el desarrollo de la respuesta alérgica, para el diagnóstico o incluso para explorar nuevas posibilidades de tratamiento de las reacciones adversas producidas por este medicamento.

De las proteínas identificadas es interesante destacar, por un lado, la presencia de  $\alpha$ -enolasa en las fracciones de lisado celular, vesículas extracelulares y en la fracción de proteína soluble del medio condicionado. Esto podría ser un indicio de su predisposición para ser modificada por amoxicilina y es posible que también de su potencial papel en el desarrollo de la respuesta alérgica. La  $\alpha$ -enolasa es una proteína dimérica abundante en el citoplasma, pero también puede estar presente en la superficie celular (Díaz-Ramos y col., 2012; Pancholi, 2001). Es una metaloenzima que cataliza la conversión del 2-

fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la vía glucolítica (Esquema 7). Esta proteína ha sido descrita como un potencial alérgeno en otras reacciones alérgicas. En la literatura científica se ha reportado que esta proteína, cuando procede de otras especies, puede estar implicada en procesos alérgicos. Mediante técnicas de inmunoproteómica, se ha identificado que esta proteína puede estar involucrada en la alergia frente a diversos tipos de polen (Mani y col., 2015; Smiljanic y col., 2017; Bordas-Le Floch y col., 2015; Saha y col., 2015; Mousavi y col., 2017) o en la alergia a distintos tipos de pescado (Tomm y col., 2013). Algunos estudios han demostrado un alto grado de conservación en la secuencia de aminoácidos entre distintas especies (Van der Straeten y col., 1991; Stamm y Young, 1997; Hannaert y col., 2000). Esto podría provocar que pequeños cambios en la secuencia, estructurales o modificaciones postraduccionales en el determinante antigénico de la enolasa humana, como la haptización, produjera un aumento de la inmunogenicidad. Además, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos frente a esta proteína en enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias (Gitlits y col., 2001; Gitlits y col., 1997). Incluso se han encontrado autoanticuerpos que reconocen específicamente determinantes antigénicos de la proteína cuando se encuentra citrulinada, principalmente en los aminoácidos 9 y 15 de la secuencia (Kinloch y col., 2005; Lundberg y col., 2008; Wegner y col., 2010). De este modo, las proteínas modificadas o que incluso estén haptizadas pueden ser más inmunogénicas. Los procesos de inflamación pueden ser factores facilitadores de la respuesta alérgica. El estrés oxidativo producido en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer favorece la peroxidación de lípidos. En este sentido, algunos estudios han identificado a la  $\alpha$ -enolasa como diana del HNE, provocando una reducción de la actividad de la proteína y, eventualmente, muerte neuronal (Reed y col., 2008; Perluigi y col., 2009), aunque no se conoce si la proteína modificada por HNE está implicada en el desarrollo de autoanticuerpos. También se ha descrito que esta proteína se puede nitrosilar en situaciones de inflamación (Gao y col., 2005). Es interesante destacar que la enolasa ha sido identificada en trabajos previos como una diana de modificación por prostaglandinas ciclopentenonas, como la 15-desoxi- $\Delta(12,14)$ -prostaglandina J(2) (Aldini y col., 2007; Yamamoto y col., 2011). Todas estas evidencias indican que esta enzima es altamente

susceptible de modificación en situaciones de inflamación (Esquema 12). En futuros estudios sería interesante explorar si estas modificaciones pueden afectar a su antigenicidad y/o cooperar en procesos alérgicos.



**Esquema 12: Modificaciones de la  $\alpha$ -enolasa en situaciones de inflamación.** En el esquema se representa la proteína (PDB: 2PSN, cadena A) junto con algunas modificaciones que se pueden encontrar en situaciones de inflamación o durante tratamientos con fármacos.

La proteína HSP70 se encuentra localizada en el citoplasma de todas las células, aunque también puede estar localizada en el núcleo en situaciones de estrés (Ernst y col., 2016). Además, puede estar presente en los lisosomas, inhibiendo la permeabilización de la membrana lisosomal (Kirkegaard y col., 2010) o en exosomas, pudiendo tener efectos proinflamatorios (Anand y col., 2010). La función de esta proteína consiste en facilitar el plegamiento de otras proteínas recién sintetizadas, reensamblar las proteínas que hayan perdido su estructura o se hayan agregado o controlar la actividad de proteínas reguladoras (Bukau y col., 2000; Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Pratt y Toft, 2003). Además, puede regular la respuesta inmune, liberándose al exterior celular conjugada con péptidos antigénicos. El complejo proteína-péptido es captado por células presentadoras de antígenos, donde el péptido puede ser presentado en el contexto de MHC tipo I (Arnold-Schild y col., 1999). HSP70 también puede estar relacionada con procesos alérgicos (Radauer y col., 2008). De hecho, HSP70 es un mediador del sistema inmune en la



hipersensibilidad por contacto. En este tipo de alergia, cuando se aplica el hapteno 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno sobre la piel, la inhibición de HSP27 y HSP70 produce una reducción de la respuesta inmunitaria, produciendo tolerancia hacia este hapteno (Yusuf y col., 2009). Sin embargo, no se ha estudiado si estas proteínas se modifican por estos compuestos. En cambio, se han encontrado modificaciones en la Cys306 por guaianólidos que facilitan la capacidad de hidrólisis del ATP de esta proteína, produciendo un bloqueo de las vías de señalización relacionadas con la neuroinflamación (Wang y col., 2017b). En situaciones de estrés oxidativo producido en la enfermedad hepática alcohólica, se ha descrito que HSP70 es una diana del HNE. Esta modificación provoca una disminución significativa de la actividad de la proteína (Smathers y col., 2011). También se ha comprobado que es diana de numerosas modificaciones oxidativas y lipoxidativas (Gharbi y col., 2007) y sus niveles se elevan en situaciones de estrés (Calabrese y col., 2001; Westerheide y Morimoto, 2005). De este modo, la haptización de esta proteína podría repercutir directamente en su función.

El factor de elongación 2 se encuentra presente en el citoplasma de las células, participando en la elongación de la cadena polipeptídica de las proteínas en el proceso de traducción (Kaul y col., 2011). La modificación de esta proteína podría interferir directamente con la síntesis de proteínas y la integridad de la célula. Se conocen modificaciones postraduccionales de esta proteína, como la formación de diptamida, una modificación específica que ocurre en un residuo de histidina (Van Ness y col., 1978). Esta modificación es reconocida por diferentes toxinas, como la de la difteria, la exotoxina A de *Pseudomonas* o la toxina colérica, alterando la síntesis de proteínas y provocando muerte celular (Su y col., 2013; Oppenheimer y Bodley, 1981). Además, la actividad del EF2 se regula mediante fosforilación y desfosforilación por quinasas específicas (Kaul y col., 2011), lo que evidencia que las modificaciones postraduccionales sobre esta proteína pueden tener una gran repercusión en el destino de la célula. Por ello, la modificación por amoxicilina podría repercutir en su función o en la interacción con otras proteínas o sustancias exógenas. En situaciones de estrés oxidativo, se ha estudiado la formación de aductos entre aldehídos de bajo peso molecular como el

malondialdehído y el HNE con esta proteína, que provoca su inactivación (Arguelles y col., 2009). La formación de estos aductos se reduce en presencia de agentes protectores del estrés oxidativo como la melatonina (Arguelles y col., 2012). En relación con la inmunogenicidad del factor de elongación 2, se conocen pocos casos en los cuales el sistema inmune lo reconozca como un antígeno. Por ejemplo, en la enfermedad del Lupus se producen anticuerpos que reconocen el ADN de doble cadena y además pueden reconocer el EF-2 e inhibir la traducción *in vitro*, sugiriendo una posible reactividad cruzada con esta proteína (Alberdi y col., 2001).

A modo de confirmación de la haptización de estas proteínas, realizamos técnicas de purificación complementarias (Figura 7 y Figura 8) ya que el estudio mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas puede presentar algunas limitaciones, como por ejemplo que se encuentren varias proteínas en una misma mancha y se identifique alguna que no esté modificada. En estos ensayos complementarios observamos la presencia de señal de biotina asociada a las proteínas inmunoprecipitadas y la retención de éstas en una columna de avidina. Por lo tanto, el conjunto de estos experimentos demuestra la modificación de estas proteínas por amoxicilina biotinilada.

El hecho de que estas proteínas sean potencialmente activadoras del sistema inmunológico, tanto cuando proceden del paciente como cuando proceden de otras especies, y de que aparezcan haptizadas por amoxicilina refuerza la hipótesis de su posible implicación en la alergia a este fármaco.

#### 1.1.2. Secreción activa de las proteínas haptizadas por amoxicilina

Una observación importante de nuestros estudios es la secreción de proteínas haptizadas al medio condicionado en forma de proteínas solubles y en microvesículas (Figura 11). La secreción de proteínas, por una u otra vía, puede ser un proceso clave en la presentación antigénica y en las reacciones alérgicas mediadas por fármacos. Podemos afirmar que las microvesículas provienen del interior de la célula gracias a los experimentos de pulso-caza y la

observación de la liberación regulada de exosomas, que implican una secreción activa de estos orgánulos.

Las microvesículas se analizaron mediante microscopía electrónica. Tanto la forma como el tamaño concordaron con los descritos en la bibliografía (Raposo y Stoorvogel, 2013; Chernyshev y col., 2015; Caby y col., 2005). Además, los experimentos de microscopía electrónica apoyan la presencia de amoxicilina biotinilada en estas vesículas (Figura 15). Mediante esta técnica no se pudo determinar si la amoxicilina biotinilada se encuentra sobre la superficie de las vesículas o en el interior. Esta disposición podría ser importante durante la captación del exosoma o incluso en el procesamiento de las proteínas por parte de la célula presentadora de antígenos. Este análisis será objeto de futuros estudios. Es importante señalar que la presencia de proteínas haptenizadas en la fracción de vesículas extracelulares del medio condicionado puede ser regulada a través de la formación de exosomas mediante fármacos como el GW4869, inhibidor no competitivo de la esfingomielinasa neutra, y la C6-ceramida, un análogo de la ceramida que estimula la secreción de exosomas (Figura 12). En el futuro, se podría explorar si la respuesta alérgica se puede modular controlando la liberación de exosomas. La modulación de la liberación de estas partículas como diana terapéutica es objeto de algunos estudios. En la calcificación vascular, algunos factores que pueden incrementar la liberación de exosomas promueven este proceso (Kapustin y col., 2015).

La importancia de estos hallazgos radica en que es la primera vez que se observan aductos de fármaco y proteína en exosomas. Estas microvesículas desempeñarían un papel importante en la regulación del sistema inmune, ya que activan a linfocitos T (Chaput y Thery, 2011). Los exosomas provenientes de células dendríticas contienen complejos MHC-antígeno que pueden activar a linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, los exosomas pueden modular la respuesta inmune sin presentar o transportar antígenos. Cuando estas estructuras proceden de células tumorales provocan la apoptosis de los linfocitos T inhibiendo la respuesta inmune (Andreola y col., 2002). Bajo otras circunstancias, macrófagos infectados por ciertos patógenos liberan exosomas que favorecen la inflamación, induciendo la activación de linfocitos T y B (Quah y O'Neill, 2007). Este hecho podría tener implicaciones en el estudio de los

efectos adversos a fármacos y, concretamente, en el desarrollo de respuestas alérgicas a betalactámicos. Los exosomas participan directamente en la respuesta alérgica. En concreto, la composición proteica y nucleica de estas estructuras desempeña un papel importante como biomarcador para el diagnóstico de algunas enfermedades como el asma. Además, estos componentes pueden tener un papel modulador de la respuesta alérgica (Nazimek y col., 2016; Sastre y col., 2017).

La incubación de amoxicilina con exosomas aislados también da lugar a la haptización de las proteínas. Esta observación suscita la posibilidad de que, durante su transporte en la sangre, la amoxicilina modifique proteínas de exosomas presentes en el torrente circulatorio. Los exosomas presentes en sangre pueden tener una procedencia y una naturaleza muy variada (Li y col., 2014; Baranyai y col., 2015). Este hecho podría incluso ampliar el abanico de potenciales proteínas haptizadas circulantes en sangre de pacientes. Los estudios de identificación de dianas de fármacos se han centrado en las proteínas del suero. Sin embargo, nuestros hallazgos establecen que los exosomas procedentes de células muestran un patrón de haptización diferente a los modificados *in vitro* (Figura 16). Por tanto, el mecanismo de modificación intracelular y secreción parece esencial para que se genere esa combinación concreta de proteínas haptizadas vehiculizadas por exosomas. Nuestros estudios abren nuevas perspectivas basadas en el análisis de los exosomas circulantes, lo que podría ampliar el abanico de dianas de este fármaco y ayudar a comprender mejor el proceso de las reacciones alérgicas a fármacos. Además, confirmamos que HSP70, EF2 y la  $\alpha$ -enolasa (Tabla 6) resultan modificadas por este fármaco. Estas tres proteínas ya han sido descritas en el interior de exosomas en numerosos trabajos (Faught y col., 2017; Anand y col., 2010; Thery y col., 2002b; Duijvesz y col., 2013; Koles y Budnik, 2012; Bard y col., 2004). Sin embargo, es la primera vez que se identifican modificadas por amoxicilina en exosomas. Dichas proteínas podrían estar siendo transportadas a células diana o células efectoras de la respuesta inmunológica.

El conjunto de estos resultados establece que los componentes de los exosomas pueden ser dianas de haptización por amoxicilina. Los hallazgos

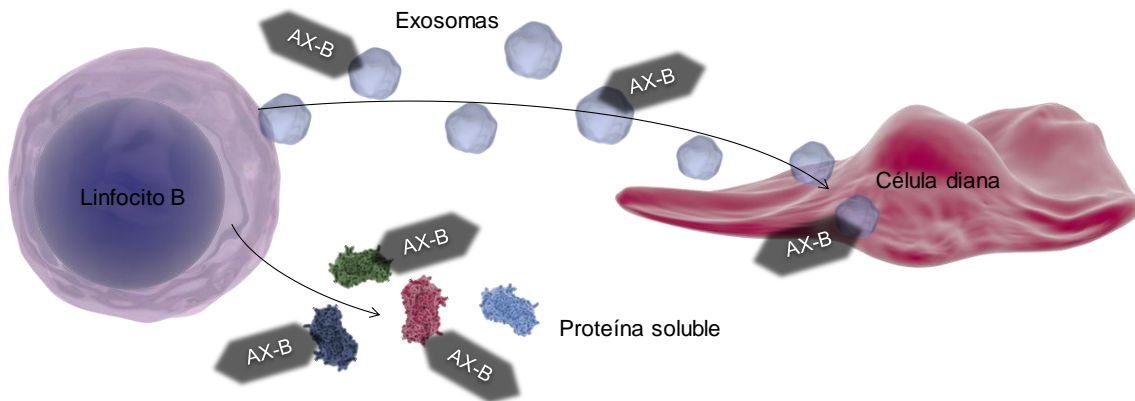
obtenidos de este trabajo podrían ayudar a comprender mejor el proceso de haptización por fármacos no solo a nivel celular sino también en estructuras circulantes en la sangre y, consecuentemente, a proponer nuevas estrategias terapéuticas frente a las reacciones adversas a fármacos.

### 1.1.3. Transporte de proteínas haptizadas en exosomas

Los exosomas pueden ser secretados por diferentes células para posteriormente ser internalizados por otras células presentadoras de antígenos. Una vez incorporados, serían procesados con el objetivo de exponer los determinantes antigénicos en la superficie celular (Chaput y Thery, 2011). Sin embargo, los estudios de presentación directa de antígenos a linfocitos T por estas microvesículas en el contexto de la alergia son escasos (Vallhov y col., 2015; Admyre y col., 2007a).

En este trabajo, hemos podido confirmar que los exosomas procedentes de linfocitos B cargados con proteínas haptizadas por amoxicilina son captados e internalizados por células endoteliales (Esquema 13). Como ya se ha mencionado anteriormente, las células endoteliales pueden comportarse como células presentadoras de antígenos no profesionales (Bagai y col., 2005; Epperson y Pober, 1994; Limmer y col., 2000; Rothermel y col., 2004). La internalización de estas microvesículas ya sea por endocitosis (Tian y col., 2010), endocitosis mediada por clatrina (Tian y col., 2014), fagocitosis, (Feng y col., 2010) o por fusión de membrana (Parolini y col., 2009) podría dar lugar, por un lado, a la exposición de los complejos MHC-antígeno transportados por el exosoma lo que activaría de este modo a los linfocitos T. Por otro lado, las proteínas haptizadas que se encuentren en el interior del exosoma se podrían degradar por la vía lisosomal, formando de este modo los antígenos que serán expuestos en la superficie celular. En el caso de los exosomas que se fusionen directamente con la membrana plasmática, las

proteínas haptinizadas serían degradadas por la vía proteasomal formando así los antígenos.



**Esquema 13: Representación de la secreción de proteínas haptinizadas en forma soluble y en exosomas.** Los exosomas cargados con proteínas haptinizadas pueden ser captados por células diana, internalizando las proteínas modificadas por el fármaco.

La transferencia de exosomas a través de células apoyaría la teoría de que estas vesículas extracelulares actúan como mensajeros en diversas respuestas fisiopatológicas. De este modo, las proteínas haptinizadas se transportarían por estas vesículas e inducirían la respuesta alérgica en células que se encuentran a mayor distancia. Los exosomas podrían constituir una nueva ruta en el destino de las proteínas haptinizadas por amoxicilina que contribuiría al desarrollo de la respuesta alérgica.

## 1.2. Estudio de la haptización de proteínas por amoxicilina en otros tipos celulares

Los linfocitos B participan en el reconocimiento de antígenos y pueden secretar anticuerpos específicos contra dicho antígeno. Sin embargo, en las respuestas inflamatorias o inmunológicas participan un amplio abanico de tipos celulares como los macrófagos, células epiteliales, células endoteliales u otros linfocitos. Además, los fármacos administrados podrían estar en contacto directo con todos ellos. Debido al transcurso del fármaco por el organismo y sus posibles implicaciones en el desarrollo de la respuesta alérgica, en este trabajo nos propusimos estudiar la posibilidad de que otros tipos celulares

podrían incorporar el fármaco. Por tanto, analizamos también la haptización en otros tipos celulares como las células epiteliales o los macrófagos.

Las células epiteliales pueden liberar exosomas. Además, las células epiteliales de glándula mamaria son capaces de secretar fármacos a la leche materna (Moretti, 2009; Ito y col., 2015; Admyre y col., 2007b; Lasser y col., 2011). Durante la respuesta alérgica, generan citoquinas y quimioquinas necesarias para el reclutamiento de otras células como las dendríticas, los basófilos y los linfocitos T (Hammad y Lambrecht, 2015; Sekiya y col., 2000; Xue y col., 2014). En primer lugar, analizamos, de manera general, la haptización de proteínas en células MCF-7. Las MCF-7 son células tumorales de glándula mamaria especializadas en la excreción o secreción de sustancias.

Mediante microscopía confocal se estableció que las células MCF-7 también eran capaces de internalizar el fármaco. En estas células, la señal de amoxicilina biotinilada aparece en forma de pequeños acúmulos cerca del núcleo y en forma difusa en todo el citoplasma (Figura 21). El análisis del patrón de polipéptidos haptizados por amoxicilina confirmó la presencia de proteínas modificadas en la fracción de vesículas extracelulares (Figura 20). Sin embargo, no hay información en la literatura sobre la presencia de proteínas haptizadas en la leche materna. En futuros estudios se podría investigar si la presencia de proteínas haptizadas en la leche materna puede tener algún efecto sobre el neonato. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que las proteínas de células epiteliales resultan también haptizadas por amoxicilina.

Los macrófagos son células especializadas en fagocitar cuerpos extraños y, junto con las células dendríticas y los linfocitos B, las encargadas de presentar antígenos (Unanue, 1984; Hume, 2008). En relación con la respuesta alérgica, pueden modular la activación de los linfocitos T mediante la secreción de mediadores inflamatorios como especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas (Gordon y Taylor, 2005).

En macrófagos, observamos que la señal de amoxicilina biotinilada se distribuía preferentemente en compartimentos particulados del citoplasma, lo que confirma evidencias anteriores (Ariza y col., 2014). El análisis más detallado de la hapténización mediante electroforesis y Western blot en este tipo celular mostró también un patrón complejo de polipéptidos hapténizados por este fármaco (Figura 22). En el futuro será interesante identificar las proteínas hapténizadas en diversos tipos celulares para explorar la presencia de dianas comunes o específicas del tipo celular. Sin embargo, constatamos que la producción de exosomas por este tipo celular era muy escasa.

El conjunto de estos resultados indica que la hapténización de proteínas por amoxicilina tiene lugar en diferentes tipos celulares, aunque presenta particularidades según el tipo celular. De este modo, la amoxicilina podría hapténizar una gran variedad de proteínas e incluso en diferentes proporciones según el tipo celular que internalice este fármaco. En este sentido, muchos tipos celulares del organismo estarán expuestos directamente al fármaco durante los tratamientos. La formación de hapténos y su procesamiento podría tener lugar en distintos lugares del organismo y, por tanto, podría dar lugar a las diferentes manifestaciones clínicas de la alergia a medicamentos.

### **1.3. Estudio de la hapténización de proteínas por penicilina en linfocitos B**

La formación de aductos por fármacos es un proceso general que involucra a diversas familias de medicamentos o sus metabolitos (Meng y col., 2014; Hammond y col., 2014; Jenkins y col., 2013; Golizeh y col., 2015). Muchos de estos compuestos provocan reacciones alérgicas que serían desencadenadas por la modificación de proteínas. En este sentido, nos preguntamos si otros fármacos podrían formar aductos en linfocitos B y si, en el caso de que estos se produjeran, las dianas serían las mismas que las que se han identificado para amoxicilina. En este estudio nos centramos en detallar la hapténización de proteínas por betalactámicos, analizando este proceso con otro fármaco de esta misma familia de uso muy generalizado, la penicilina.



Los estudios sobre modificación de proteínas por este fármaco han determinado que es capaz de unirse selectivamente a lisinas de la albúmina humana en bajas concentraciones (Meng y col., 2011). Sin embargo, no se han estudiado otras dianas séricas de este compuesto, como ya se conocen para la amoxicilina. Además, hasta ahora, se desconocía si este antibiótico también era capaz de unirse a proteínas celulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que la penicilina G es capaz de modificar proteínas celulares en tratamientos de linfocitos B. El patrón de polipéptidos haptinizados presenta pequeñas variaciones según las concentraciones empleadas (Figura 18). Debido a la escasa sensibilidad de la detección inmunológica en este caso, las concentraciones necesarias para observar los aductos fueron siempre mayores que las que se alcanzan farmacológicamente (Giachetto y col., 2004). Adicionalmente, se observó una haptenzación diferente en cada una de las fracciones (Figura 19).

Aunque ambas moléculas, amoxicilina y penicilina, son fármacos pertenecientes a la misma familia, y ambas son capaces de haptenzar proteínas celulares, podrían tener distinta reactividad debido a las diferencias en su cadena lateral. Este hecho interferiría en la unión a los sitios en la proteína que dependan de factores conformacionales. En estudios de espectrometría de masas de albúmina modificada con flucloxacilina (Jenkins y col., 2009), piperacilina (Whitaker y col., 2011; El-Ghaiesh y col., 2012), amoxicilina (Garzon y col., 2014; Martin y col., 2010) y benzilpenicilina (Meng y col., 2011) se determinó que ciertos residuos, como la lisina 190 y la 199, se modificaban por todos estos fármacos. Sin embargo, también se observó la modificación selectiva de otros residuos como la lisina 159, haptenzada solo por penicilina, o la lisina 162, que se encuentra haptenzada por flucloxacilina y piperacilina. En el caso de la amoxicilina y la penicilina pueden modificar residuos comunes en la albúmina, como las lisinas 199, la 351 o la 432. Esto indicaría que, al menos, algunas proteínas se modifican de forma similar por estos dos fármacos.

Tanto la amoxicilina como la penicilina modifican proteínas intracelulares, aunque los patrones no parecen idénticos. En futuros estudios sería interesante abordar la posible selectividad de la modificación de las dianas identificadas y las posibles relaciones estructura-función. De forma similar, la haptización en diferentes tipos celulares puede dar lugar a dianas específicas de cada tipo celular o comunes a todos ellos.

## **2. ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS HAPTENIZADAS**

El proceso de haptización implica que la unión covalente de los fármacos a las proteínas contribuye a la antigenicidad que inicia la respuesta alérgica. Sin embargo, el complejo proteína-fármaco formado requiere un procesamiento celular. Finalmente, el antígeno expuesto podrá estar compuesto por la proteína completa o por un péptido pequeño unido al fármaco.

El estudio de las vías de procesamiento ayudaría comprender mejor la presentación de aductos de fármacos como antígenos y, en consecuencia, las bases celulares de la respuesta alérgica a medicamentos.

### **2.1. Análisis de la vía lisosomal de procesamiento**

Los linfocitos B son células que pueden iniciar la respuesta alérgica presentando antígenos sobre su superficie (Martin y Chan, 2006; von Bergwelt-Baildon y col., 2002) o en exosomas (Raposo y col., 1996) a los linfocitos T.

Como hemos observado en el apartado 1 de Resultados, la amoxicilina modifica proteínas de estas células que, además, pueden ser secretadas en vesículas al exterior y ser captadas por otras células.

En primer lugar, analizamos el posible procesamiento lisosomal de las proteínas modificadas por amoxicilina. Los experimentos realizados mediante Western blot no mostraron diferencias en cuanto a niveles de proteínas

haptinizadas al inhibir la ruta de procesamiento lisosomal (Figura 24). Además, se observó una escasa colocalización entre compartimentos ácidos, correspondientes a lisosomas, y proteínas haptinizadas (Figura 25). En base a estos resultados, no se puede concluir que la vía lisosomal este jugando un papel importante en el procesamiento de proteínas haptinizadas por amoxicilina.

Por otro lado, realizamos el mismo estudio en macrófagos. Este tipo celular constituye un buen modelo, no solo por ser células especializadas en fagocitar y degradar componentes extraños, sino también por su posible implicación en la degradación de proteínas haptinizadas. En macrófagos tratados con albúmina haptinizada químicamente con manosamina conjugada con biotina se observó colocalización de la proteína haptinizada con compartimentos correspondientes a lisosomas (Gefen y col., 2015). Sin embargo, posiblemente no todos los haptenos o proteínas haptinizadas se comporten de la misma forma.

En nuestro trabajo, el análisis de la inhibición de la vía de procesamiento lisosomal con cloroquina en estas células mostró un aumento significativo en cuanto a la cantidad de proteínas haptinizadas por AX-B (Figura 29). En la valoración de estos resultados es necesario tener en cuenta que la cloroquina puede tener un efecto dual sobre las vías de tráfico intracelular, por un lado, inhibiendo la degradación lisosomal y por otro promoviendo la formación de exosomas (Savina y col., 2003; Yuyama y col., 2008). Por tanto, la acumulación de proteínas haptinizadas que se observe será el resultado de la contribución relativa de estos fenómenos en cada tipo celular.

Por otra parte, mediante microscopía confocal (Figura 28), observamos una clara colocalización de las estructuras con señal de biotina, probablemente proteínas haptinizadas por amoxicilina biotinilada, con compartimentos ácidos, lo que sugiere que estas células estén procesando las proteínas mediante dicha vía. Esto podría implicar que muchas de las proteínas haptinizadas en el exterior celular estarían siendo endocitadas y, a continuación, se degradarían por la vía lisosomal. Sin embargo, no se puede descartar que se estén

modificando en el interior celular. A este respecto, se observa cierta colocalización de la señal de biotina con ubiquitina, que puede constituir una señal para la degradación de proteínas por la vía endolisosomal (Urbe, 2005; Li y col., 2015). Las proteínas de membrana presentes en los endolisomas podrían ser ubiquitinadas y empaquetadas en pequeñas vesículas para ser internalizadas y degradadas en los lisosomas.

Los resultados obtenidos en macrófagos en este trabajo coinciden, por tanto, con evidencias anteriores en las que se describe colocalización entre la proteína y lisosomas (Gefen y col., 2015).

Cabe la posibilidad de que las diferencias observadas entre linfocitos y macrófagos sean debidas posiblemente a que la contribución de las vías endolisosomal o del proteasoma a la degradación de proteínas haptinizadas en cada tipo celular sea distinta. Incluso el destino de estas proteínas puede diferir de un tipo celular a otro, de forma que se degraden por completo o sean procesadas para formar el antígeno.

## **2.2. Análisis de la vía proteasomal de procesamiento**

El procesamiento de proteínas a través del proteasoma también puede generar antígenos a partir de proteínas haptinizadas por fármacos. En los estudios realizados en linfocitos B no se observó una coincidencia entre las señales de ubiquitina y biotina en microscopía confocal (Figura 27), sin embargo, si se apreció un ligero aumento en la señal total de ubiquitina tanto con al tratar con amoxicilina biotinilada como al inhibir el proteasoma. Además, con este último tratamiento se observó un ligero aumento en la cantidad de proteínas modificadas por amoxicilina biotinilada (Figura 26). Estos resultados indican que el proteasoma podría contribuir a la degradación de proteínas haptinizadas en este tipo celular.

Por otro lado, el análisis llevado a cabo en los macrófagos murinos demostró un aumento más considerable de las proteínas haptinizadas al inhibir esta vía (Figura 29). Además, se pudo observar cierta colocalización en algunas zonas de la célula entre la señal de ubiquitina y la de biotina de las proteínas modificadas (Figura 28). Sin embargo, esta colocalización se

encuentra en zonas donde la señal de biotina es poco intensa. Por otro lado, se requerirían experimentos de inmunoprecipitación para poder establecer si una proteína haptenizada por amoxicilina se encuentra también ubiquitinada.

La escasa colocalización entre la señal de ubiquitina y la de las proteínas haptenizadas no excluye que se procesen por esta vía. La ubiquitina es una proteína de pequeño tamaño que se puede asociar a otras proteínas marcándolas para ser degradadas por el proteasoma. Sin embargo, en ocasiones la degradación de proteínas por el proteasoma es independiente de ubiquitina (Pickering y Davies, 2012; Eroles y Coffino, 2014). La subunidad 20S del proteasoma puede degradar proteínas que se encuentren parcial o completamente desplegadas debido a oxidaciones o mutaciones (Aiken y col., 2011). Es posible que la haptenización provoque un cambio de la estructura proteica fruto de alteraciones del plegamiento. Estos cambios pueden deberse a la pérdida de interacción entre algunos aminoácidos o un aumento en la susceptibilidad a la oxidación.

En base a estos resultados, la vía proteasomal de degradación podría estar implicada de una forma directa o indirecta en el procesamiento de proteínas haptenizadas por AX. La determinación de la degradación por el proteasoma como una vía principal o complementaria al procesamiento a través de los lisosomas sería objeto de estudios más profundos.

### **3. ESTUDIO DE LA HAPTENIZACIÓN DE $\alpha$ -ENOLASA POR AMOXICILINA**

La  $\alpha$ -enolasa es una de las principales proteínas intracelulares que resultan haptenizadas por amoxicilina. Además, hemos comprobado que la  $\alpha$ -enolasa es secretada al exterior celular tanto en forma soluble como en microvesículas. El potencial antigénico de esta proteína y la observación de que es una diana de haptenización en diversos compartimentos de la célula, nos ha llevado a estudiar en más detalle la modificación de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina.

Para poder llevar a cabo nuestros objetivos, confirmamos la modificación de esta proteína en condiciones *in vitro* (Figura 30A), observando que se modifica por el análogo biotinilado de la amoxicilina. En ensayos de

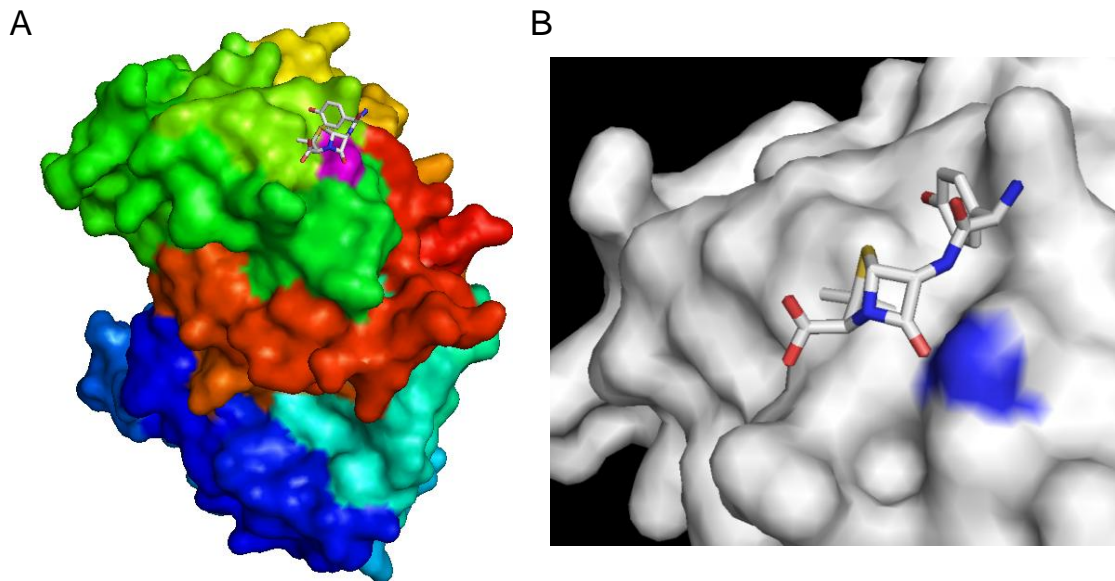
competición entre el fármaco original y el análogo, se obtuvo una disminución de la señal correspondiente a la AX-B en presencia de un exceso de AX (Figura 30B). Esto sugiere que ambos compuestos podrían interactuar con los mismos sitios o residuos de la proteína. Además, apoya la utilización de la AX-B como una buena herramienta para el estudio de los procesos de haptización de la amoxicilina.

La principal ventaja de los análogos biotinilados es que permiten utilizar el sistema biotina-avidina para conseguir una mayor sensibilidad en la detección de los aductos y emplear procedimientos de purificación mediante cromatografía de afinidad (Garzón y col., 2010; Cernuda-Morollón y col., 2001; Stamatakis y Perez-Sala, 2006). A pesar de ello, es conveniente validar los resultados con el fármaco no modificado. Gracias al uso de estos análogos hemos podido estimar que el grado de modificación de esta proteína en ensayos *in vitro* es de aproximadamente un 3% (Figura 31). Sin embargo, la incorporación real del fármaco a la proteína podría variar en los experimentos en células o en los tratamientos de pacientes ya que la estimación está realizada a partir de ensayos *in vitro* con la proteína recombinante y el análogo biotinilado seguidos de SDS-PAGE. En estos experimentos, las uniones más débiles entre el fármaco y la proteína se pueden perder tanto en el procesado de la muestra como en la propia electroforesis.

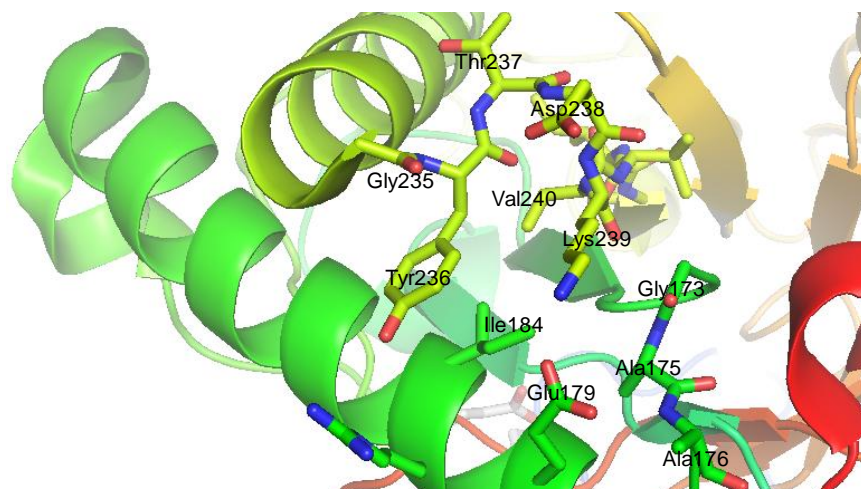
Además, analizamos la haptización de esta proteína por otro betalactámico ampliamente usado, la penicilina (Figura 42). Los resultados obtenidos indican que la modificación se detecta peor que la de la albúmina (Ariza y col., 2012), pues se requieren concentraciones de penicilina muy elevadas para poder apreciar la modificación en Western blot.

En trabajos previos del laboratorio se estableció que la técnica más adecuada para la caracterización de la haptización de proteínas por amoxicilina es la espectrometría de masas de alta resolución (Ariza y col., 2012). En este trabajo quisimos llevar a cabo un abordaje similar identificando un residuo de la proteína  $\alpha$ -enolasa modificado por amoxicilina en ensayos *in vitro*.

Los experimentos “top-down” de MALDI-TOF MS y ESI-MS llevados a cabo con la proteína completa, mostraron resultados negativos. Esto podría ser debido a que la proteína se modificara en una proporción muy baja. El hecho de que existieran pocos sitios de unión del fármaco podría ayudar a desarrollar estrategias para bloquear completamente la unión del fármaco a la  $\alpha$ -enolasa. Por otro lado, mediante experimentos “bottom-up” de espectrometría de masas de alta sensibilidad pudimos determinar que la lisina 239 se encuentra modificada por amoxicilina (Figura 46). Este aminoácido se encuentra en el centro de la secuencia y está situado en la superficie de la proteína (Esquema 14). Esta localización facilitaría en gran medida la unión de la amoxicilina, ya que la lisina se encuentra completamente expuesta. Además, los posibles puentes de hidrógeno que se puedan formar entre el hidroxilo del grupo fenol de la cadena lateral de amoxicilina y los aminoácidos adyacentes, junto con las interacciones electrostáticas que se formarían entre el carboxilo de la amoxicilina y la arginina 183 favorecerían la reacción (Esquema 15). Esta localización es similar en los resultados obtenidos con la albúmina, en la que se puede apreciar que el carboxilo se sitúa también cerca de una arginina (Ariza y col., 2012). Sin embargo, en el caso de la  $\alpha$ -enolasa, el ambiente en el que se encuentra la lisina no parece ser determinante, ya que no se observan cambios significativos aparentes en los niveles de modificación al desnaturalizar la proteína (Figura 35). El estudio comparativo del ambiente que rodea al sitio de modificación en distintas proteínas para identificar motivos comunes, ya sea de secuencia o conformacionales, ayudaría a identificar nuevos sitios de unión de la amoxicilina en estas u otras proteínas. Además, partiendo de esta información, se podrían desarrollar moléculas no alergénicas que previniesen o bloqueasen el proceso de haptización de esta u otras proteínas.



**Esquema 14: Representación de la interacción de la amoxicilina con la  $\alpha$ -enolasa (PDB: 2PSN, cadena A).** (A) Se muestra la superficie de la proteína completa. El gradiente de color refleja la orientación de la secuencia de aminoácidos (azul hacia el N terminal y rojo hacia el C terminal). En color morado se representa la lisina 239. (B) Detalle de la zona de la lisina 239. De color azul se muestra el grupo amino de la lisina.



**Esquema 15: Estructura de la  $\alpha$ -enolasa (PDB: 2PSN, cadena A) en la que se muestran la lisina 239 junto con residuos cercanos.** En gradiente de color se muestra la orientación de la secuencia de aminoácidos (azul y verde hacia el N terminal y amarillo y rojo hacia el C terminal).

La lisina 239 es un aminoácido que está presente en diferentes especies tanto evolutivamente cercanas como lejanas del ser humano (Tabla 7). Sin embargo, en especies como el ratón o la rata, en la posición 239 hay una glutamina, que es un aminoácido no nucleofílico y, en teoría, con menor capacidad de formar aductos. Por otra parte, la secuencia que rodea a la lisina está bastante conservada en las especies analizadas, lo que indicaría que esta



zona podría tener un papel importante en las funciones que pueda llevar a cabo la proteína.

Especie	Secuencia
<i>Homo sapiens</i>	<sup>235</sup> GYTDKVVIGM <sup>244</sup>
<i>Mus musculus</i>	<sup>235</sup> GYTDQVVIGM <sup>244</sup>
<i>Rattus norvegicus</i>	<sup>235</sup> GYTDQVVIGM <sup>244</sup>
<i>Pongo abelii</i>	<sup>235</sup> GYTDKVVIGM <sup>244</sup>
<i>Bos taurus</i>	<sup>235</sup> GYSDKVVIGM <sup>244</sup>
<i>Gallus gallus</i>	<sup>235</sup> GYSDKVVIGM <sup>244</sup>
<i>Xenopus laevis</i>	<sup>235</sup> GYPDKIVIGM <sup>244</sup>

**Tabla 7: Secuencia de la proteína  $\alpha$ -enolasa desde el aminoácido 235 al 244.** En rojo se encuentra marcada la posición 239.

En un futuro, se podrían realizar análisis más detallados del papel de la lisina 239 en la haptización de la  $\alpha$ -enolasa por amoxicilina utilizando mutantes o usando la proteína procedente de ratón o de rata para comprobar el grado de haptización de dichas proteínas. De este modo, se pueden realizar ensayos *in vitro* comparativos con la proteína mutante y la proteína silvestre, o realizar transfecciones en células de la proteína mutada, para así comparar el nivel de haptización en un modelo celular. Además, se deberán realizar análisis de la modificación de la  $\alpha$ -enolasa en condiciones *in vivo* y comprobar si esta lisina es también el sitio de modificación en sistemas biológicos.

En las electroforesis bidimensionales tanto de la proteína purificada como la que está presente en células, la  $\alpha$ -enolasa se separa en varias manchas. La presencia de estas distintas especies puede ser debida a diferentes modificaciones postraduccionales. Al analizar el grado de haptización de cada una de las manchas obtenidas, observamos que no todas se modifican de igual manera, predominando la forma número 2 (Figura 36) que es la que presenta un punto isoeléctrico intermedio. De este modo, las modificaciones postraduccionales llevadas a cabo en la célula podrían influir en la formación de aductos por fármacos (González-Morena y col., 2016) y por mediadores inflamatorios como prostaglandinas ciclopentenonas, el ácido etacrínico, el clorambucil, o por agentes oxidantes (Sánchez-Gómez y col.,

2007; van Iersel y col., 1997; Sánchez-Gómez y col., 2013). De hecho, algunas de estas modificaciones compiten en condiciones *in vitro* entre ellas por el mismo sitio de unión (Sánchez-Gómez y col., 2013). Por ello, la haptización de proteínas por fármacos dependería del contexto celular o fisiológico y resultaría interesante estudiar cómo influyen otros tipos de modificaciones, ya que podrían disminuir, si se bloquean los sitios de haptización, o potenciar, si se exponen nuevos sitios, la respuesta alérgica.

Las modificaciones postraduccionales de proteínas alteran su función, localización, estabilidad, e incluso la relación con otras modificaciones postraduccionales como en este caso por amoxicilina. Por este motivo, el estudio detallado de la haptización de proteínas por fármacos ayudaría a comprender mejor qué tipo de repercusiones tiene esta modificación.

Se conocen numerosas modificaciones postraduccionales de la  $\alpha$ -enolasa (Zhou y col., 2010), ya sean acetilaciones, metilaciones o fosforilaciones. Se han descrito, además, modificaciones para esta proteína que pueden aumentar su antigenicidad. En concreto, en la artritis reumatoide se han encontrado anticuerpos que reconocen la  $\alpha$ -enolasa cuando se encuentra citrulinada (Kinloch y col., 2005; Lundberg y col., 2008; Wegner y col., 2010). En nuestro trabajo decidimos explorar la posible interacción entre la acetilación y la haptización por amoxicilina, ya que ambas modificaciones ocurren principalmente en lisinas. De hecho, se ha comprobado que la lisina 239 se encuentra acetilada en situaciones fisiopatológicas como en el adenocarcinoma ductal de páncreas (Zhou y col., 2010). Sin embargo, la consecuencia concreta de la acetilación de esta lisina no se conoce. Nuestros resultados muestran una disminución de la modificación por amoxicilina a medida que se aumenta la acetilación de la proteína (Figura 38). Esto sugeriría que la acetilación y la haptización estarían compitiendo por la unión en la misma región de la proteína o, incluso en el mismo aminoácido, aunque la competición observada también podría ser debida a efectos conformacionales. Sin embargo, hay que tener presente que la reacción puede tener lugar en otros aminoácidos nucleofílicos, como la cisteína. Se han descrito modificaciones en cisteínas por metabolitos del diclofenaco y por la nevirapina en la glutatión-S-transferasa P1 (Boerma y col., 2012; Meng y col., 2013) o en

histidinas por la carbamazepina y la nevirapina en la albúmina y en la GSTP (Yip y col., 2014; Meng y col., 2013).

Por otro lado, al analizar las distintas formas de la  $\alpha$ -enolasa mediante electroforesis bidimensional (Figura 40), observamos que las formas haptinizadas por amoxicilina muestran un punto isoeléctrico más ácido. En este contexto, hay que tener en cuenta que en el punto isoeléctrico de las proteínas haptinizadas pueden influir no solo la acetilación sino otro tipo de modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la metilación. Mediante esta técnica no apreciamos una disminución del grado de haptinización. Sin embargo, hay que considerar que la información que se obtiene mediante los abordajes de electroforesis monodimensional y bidimensional no son directamente comparables. La caracterización detallada de las modificaciones y su posible repercusión serán objeto de estudio en investigaciones futuras.

Todos estos resultados contribuirán de manera esencial al conocimiento del proceso de haptinización de proteínas intracelulares, a la mejora de herramientas diagnósticas y potencialmente al desarrollo de moléculas que permitan prevenir el proceso de haptinización y, por consiguiente, a la mejora de la bioseguridad de numerosos fármacos.

En referencia a la función de esta proteína, la  $\alpha$ -enolasa es una enzima de la familia de las liasas que participa en la ruta de la glucólisis, utilizando  $Mg^{2+}$  para llevar a cabo la transformación del 2-fosfogliceraldehído a fosfoenolpiruvato (Esquema 10). Basándonos en la propia reacción, observamos cambios en los niveles de haptinización de esta proteína al incubar la con amoxicilina biotinilada en presencia del sustrato y/o con el cofactor (Figura 32 y 33). Las diferencias de modificación podrían ser debidas a pequeños cambios conformacionales de la proteína, de modo que quedarían más o menos expuestos residuos susceptibles de ser modificados por este fármaco, o a potenciales bloqueos del cofactor o el sustrato de los sitios de unión de la amoxicilina.

La posible interacción entre el sitio catalítico de la enzima y los sitios de modificación resulta más evidente al analizar la actividad de la proteína en

presencia de amoxicilina (Figura 34). La disminución del 10% de la actividad total, es leve pero reproducible y parecería indicar que la amoxicilina podría estar interfiriendo ya sea de manera directa o indirecta, mediante cambios estructurales, con el sitio catalítico de la enzima. De hecho, la lisina 239 se encuentra muy próxima a uno de los aspárticos que estabilizan los  $Mg^{2+}$  del centro catalítico (Schreier y Hocker, 2010; Larsen y col., 1996). Sin embargo, desconocemos la repercusión funcional a nivel celular de la modificación en células. Además, no tenemos constancia de cuál sería el grado de inhibición *in vivo*, que podría ser distinto del obtenido en los experimentos *in vitro*.

En este trabajo se analiza la haptización por amoxicilina de la  $\alpha$ -enolasa mediante técnicas de alta sensibilidad. En estudios futuros se analizarán los aductos formados en otras proteínas celulares por este u otros fármacos para comprender mejor la haptización de proteínas *in vivo*. De este modo, se ampliará la información sobre la modificación de proteínas por fármacos para poder desarrollar herramientas diagnósticas y mejorar la bioseguridad de muchos medicamentos.

# VII. Conclusiones



Como resultado de este trabajo, en el que se ha analizado la haptización de proteínas celulares por betalactámicos y su procesamiento se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La haptización de proteínas celulares por betalactámicos es un proceso selectivo. No todas las proteínas se modifican por estos fármacos.
2. En la línea de linfocitos B humanos RPMI 8866 se identifican la  $\alpha$ -enolasa, el factor de elongación 2 y HSP70 como proteínas celulares haptizadas por amoxicilina que podrían estar implicadas en el desarrollo de las reacciones alérgicas a amoxicilina.
3. En este tipo celular, el análogo biotinilado de la amoxicilina produce un patrón de polipéptidos modificados similar al del fármaco original.
4. Las proteínas haptizadas son secretadas al exterior celular en forma de proteínas solubles asociadas a exosomas.
5. Los exosomas cargados con proteínas haptizadas por amoxicilina pueden ser internalizados por otros tipos celulares. Esto suscita la posibilidad de que sean procesados para la formación y la presentación del antígeno.
6. La haptización de proteínas por betalactámicos tiene lugar en distintos tipos celulares y presenta particularidades según el tipo de célula.
7. Las vías celulares de degradación por el proteasoma y el lisosoma pueden participar en el procesamiento de las proteínas haptizadas por amoxicilina, aunque de forma diferente en distintas estirpes celulares.
8. La proteína  $\alpha$ -enolasa se modifica *in vitro* por AX y AX-B. Existe una competición entre ambos compuestos por la unión a la proteína.
9. La haptización de la  $\alpha$ -enolasa inhibe levemente su actividad catalítica en ensayos *in vitro*.

10. La acetilación *in vitro* de la  $\alpha$ -enolasa reduce su modificación por amoxicilina.
11. La lisina 239 de la  $\alpha$ -enolasa, localizada en la superficie de la proteína, ha sido identificada como diana de modificación por amoxicilina.



# VIII. Bibliografía



- Abed, N., Said-Hassane, F., Zouhiri, F., Mougin, J., Nicolas, V., Desmaele, D., Gref, R. y Couvreur, P. 2015. An efficient system for intracellular delivery of beta-lactam antibiotics to overcome bacterial resistance. *Sci Rep*, 5, 13500.
- Admyre, C., Bohle, B., Johansson, S. M., Focke-Tejkl, M., Valenta, R., Scheynius, A. y Gabrielsson, S. 2007a. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 1418-24.
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filen, J. J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P., Scheynius, A. y Gabrielsson, S. 2007b. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 179, 1969-78.
- Ahlstedt, S., Ekström, B., Svärd, P. O., Sjöberg, B., Kristofferson, A., Örtengren, B. y De Weck, A. L. 1980. New Aspects on Antigens in Penicillin Allergy. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 7, 219-277.
- Ai, G., Dachineni, R., Kumar, D. R., Marimuthu, S., Alfonso, L. F. y Bhat, G. J. 2016. Aspirin acetylates wild type and mutant p53 in colon cancer cells: identification of aspirin acetylated sites on recombinant p53. *Tumour Biol*, 37, 6007-16.
- Aiken, C. T., Kaake, R. M., Wang, X. y Huang, L. 2011. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics*, 10, R110.006924.
- Akimoto, Y., Kaneko, K. y Tamura, T. 1982. Amoxicillin concentrations in serum, jaw cyst, and jawbone following a single oral administration. *J Oral Maxillofac Surg*, 40, 287-93.
- Alberdi, F., Dadone, J., Ryazanov, A., Isenberg, D. A., Ravirajan, C. y Reichlin, M. 2001. Cross-reaction of lupus anti-dsDNA antibodies with protein translation factor EF-2. *Clin Immunol*, 98, 293-300.
- Albin, S. y Agarwal, S. 2014. Prevalence and characteristics of reported penicillin allergy in an urban outpatient adult population. *Allergy Asthma Proc*, 35, 489-94.
- Aldini, G., Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A. y Uchida, K. 2007. Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry*, 46, 2707-18.

- Aldini, G., Domingues, M. R., Spickett, C. M., Domingues, P., Altomare, A., Sanchez-Gomez, F. J., Oeste, C. L. y Perez-Sala, D. 2015. Protein lipoxidation: Detection strategies and challenges. *Redox Biol*, 5, 253-66.
- Almeida, C. A., Martin, A. M., Nolan, D., Lucas, A., Cameron, P. U., James, I., Phillips, E. y Mallal, S. 2008. Cytokine profiling in abacavir hypersensitivity patients. *Antivir Ther*, 13, 281-8.
- Anand, P. K., Anand, E., Bleck, C. K., Anes, E. y Griffiths, G. 2010. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PLoS One*, 5, e10136.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G. y Fais, S. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*, 195, 1303-16.
- Arguelles, S., Machado, A. y Ayala, A. 2009. Adduct formation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde with elongation factor-2 in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 47, 324-30.
- Arguelles, S., Munoz, M. F., Cano, M., Machado, A. y Ayala, A. 2012. In vitro and in vivo protection by melatonin against the decline of elongation factor-2 caused by lipid peroxidation: preservation of protein synthesis. *J Pineal Res*, 53, 1-10.
- Ariza, A., Collado, D., Vida, Y., Montanez, M. I., Perez-Inestrosa, E., Blanca, M., Torres, M. J., Canada, F. J. y Perez-Sala, D. 2014. Study of protein haptentation by amoxicillin through the use of a biotinylated antibiotic. *PLoS One*, 9, e90891.
- Ariza, A., Garzon, D., Abanades, D. R., De Los Rios, V., Vistoli, G., Torres, M. J., Carini, M., Aldini, G. y Perez-Sala, D. 2012. Protein haptentation by amoxicillin: high resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *J Proteomics*, 77, 504-20.
- Ariza, A., Mayorga, C., Fernandez, T. D., Barbero, N., Martin-Serrano, A., Perez-Sala, D., Sanchez-Gomez, F. J., Blanca, M., Torres, M. J. y Montanez, M. I. 2015. Hypersensitivity reactions to beta-lactams: relevance of hapten-protein conjugates. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 25, 12-25.
- Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., De La Salle, H. y Schild, H. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol*, 162, 3757-60.

- Bagai, R., Valujskikh, A., Canaday, D. H., Bailey, E., Lalli, P. N., Harding, C. V. y Heeger, P. S. 2005. Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway. *J Immunol*, 174, 7711-5.
- Baldo, B. A. y Pham, N. H. 2013. Classification and Descriptions of Allergic Reactions to Drugs. *Drug Allergy: Clinical Aspects, Diagnosis, Mechanisms, Structure-Activity Relationships*. New York, NY: Springer New York.
- Baranowski, T. y Wolna, E. 1975. Enolase from human muscle. *Methods Enzymol*, 42, 335-8.
- Baranyai, T., Herczeg, K., Onodi, Z., Voszka, I., Modos, K., Marton, N., Nagy, G., Mager, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Palinkas, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, A., Buzas, E. I., Ferdinandy, P. y Giricz, Z. 2015. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLoS One*, 10, e0145686.
- Bard, M. P., Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luiders, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L. A., Van Meerbeeck, J. P., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C. y Lambrecht, B. N. 2004. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31, 114-21.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. y Srivastava, P. K. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*, 12, 1539-46.
- Batchelor, F. R., Dewdney, J. M. y Gazzard, D. 1965. Penicillin allergy: the formation of the penicilloyl determinant. *Nature*, 206, 362-4.
- Beckman, J. S., Chen, J., Crow, J. P. y Ye, Y. Z. 1994. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res*, 103, 371-80.
- Bell, C. C., Faulkner, L., Martinsson, K., Farrell, J., Alfirevic, A., Tugwood, J., Pirmohamed, M., Naisbitt, D. J. y Park, B. K. 2013. T-cells from HLA-B\*57:01+ human subjects are activated with abacavir through two independent pathways and induce cell death by multiple mechanisms. *Chem Res Toxicol*, 26, 759-66.
- Benedetti, A., Comporti, M. y Esterbauer, H. 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta*, 620, 281-96.

- Bhaiya, P., Roychowdhury, S., Vyas, P. M., Doll, M. A., Hein, D. W. y Svensson, C. K. 2006. Bioactivation, protein haptentation, and toxicity of sulfamethoxazole and dapsone in normal human dermal fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, 215, 158-67.
- Bhatnagar, S. y Schorey, J. S. 2007. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem*, 282, 25779-89.
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. y Schorey, J. S. 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110, 3234-44.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. y Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5, 9-19.
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G. y Hivroz, C. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*, 168, 3235-41.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. y Cresswell, P. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 31, 443-73.
- Boerma, J. S., Dragovic, S., Vermeulen, N. P. y Commandeur, J. N. 2012. Mass spectrometric characterization of protein adducts of multiple P450-dependent reactive intermediates of diclofenac to human glutathione-S-transferase P1-1. *Chem Res Toxicol*, 25, 2532-41.
- Boggs, A. E., Vitolo, M. I., Whipple, R. A., Charpentier, M. S., Goloubeva, O. G., Ioffe, O. B., Tuttle, K. C., Slovic, J., Lu, Y., Mills, G. B. y Martin, S. S. 2015. alpha-Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration. *Cancer Res*, 75, 203-15.
- Bommer, J., Wilhelms, O. H., Barth, H. P., Schindele, H. y Ritz, E. 1985. Anaphylactoid reactions in dialysis patients: role of ethylene-oxide. *Lancet*, 2, 1382-5.
- Bordas-Le Floch, V., Le Mignon, M., Bouley, J., Groeme, R., Jain, K., Baron-Bodo, V., Nony, E., Mascarell, L. y Moingeon, P. 2015. Identification of Novel Short Ragweed Pollen Allergens Using Combined Transcriptomic and Immunoproteomic Approaches. *PLoS One*, 10, e0136258.

- Bouvy, J. C., De Bruin, M. L. y Koopmanschap, M. A. 2015. Epidemiology of adverse drug reactions in Europe: a review of recent observational studies. *Drug Saf*, 38, 437-53.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. y Craig, E. A. 2000. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101, 119-22.
- Butterfield, D. A., Reed, T. y Sultana, R. 2011. Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radical Research*, 45, 59-72.
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. y Bonnerot, C. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17, 879-87.
- Cai, J., Bhatnagar, A. y Pierce, W. M., Jr. 2009. Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chem Res Toxicol*, 22, 708-16.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Bates, T. E., Dinotta, F., Micali, G. y Giuffrida Stella, A. M. 2001. Induction of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: regulation by a natural antioxidant from rosemary extract. *Int J Tissue React*, 23, 51-8.
- Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P. y Novelli, F. 2011. alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *Febs j*, 278, 1064-74.
- Castillo, M., Lam, Y. W., Dooley, M. A., Stahl, E. y Smith, P. C. 1995. Disposition and covalent binding of ibuprofen and its acyl glucuronide in the elderly. *Clin Pharmacol Ther*, 57, 636-44.
- Caulfield, J. J., Fernandez, M. H., Sousa, A. R., Lane, S. J., Lee, T. H. y Hawrylowicz, C. M. 1999. Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids. *Immunology*, 98, 104-10.
- Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F. J. y Pérez-Sala, D. 2001. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem*, 276, 35530-6.
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D. y Tabi, Z. 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res*, 67, 7458-66.

- Cohen, P. 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, 268, 5001-10.
- Colombo, M., Raposo, G. y Thery, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S. C., Mato, J. M. y Falcon-Perez, J. M. 2008. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res*, 7, 5157-66.
- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R. y Wearsch, P. A. 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev*, 207, 145-57.
- Cutrell, A. G., Hernandez, J. E., Fleming, J. W., Edwards, M. T., Moore, M. A., Brothers, C. H. y Scott, T. R. 2004. Updated clinical risk factor analysis of suspected hypersensitivity reactions to abacavir. *Ann Pharmacother*, 38, 2171-2.
- Chan, S. L., Ang, X., Sani, L. L., Ng, H. Y., Winther, M. D., Liu, J. J., Brunham, L. R. y Chan, A. 2016. Prevalence and characteristics of adverse drug reactions at admission to hospital: a prospective observational study. *Br J Clin Pharmacol*, 82, 1636-1646.
- Chaput, N. y Thery, C. 2011. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*, 33, 419-40.
- Chernyshev, V. S., Rachamadugu, R., Tseng, Y. H., Belnap, D. M., Jia, Y., Branch, K. J., Butterfield, A. E., Pease, L. F., 3rd, Bernard, P. S. y Skliar, M. 2015. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*, 407, 3285-301.
- Dai, S., Wan, T., Wang, B., Zhou, X., Xiu, F., Chen, T., Wu, Y. y Cao, X. 2005. More efficient induction of HLA-A\*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res*, 11, 7554-63.
- Davies, M. J. 2016. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 473, 805-25.
- Day, E. K., Sosale, N. G. y Lazzara, M. J. 2016. Cell signaling regulation by protein phosphorylation: a multivariate, heterogeneous, and context-dependent process. *Curr Opin Biotechnol*, 40, 185-192.



- De Weck, A. L. y Eisen, H. N. 1960. Some immunochemical properties of penicillenic acid. An antigenic determinant derived from penicillin. *J Exp Med*, 112, 1227-47.
- Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., Garcia-Melero, A. y Lopez-Aleman, R. 2012. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 156795.
- Doña, I., Blanca-Lopez, N., Torres, M. J., Garcia-Campos, J., Garcia-Nunez, I., Gomez, F., Salas, M., Rondon, C., Canto, M. G. y Blanca, M. 2012. Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 22, 363-71.
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R. y Arnesen, T. 2016. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*, 1864, 1372-401.
- Duijvesz, D., Burnum-Johnson, K. E., Gritsenko, M. A., Hoogland, A. M., Vredenburg-Van Den Berg, M. S., Willemsen, R., Luider, T., Pasa-Tolic, L. y Jenster, G. 2013. Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer. *PLoS One*, 8, e82589.
- Dunmore, B. J., Drake, K. M., Upton, P. D., Toshner, M. R., Aldred, M. A. y Morrell, N. W. 2013. The lysosomal inhibitor, chloroquine, increases cell surface BMPR-II levels and restores BMP9 signalling in endothelial cells harbouring BMPR-II mutations. *Hum Mol Genet*, 22, 3667-79.
- El-Ghaiesh, S., Monshi, M. M., Whitaker, P., Jenkins, R., Meng, X., Farrell, J., Elsheikh, A., Peckham, D., French, N., Pirmohamed, M., Park, B. K. y Naisbitt, D. J. 2012. Characterization of the antigen specificity of T-cell clones from piperacillin-hypersensitive patients with cystic fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, 597-610.
- Epperson, D. E. y Pober, J. S. 1994. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol*, 153, 5402-12.
- Erales, J. y Coffino, P. 2014. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 216-21.
- Ernst, K., Liebscher, M., Mathea, S., Granzhan, A., Schmid, J., Popoff, M. R., Ihmels, H., Barth, H. y Schiene-Fischer, C. 2016. A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating Clostridium perfringens iota toxin. *Sci Rep*, 6, 20301.

- Esterbauer, H., Schaur, R. J. y Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11, 81-128.
- Fairn, G. D. y Grinstein, S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol*, 33, 397-405.
- Faught, E., Henrickson, L. y Vijayan, M. M. 2017. Plasma exosomes are enriched in Hsp70 and modulated by stress and cortisol in rainbow trout. *J Endocrinol*, 232, 237-246.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J. y Sadoul, R. 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*, 31, 642-8.
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q. y Sui, S. F. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11, 675-87.
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A. y Dziedzicka-Wasylewska, M. 2010. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*, 31, 3573-9.
- Fowler, B. A., Whittaker, M. H., Lipsky, M., Wang, G. y Chen, X. Q. 2004. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals*, 17, 567-8.
- Frentz, G., Nielsen, P. B., Espersen, F., Czartoryski, A. y Aastrup, H. 1984. Penicillin concentrations in blood and spinal fluid after a single intramuscular injection of penicillin G benzathine. *European Journal of Clinical Microbiology*, 3, 147-149.
- Fujiwara, K., Shin, M., Miyazaki, T. y Maruta, Y. 2011. Immunocytochemistry for amoxicillin and its use for studying uptake of the drug in the intestine, liver, and kidney of rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 62-71.
- Fukano, K. y Kimura, K. 2014. Measurement of enolase activity in cell lysates. *Methods Enzymol*, 542, 115-24.
- Gao, C., Guo, H., Wei, J., Mi, Z., Wai, P. Y. y Kuo, P. C. 2005. Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide*, 12, 121-6.
- Gao, Y., Chen, Y., Zhan, S., Zhang, W., Xiong, F. y Ge, W. 2017. Comprehensive proteome analysis of lysosomes reveals the diverse

function of macrophages in immune responses. *Oncotarget*, 8, 7420-7440.

Garzón, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Diez-Dacal, B., Sanchez-Gomez, F. J., Timms, J. F. y Perez-Sala, D. 2010. A biotinylated analog of the anti-proliferative prostaglandin A1 allows assessment of PPAR-independent effects and identification of novel cellular targets for covalent modification. *Chem Biol Interact*, 183, 212-21.

Garzon, D., Ariza, A., Regazzoni, L., Clerici, R., Altomare, A., Sirtori, F. R., Carini, M., Torres, M. J., Perez-Sala, D. y Aldini, G. 2014. Mass spectrometric strategies for the identification and characterization of human serum albumin covalently adducted by amoxicillin: ex vivo studies. *Chem Res Toxicol*, 27, 1566-74.

Gayarre, J., Avellano, M. I., Sanchez-Gomez, F. J., Carrasco, M. J., Canada, F. J. y Perez-Sala, D. 2007. Modification of proteins by cyclopentenone prostaglandins is differentially modulated by GSH in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 1096, 78-85.

Gebremedhin, K. G. y Rademacher, D. J. 2016. Histone H3 acetylation in the postmortem Parkinson's disease primary motor cortex. *Neurosci Lett*, 627, 121-5.

Gefen, T., Vaya, J., Khatib, S., Rapoport, I., Lupo, M., Barnea, E., Admon, A., Heller, E. D., Aizenshtein, E. y Pitcovski, J. 2015. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology*, 144, 116-26.

Geisslinger, G., Dietzel, K., Loew, D., Schuster, O., Rau, G., Lachmann, G. y Brune, K. 1989. High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, its metabolites and enantiomers in biological fluids. *J Chromatogr*, 491, 139-49.

Gell, P. G. H. y Coombs, R. R. A. 1968. *Clinical aspects of immunology*, Oxford, Edinburgh,, Blackwell Scientific.

Gerber, B. O. y Pichler, W. J. 2006. Noncovalent interactions of drugs with immune receptors may mediate drug-induced hypersensitivity reactions. *Aaps j*, 8, E160-5.

Gharbi, S., Garzon, B., Gayarre, J., Timms, J. y Perez-Sala, D. 2007. Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom*, 42, 1474-84.

Giachetto, G., Pirez, M. C., Nanni, L., Martinez, A., Montano, A., Algorta, G., Kaplan, S. L. y Ferrari, A. M. 2004. Ampicillin and penicillin concentration

- in serum and pleural fluid of hospitalized children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*, 23, 625-9.
- Gitlits, V. M., Sentry, J. W., Matthew, M. L., Smith, A. I. y Toh, B. H. 1997. Autoantibodies to evolutionarily conserved epitopes of enolase in a patient with discoid lupus erythematosus. *Immunology*, 92, 362-8.
- Gitlits, V. M., Toh, B. H. y Sentry, J. W. 2001. Disease association, origin, and clinical relevance of autoantibodies to the glycolytic enzyme enolase. *J Investig Med*, 49, 138-45.
- Golizeh, M., Leblanc, A. y Sleno, L. 2015. Identification of Acetaminophen Adducts of Rat Liver Microsomal Proteins using 2D-LC-MS/MS. *Chem Res Toxicol*, 28, 2142-50.
- Gomes, F. G., Sandim, V., Almeida, V. H., Rondon, A. M. R., Succar, B. B., Hottz, E. D., Leal, A. C., Vercoza, B. R. F., Rodrigues, J. C. F., Bozza, P. T., Zingali, R. B. y Monteiro, R. Q. 2017. Breast-cancer extracellular vesicles induce platelet activation and aggregation by tissue factor-independent and -dependent mechanisms. *Thromb Res*, 159, 24-32.
- González-Morena, J. M., Montañez, M. I., Aldini, G., Sánchez-Gómez, F. J. y Pérez-Sala, D. 2016. Adduct Formation and Context Factors in Drug Hypersensitivity: Insight from Proteomic Studies. *Curr Pharm Des*, 22, 6748-6758.
- Gordon, S. y Taylor, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. y Dustin, M. L. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285, 221-7.
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J. y Chen, W. 2015. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 40, 72-81.
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. y Boutros, M. 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 1036-45.
- Hammad, H. y Lambrecht, B. N. 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*, 43, 29-40.
- Hammond, T. G., Meng, X., Jenkins, R. E., Maggs, J. L., Castelazo, A. S., Regan, S. L., Bennett, S. N., Earnshaw, C. J., Aithal, G. P., Pande, I., Kenna, J. G., Stachulski, A. V., Park, B. K. y Williams, D. P. 2014. Mass spectrometric characterization of circulating covalent protein adducts

derived from a drug acyl glucuronide metabolite: multiple albumin adductions in diclofenac patients. *J Pharmacol Exp Ther*, 350, 387-402.

Hannaert, V., Brinkmann, H., Nowitzki, U., Lee, J. A., Albert, M. A., Sensen, C. W., Gaasterland, T., Muller, M., Michels, P. y Martin, W. 2000. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol*, 17, 989-1000.

Hanson, P. I. y Cashikar, A. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 337-62.

Hartl, F. U. y Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-8.

Hinson, J. A., Pumford, N. R. y Roberts, D. W. 1995. Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab Rev*, 27, 73-92.

Homewood, C. A., Warhurst, D. C., Peters, W. y Baggaley, V. C. 1972. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 235, 50-2.

Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G. y Rivoltini, L. 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128, 1796-804.

Hume, D. A. 2008. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*, 181, 5829-35.

Huppa, J. B. y Davis, M. M. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 3, 973-83.

Hwang, I. 2013. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol Cells*, 36, 105-11.

Hyo, J. K., Seung, J. K., Sang, J. C. y Suk-Kyeong, J. 2008. Crystal Structure of Enolase1 alpha. *Trabajo no publicado*.

Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., Paulaitis, M. E., Piper, M. G. y Marsh, C. B. 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121, 984-95.

- Ito, N., Ito, K., Ikebuchi, Y., Toyoda, Y., Takada, T., Hisaka, A., Oka, A. y Suzuki, H. 2015. Prediction of Drug Transfer into Milk Considering Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)-Mediated Transport. *Pharm Res*, 32, 2527-37.
- Janssen, E. M., Wauben, M. H., Nijkamp, F. P., Van Eden, W. y Van Oosterhout, A. J. 2002. Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 257-64.
- Jenkins, R. E., Meng, X., Elliott, V. L., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M. y Park, B. K. 2009. Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo. *Proteomics Clin Appl*, 3, 720-9.
- Jenkins, R. E., Yaseen, F. S., Monshi, M. M., Whitaker, P., Meng, X., Farrell, J., Hamlett, J., Sanderson, J. P., El-Ghaiesh, S., Peckham, D., Pirmohamed, M., Park, B. K. y Naisbitt, D. J. 2013. beta-Lactam antibiotics form distinct haptenic structures on albumin and activate drug-specific T-lymphocyte responses in multiallergic patients with cystic fibrosis. *Chem Res Toxicol*, 26, 963-75.
- Jiang, L., He, L. y Fountoulakis, M. 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A*, 1023, 317-20.
- Jiang, Z. y Zhu, L. 2016. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy*, 9, 101-7.
- Johnstone, R. M., Bianchini, A. y Teng, K. 1989. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*, 74, 1844-51.
- Kapustin, A. N., Chatrou, M. L., Drozdov, I., Zheng, Y., Davidson, S. M., Soong, D., Furmanik, M., Sanchis, P., De Rosales, R. T., Alvarez-Hernandez, D., Shroff, R., Yin, X., Muller, K., Skepper, J. N., Mayr, M., Reutelingsperger, C. P., Chester, A., Bertazzo, S., Schurgers, L. J. y Shanahan, C. M. 2015. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*, 116, 1312-23.
- Karol, M. H., Ioset, H. H. y Alarie, Y. C. 1978. Toluyl-specific IgE antibodies in workers with hypersensitivity to toluene diisocyanate. *Am Ind Hyg Assoc J*, 39, 454-8.
- Kaul, G., Pattan, G. y Rafeequi, T. 2011. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct*, 29, 227-34.

- Kinloch, A., Tatzler, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P. C. y Venables, P. J. 2005. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7, R1421-9.
- Kirkegaard, T., Roth, A. G., Petersen, N. H., Mahalka, A. K., Olsen, O. D., Moilanen, I., Zylicz, A., Knudsen, J., Sandhoff, K., Arenz, C., Kinnunen, P. K., Nylandsted, J. y Jaattela, M. 2010. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*, 463, 549-53.
- Klareskog, L., Ronnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L. y Alfredsson, L. 2008. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 26, 651-75.
- Kobayashi, K. S. y Van Den Elsen, P. J. 2012. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*, 12, 813-20.
- Koles, K. y Budnik, V. 2012. Exosomes go with the Wnt. *Cell Logist*, 2, 169-173.
- Kulshreshtha, A., Ahmad T Fau - Agrawal, A., Agrawal a Fau - Ghosh, B. y Ghosh, B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation.
- L. Hawkins, C. y J. Davies, M. 1998. EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2617-2622.
- Lajunen, T., Viitala, L., Kontturi, L. S., Laaksonen, T., Liang, H., Vuorimaa-Laukkanen, E., Viitala, T., Le Guevel, X., Yliperttula, M., Murtomaki, L. y Urtili, A. 2015. Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles. *J Control Release*, 203, 85-98.
- Landsteiner, K. y Jacobs, J. 1935. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. *J Exp Med*, 61, 643-56.
- Lanouette, S., Mongeon, V., Figeys, D. y Couture, J. F. 2014. The functional diversity of protein lysine methylation. *Mol Syst Biol*, 10, 724.
- Larsen, T. M., Wedekind, J. E., Rayment, I. y Reed, G. H. 1996. A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution. *Biochemistry*, 35, 4349-58.

- Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., Hynan, L. S., Reisch, J. S., Schiodt, F. V., Ostapowicz, G., Shakil, A. O. y Lee, W. M. 2005. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42, 1364-72.
- Lasser, C., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., Sjostrand, M., Gabrielsson, S., Lotvall, J. y Valadi, H. 2011. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*, 9, 9.
- Levine, B. B. y Ovary, Z. 1961. Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-alpha-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med*, 114, 875-904.
- Li, J., Liu, K., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, F., Yang, H., Liu, J., Pan, T., Chen, J., Wu, M., Zhou, X. y Yuan, Z. 2013. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-[alpha]-induced antiviral activity. *Nat Immunol*, 14, 793-803.
- Li, M., Rong, Y., Chuang, Y. S., Peng, D. y Emr, S. D. 2015. Ubiquitin-dependent lysosomal membrane protein sorting and degradation. *Mol Cell*, 57, 467-78.
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A. y Vlassov, A. V. 2014. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B. y Knolle, P. A. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*, 6, 1348-54.
- Liyasova, M. S., Schopfer, L. M. y Lockridge, O. 2010. Reaction of human albumin with aspirin in vitro: mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545. *Biochem Pharmacol*, 79, 784-91.
- Long, L., Yang, X., Southwood, M., Lu, J., Marciniak, S. J., Dunmore, B. J. y Morrell, N. W. 2013. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*, 112, 1159-70.
- Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B. A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T. R. y Venables, P. J. 2008. Antibodies to citrullinated alpha-



enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum*, 58, 3009-19.

Llorente, A., Skotland, T., Sylvanne, T., Kauhanen, D., Rog, T., Orlowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K. y Sandvig, K. 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 1302-9.

Macy, E. 2014. Penicillin and beta-lactam allergy: epidemiology and diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14, 476.

Mallal, S., Nolan, D., Witt, C., Masel, G., Martin, A. M., Moore, C., Sayer, D., Castley, A., Mamotte, C., Maxwell, D., James, I. y Christiansen, F. T. 2002. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*, 359, 727-32.

Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J. K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N. y Heyman, M. 2007. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*, 132, 1866-76.

Mani, B. M., Huerta-Ocampo, J. A., Garcia-Sanchez, J. R., Barrera-Pacheco, A., De La Rosa, A. P. y Teran, L. M. 2015. Identification of *Ligustrum lucidum* pollen allergens using a proteomics approach. *Biochem Biophys Res Commun*, 468, 788-92.

Mantegazza, A. R., Magalhaes, J. G., Amigorena, S. y Marks, M. S. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 14, 135-52.

Martin, F. y Chan, A. C. 2006. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol*, 24, 467-96.

Martin, S. F., Esser, P. R., Schmucker, S., Dietz, L., Naisbitt, D. J., Park, B. K., Vocanson, M., Nicolas, J. F., Keller, M., Pichler, W. J., Peiser, M., Luch, A., Wanner, R., Maggi, E., Cavani, A., Rustemeyer, T., Richter, A., Thierse, H. J. y Sallusto, F. 2010. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell Mol Life Sci*, 67, 4171-84.

Martínez, F. O., Gordon, S., Locati, M. y Mantovani, A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*, 177, 7303-11.

- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045.
- Mayorga, C., Obispo, T., Jimeno, L., Blanca, M., Moscoso Del Prado, J., Carreira, J., Garcia, J. J. y Juarez, C. 1995. Epitope mapping of beta-lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. *Toxicology*, 97, 225-34.
- Meng, X., Earnshaw, C. J., Tailor, A., Jenkins, R. E., Waddington, J. C., Whitaker, P., French, N. S., Naisbitt, D. J. y Park, B. K. 2016. Amoxicillin and Clavulanate Form Chemically and Immunologically Distinct Multiple Haptenic Structures in Patients. *Chem Res Toxicol*, 29, 1762-1772.
- Meng, X., Howarth, A., Earnshaw, C. J., Jenkins, R. E., French, N. S., Back, D. J., Naisbitt, D. J. y Park, B. K. 2013. Detection of drug bioactivation in vivo: mechanism of nevirapine-albumin conjugate formation in patients. *Chem Res Toxicol*, 26, 575-83.
- Meng, X., Jenkins, R. E., Berry, N. G., Maggs, J. L., Farrell, J., Lane, C. S., Stachulski, A. V., French, N. S., Naisbitt, D. J., Pirmohamed, M. y Park, B. K. 2011. Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillenic acid in patients. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 841-9.
- Meng, X., Lawrenson, A. S., Berry, N. G., Maggs, J. L., French, N. S., Back, D. J., Khoo, S. H., Naisbitt, D. J. y Park, B. K. 2014. Abacavir forms novel cross-linking abacavir protein adducts in patients. *Chem Res Toxicol*, 27, 524-35.
- Mitchell, P. J., Welton, J., Staffurth, J., Court, J., Mason, M. D., Tabi, Z. y Clayton, A. 2009. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med*, 7, 4.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A. y Sanchez-Madrid, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2, 282.
- Mittelbrunn, M. y Sanchez-Madrid, F. 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 328-35.
- Moretti, M. E. 2009. Psychotropic drugs in lactation--Motherisk Update 2008. *Can J Clin Pharmacol*, 16, e49-57.
- Mosser, D. M. y Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.

- Mousavi, F., Majd, A., Shahali, Y., Ghahremaninejad, F., Shokouhi Shoormasti, R. y Pourpak, Z. 2017. Immunoproteomics of tree of heaven (*Ailanthus altissima*) pollen allergens. *J Proteomics*, 154, 94-101.
- Muntasell, A., Berger, A. C. y Roche, P. A. 2007. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *Embo j*, 26, 4263-72.
- Nazimek, K., Bryniarski, K. y Askenase, P. W. 2016. Functions of Exosomes and Microbial Extracellular Vesicles in Allergy and Contact and Delayed-Type Hypersensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*, 171, 1-26.
- Noguera-Salva, M. A., Guardiola-Serrano, F., Martin, M. L., Marcilla-Etxenike, A., Bergo, M. O., Busquets, X. y Escriba, P. V. 2017. Role of the C-terminal basic amino acids and the lipid anchor of the Ggamma2 protein in membrane interactions and cell localization. *Biochim Biophys Acta*, 1859, 1536-1547.
- Norcross, M. A. 1984. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)*, 135d, 113-34.
- Norcross, M. A., Luo, S., Lu, L., Boyne, M. T., Gomarteli, M., Rennels, A. D., Woodcock, J., Margulies, D. H., Mcmurtrey, C., Vernon, S., Hildebrand, W. H. y Buchli, R. 2012. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B\*57: 01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *Aids*, 26, F21-9.
- Novikov, D. V., Belousov, S. S., Karaulov, A. V., Eroshevskaya, N. V., Shumilova, S. V., Kasatova, E. S., Kazatskaya Zh, A. y Novikov, V. V. 2015. Levocarnitine normalizes elevated blood level of soluble Fas mRNA in patients with acute myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med*, 158, 617-20.
- Oeste, C. L. y Pérez-Sala, D. 2014. Modification of cysteine residues by cyclopentenone prostaglandins: interplay with redox regulation of protein function. *Mass Spectrom Rev*, 33, 110-25.
- Oppenheimer, N. J. y Bodley, J. W. 1981. Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP-ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *J Biol Chem*, 256, 8579-81.
- Pancholi, V. 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58, 902-20.
- Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 11, 331-60.

- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M. y Fais, S. 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*, 284, 34211-22.
- Patterson, R., Pateras, V., Grammer, L. C. y Harris, K. E. 1986. Human antibodies against formaldehyde-human serum albumin conjugates or human serum albumin in individuals exposed to formaldehyde. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 79, 53-9.
- Paul, W. E. y Seder, R. A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76, 241-51.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Kang, Y., Bromberg, J. y Lyden, D. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18, 883-91.
- Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E. y Canada, F. J. 2003. Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem*, 278, 51251-60.
- Perluigi, M., Fai Poon, H., Hensley, K., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., De Marco, C. y Butterfield, D. A. 2005. Proteomic analysis of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice--a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*, 38, 960-8.
- Perluigi, M., Sultana, R., Cenini, G., Di Domenico, F., Memo, M., Pierce, W. M., Coccia, R. y Butterfield, D. A. 2009. Redox proteomics identification of 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in Alzheimer's disease: Role of lipid peroxidation in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proteomics Clin Appl*, 3, 682-693.
- Peyriere, H., Guillemin, V., Lotthe, A., Baillat, V., Fabre, J., Favier, C., Atoui, N., Hansel, S., Hillaire-Buys, D. y Reynes, J. 2003. Reasons for early abacavir discontinuation in HIV-infected patients. *Ann Pharmacother*, 37, 1392-7.
- Pickering, A. M. y Davies, K. J. 2012. Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 109, 227-48.

- Pichler, W. J. 2008. The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors. *World Allergy Organ J*, 1, 96-102.
- Piper, R. C. y Katzmann, D. J. 2007. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 519-47.
- Prado, N., Marazuela, E. G., Segura, E., Fernandez-Garcia, H., Villalba, M., Thery, C., Rodriguez, R. y Batanero, E. 2008. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol*, 181, 1519-25.
- Pratt, W. B. y Toft, D. O. 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228, 111-33.
- Praul, C. A., Brubaker, K. D., Leach, R. M. y Gay, C. V. 1998. Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 312-4.
- Pryor, P. R. 2012. Analyzing lysosomes in live cells. *Methods Enzymol*, 505, 145-57.
- Qiu, S., Du, Y., Duan, X., Geng, X., Xie, J., Gao, H. y Yang, P. C. 2011. Cytotoxic T lymphocytes mediate chronic inflammation of the nasal mucosa of patients with atypical allergic rhinitis. *N Am J Med Sci*, 3, 378-83.
- Quah, B. J. y O'Neill, H. C. 2007. Mycoplasma contaminants present in exosome preparations induce polyclonal B cell responses. *J Leukoc Biol*, 82, 1070-82.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A. y Breiteneder, H. 2008. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 847-52.e7.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. y Geuze, H. J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183, 1161-72.
- Raposo, G. y Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-83.
- Rawlins, M. D. y Thompson, J. W. 1977. Pathogenesis of adverse drug reactions. In: Davies, D. M. (ed.) *Textbook of adverse drug reactions*. Oxford: Oxford University Press.

- Reed, T., Perluigi, M., Sultana, R., Pierce, W. M., Klein, J. B., Turner, D. M., Coccia, R., Markesbery, W. R. y Butterfield, D. A. 2008. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 30, 107-20.
- Reed, T. T., Pierce, W. M., Markesbery, W. R. y Butterfield, D. A. 2009. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res*, 1274, 66-76.
- Regazzoni, L., Del Vecchio, L., Altomare, A., Yeum, K. J., Cusi, D., Locatelli, F., Carini, M. y Aldini, G. 2013. Human serum albumin cysteinylolation is increased in end stage renal disease patients and reduced by hemodialysis: mass spectrometry studies. *Free Radic Res*, 47, 172-80.
- Robbe, P., Draijer, C., Borg, T. R., Luinge, M., Timens, W., Wouters, I. M., Melgert, B. N. y Hylkema, M. N. 2015. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, L358-67.
- Roche, P. A. y Furuta, K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 15, 203-16.
- Rodríguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. y Amigorena, S. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1, 362-8.
- Rothermel, A. L., Wang, Y., Schechner, J., Mook-Kanamori, B., Aird, W. C., Pober, J. S., Tellides, G. y Johnson, D. R. 2004. Endothelial cells present antigens in vivo. *BMC Immunol*, 5, 5.
- Roychowdhury, S., Vyas, P. M. y Svensson, C. K. 2007. Formation and uptake of arylhydroxylamine-haptenated proteins in human dendritic cells. *Drug Metab Dispos*, 35, 676-81.
- Rudensky, A. y Beers, C. 2006. Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 81-95.
- Saha, B., Sircar, G., Pandey, N. y Gupta Bhattacharya, S. 2015. Mining Novel Allergens from Coconut Pollen Employing Manual De Novo Sequencing and Homology-Driven Proteomics. *J Proteome Res*, 14, 4823-33.
- Sala-Rabanal, M., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Turk, E. y Wright, E. M. 2006. Molecular interactions between dipeptides, drugs and the human

- intestinal H<sup>+</sup> -oligopeptide cotransporter hPEPT1. *J Physiol*, 574, 149-66.
- Sala-Rabanal, M., Loo, D. D., Hirayama, B. A. y Wright, E. M. 2008. Molecular mechanism of dipeptide and drug transport by the human renal H<sup>+</sup>/oligopeptide cotransporter hPEPT2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, F1422-32.
- Sánchez-Gómez, F. J., Díez-Dacal, B., Pajares, M. A., Llorca, O. y Pérez-Sala, D. 2010. Cyclopentenone prostaglandins with dienone structure promote cross-linking of the chemoresistance-inducing enzyme glutathione transferase P1-1. *Mol Pharmacol*, 78, 723-33.
- Sánchez-Gómez, F. J., Dorado, C. G., Ayuso, P., Agundez, J. A., Pajares, M. A. y Pérez-Sala, D. 2013. Modulation of GSTP1-1 oligomerization by electrophilic inflammatory mediators and reactive drugs. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 12, 162-71.
- Sánchez-Gómez, F. J., Gayarre, J., Avellano, M. I. y Pérez-Sala, D. 2007. Direct evidence for the covalent modification of glutathione-S-transferase P1-1 by electrophilic prostaglandins: implications for enzyme inactivation and cell survival. *Arch Biochem Biophys*, 457, 150-9.
- Sánchez-Madrid, F. y Del Pozo, M. A. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo j*, 18, 501-11.
- Sanner, M. F. 1999. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 17, 57-61.
- Sastre, B., Canas, J. A., Rodrigo-Munoz, J. M. y Del Pozo, V. 2017. Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Front Immunol*, 8, 826.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. y Colombo, M. I. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, 278, 20083-90.
- Sayre, L. M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X. y Tang, X. 2006. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev*, 38, 651-75.
- Schreier, B. y Hocker, B. 2010. Engineering the enolase magnesium II binding site: implications for its evolution. *Biochemistry*, 49, 7582-9.
- Schrodinger, Llc 2015. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.

- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Veron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S. y Thery, C. 2005. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*, 106, 216-23.
- Segura, E. y Villadangos, J. A. 2011. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic*, 12, 1677-85.
- Sekiya, T., Miyamasu, M., Imanishi, M., Yamada, H., Nakajima, T., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Pawankar, R., Sano, Y., Ohta, K., Ishii, A., Morita, Y., Yamamoto, K., Matsushima, K., Yoshie, O. y Hirai, K. 2000. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 165, 2205-13.
- Shen, X. M. y Dryhurst, G. 1998. Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: possible insights into iron- and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 11, 824-37.
- Shenoda, B. B. y Ajit, S. K. 2016. Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells. *Clin Med Insights Pathol*, 9, 1-8.
- Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L. y Chapman, H. A. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10, 197-206.
- Skogberg, G., Lundberg, V., Berglund, M., Gudmundsdottir, J., Telemo, E., Lindgren, S. y Ekwall, O. 2015. Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. *Immunol Cell Biol*, 93, 727-34.
- Skokos, D., Botros, H. G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S. y Mecheri, S. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol*, 170, 3037-45.
- Skokos, D., Goubran-Botros, H., Roa, M. y Mecheri, S. 2002. Immunoregulatory properties of mast cell-derived exosomes. *Mol Immunol*, 38, 1359-62.
- Slater, A. F. 1993. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, 57, 203-35.



- Sloan-Lancaster, J., Presley, J., Ellenberg, J., Yamazaki, T., Lippincott-Schwartz, J. y Samelson, L. E. 1998. ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol*, 143, 613-24.
- Smathers, R. L., Galligan, J. J., Stewart, B. J. y Petersen, D. R. 2011. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact*, 192, 107-12.
- Smiljanic, K., Apostolovic, D., Trifunovic, S., Ognjenovic, J., Perusko, M., Mihajlovic, L., Burazer, L., Van Hage, M. y Cirkovic Velickovic, T. 2017. Subpollen particles are rich carriers of major short ragweed allergens and NADH dehydrogenases: quantitative proteomic and allergomic study. *Clin Exp Allergy*, 47, 815-828.
- Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P. y Appel, S. H. 1998. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 44, 696-9.
- Solomon, V. R. y Lee, H. 2009. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, 625, 220-33.
- Stamatakis, K. y Perez-Sala, D. 2006. Prostanoids with cyclopentenone structure as tools for the characterization of electrophilic lipid-protein interactomes. *Ann N Y Acad Sci*, 1091, 548-70.
- Stamm, L. V. y Young, N. R. 1997. Nucleotide sequence of the *Treponema pallidum* *eno* gene. *DNA Seq*, 7, 261-5.
- Stausberg, J. 2014. International prevalence of adverse drug events in hospitals: an analysis of routine data from England, Germany, and the USA. *BMC Health Serv Res*, 14, 125.
- Su, X., Lin, Z. y Lin, H. 2013. The biosynthesis and biological function of diphthamide. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48, 515-21.
- Talib, J., Beck, J. L. y Ralph, S. F. 2006. A mass spectrometric investigation of the binding of gold antiarthritic agents and the metabolite [Au(CN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> to human serum albumin. *J Biol Inorg Chem*, 11, 559-70.
- Tamai, I., Terasaki, T. y Tsuji, A. 1985. Evidence for the existence of a common transport system of beta-lactam antibiotics in isolated rat hepatocytes. *J Antibiot (Tokyo)*, 38, 1774-80.
- Tang, M. K. y Wong, A. S. 2015. Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer. *Cancer Lett*, 367, 26-33.

- Tannenbaum, S. R., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Stillwell, W. G., Day, B. W. y Taghizadeh, K. 1993. Characterization of various classes of protein adducts. *Environ Health Perspect*, 99, 51-5.
- Taylor, D. D. y Gercel-Taylor, C. 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer*, 92, 305-11.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. y Clayton, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O. y Amigorena, S. 2002a. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 3, 1156-62.
- Thery, C., Zitvogel, L. y Amigorena, S. 2002b. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2, 569-79.
- Thompson, R. A., Isin, E. M., Ogese, M. O., Mettetal, J. T. y Williams, D. P. 2016. Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. *Chemical Research in Toxicology*, 29, 505-533.
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. y Xiao, Z. 2010. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem*, 111, 488-96.
- Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H. y Xiao, Z. D. 2014. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*, 289, 22258-67.
- Tomm, J. M., Van Do, T., Jende, C., Simon, J. C., Treudler, R., Von Bergen, M. y Averbek, M. 2013. Identification of new potential allergens from Nile perch (*Lates niloticus*) and cod (*Gadus morhua*). *J Investig Allergol Clin Immunol*, 23, 159-67.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B. y Simons, M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319, 1244-7.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., Jr. y Heine, U. 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 645, 63-70.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 133-46.

- Trott, O. y Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31, 455-61.
- Truman, J. P., Al Gadban, M. M., Smith, K. J., Jenkins, R. W., Mayroo, N., Virella, G., Lopes-Virella, M. F., Bielawska, A., Hannun, Y. A. y Hammad, S. M. 2012. Differential regulation of acid sphingomyelinase in macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL immune complexes: role in phagocytosis and cytokine release. *Immunology*, 136, 30-45.
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. y Kawashima, S. 1996. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem*, 119, 572-6.
- Unanue, E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol*, 2, 395-428.
- Urbe, S. 2005. Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem*, 41, 81-98.
- Vallhov, H., Gutzeit, C., Hultenby, K., Valenta, R., Gronlund, H. y Scheynius, A. 2015. Dendritic cell-derived exosomes carry the major cat allergen Fel d 1 and induce an allergic immune response. *Allergy*, 70, 1651-5.
- Van Damme, P., Arnesen, T. y Gevaert, K. 2011. Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics. *Febs j*, 278, 3822-34.
- Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Goodman, H. M. y Van Montagu, M. 1991. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *Plant Cell*, 3, 719-35.
- Van Iersel, M. L., Ploemen, J. P., Lo Bello, M., Federici, G. y Van Bladeren, P. J. 1997. Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact*, 108, 67-78.
- Van Ness, B. G., Howard, J. B. y Bodley, J. W. 1978. Isolation and properties of the trypsin-derived ADP-ribosyl peptide from diphtheria toxin-modified yeast elongation factor 2. *J Biol Chem*, 253, 8687-90.
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N. y Heyman, M. 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, 121, 337-49.

- Verdin, E. y Ott, M. 2015. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 258-64.
- Villadangos, J. A., Bryant, R. A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A. M., Riese, R. J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., Peters, C. y Ploegh, H. L. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 172, 109-20.
- Von Bergwelt-Baildon, M. S., Vonderheide, R. H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K. S., Butler, M. O., Xia, Z., Zeng, W. Y., Wucherpfennig, K. W., Nadler, L. M. y Schultze, J. L. 2002. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood*, 99, 3319-25.
- Wang, J., Yeung, B. Z., Cui, M., Peer, C. J., Lu, Z., Figg, W. D., Guillaume Wientjes, M., Woo, S. y Au, J. L. 2017a. Exosome is a mechanism of intercellular drug transfer: Application of quantitative pharmacology. *J Control Release*, 268, 147-158.
- Wang, L. C., Liao, L. X., Lv, H. N., Liu, D., Dong, W., Zhu, J., Chen, J. F., Shi, M. L., Fu, G., Song, X. M., Jiang, Y., Zeng, K. W. y Tu, P. F. 2017b. Highly Selective Activation of Heat Shock Protein 70 by Allosteric Regulation Provides an Insight into Efficient Neuroinflammation Inhibition. *EBioMedicine*, 23, 160-172.
- Wegner, N., Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B., Malmstrom, V., Feldmann, M. y Venables, P. J. 2010. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, 233, 34-54.
- Wei, H., Mundade, R., Lange, K. C. y Lu, T. 2014. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle*, 13, 32-41.
- Westerheide, S. D. y Morimoto, R. I. 2005. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem*, 280, 33097-100.
- Whitaker, P., Meng, X., Lavergne, S. N., El-Ghaiesh, S., Monshi, M., Earnshaw, C., Peckham, D., Gooi, J., Conway, S., Pirmohamed, M., Jenkins, R. E., Naisbitt, D. J. y Park, B. K. 2011. Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*, 187, 200-11.
- Wilkinson, F., Helman, W. P. y Ross, A. B. 1995. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of

Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24, 663-677.

Witkowski, G., Lode, H., Hoffken, G. y Koeppe, P. 1982. Pharmacokinetic studies of amoxicillin, potassium clavulanate and their combination. *Eur J Clin Microbiol*, 1, 233-7.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., They, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. y Zitvogel, L. 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, 7, 297-303.

World Health Organization. 1972. *International drug monitoring : the role of national centres , report of a WHO meeting [held in Geneva from 20 to 25 September 1971]*, Geneva, World Health Organization.

Xu, S. 2015. Internalization, Trafficking, Intracellular Processing and Actions of Antibody-Drug Conjugates. *Pharm Res*, 32, 3577-83.

Xue, L., Salimi, M., Panse, I., Mjosberg, J. M., Mckenzie, A. N., Spits, H., Klenerman, P. y Ogg, G. 2014. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 1184-94.

Yamamoto, Y., Takase, K., Kishino, J., Fujita, M., Okamura, N., Sakaeda, T., Fujimoto, M. y Yagami, T. 2011. Proteomic identification of protein targets for 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 in neuronal plasma membrane. *PLoS One*, 6, e17552.

Yamasaki, K., Chuang, V. T., Maruyama, T. y Otagiri, M. 2013. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5435-43.

Yang, X. X., Hu, Z. P., Chan, S. Y. y Zhou, S. F. 2006. Monitoring drug-protein interaction. *Clin Chim Acta*, 365, 9-29.

Yip, V., Maggs, J., Meng, X., Marson, A., Park, K. y Pirmohamed, M. 2014. Covalent adduction of carbamazepine 10, 11-epoxide with human serum albumin and glutathione S-transferase pi: implications for carbamazepine hypersensitivity. *The Lancet*, 383, S114.

Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H. I., Kelly, J. D., Neal, D. E., Maehara, Y., Ponder, B. A., Nakamura, Y. y Hamamoto, R. 2011. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer*, 128, 562-73.

- Yusuf, N., Nasti, T. H., Huang, C. M., Huber, B. S., Jaleel, T., Lin, H. Y., Xu, H. y Elmets, C. A. 2009. Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J Immunol*, 182, 675-83.
- Yuyama, K., Yamamoto, N. y Yanagisawa, K. 2008. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J Neurochem*, 105, 217-24.
- Zhang, K., Schrag, M., Crofton, A., Trivedi, R., Vinters, H. y Kirsch, W. 2012. Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics*, 12, 1261-8.
- Zhivkova, Z. D. 2015. Studies on drug-human serum albumin binding: the current state of the matter. *Curr Pharm Des*, 21, 1817-30.
- Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M. y Chen, Y. Z. 2005. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev*, 37, 41-213.
- Zhou, W., Capello, M., Fredolini, C., Piemonti, L., Liotta, L. A., Novelli, F. y Petricoin, E. F. 2010. Mass spectrometry analysis of the post-translational modifications of alpha-enolase from pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *J Proteome Res*, 9, 2929-36.
- Zitvogel, L., Angevin, E. y Tursz, T. 2000. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Ann Oncol*, 11 Suppl 3, 199-205.









