



**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PAPER DELS TRANSPORTADORS  
DE NUCLEÒSIDS EQUILIBRATIUS EN LA  
SENSIBILITAT A FÀRMACS ANTINEOPLÀSICS**

**Míriam Molina Arcas  
Barcelona 2005**



**MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR  
PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PROGRAMA DE BIOMEDICINA  
Bienni 1999-2001**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PRESENTADA PER  
MÍRIAM MOLINA ARCAS**

**La interessada,**

**Míriam Molina Arcas**

**Vist i plau dels directors**

**Dr. MARÇAL  
PASTOR ANGLADA  
Catedràtic de Bioquímica  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona**

**Dr. FRANCISCO JAVIER  
CASADO MEREDIZ  
Prof. titular de Bioquímica  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona**



*Un expert és aquell que ha  
comès tots els errors possibles  
en una matèria molt concreta.*

Niels Bohr



*Als meus avis*





Tot i que és el primer que es veu quan s'obre la tesi, escric aquestes paraules al final de tota la feina. La veritat és que crec que el meu cervell ja no dóna per més, ja no em queden paraules i no sé si seré capaç d'escriure el que sento. És una gran responsabilitat, perquè siguem realistes, la majoria només us llegireu aquestes pàgines!

Primer de tot vull demanar disculpes per tots aquells agraiments que no quedin escrits en aquestes poques pàgines i per aquells que us sentiu decebutos perquè pensàveu que tindria per a vosaltres una frase més brillant... És molt difícil expressar el que sento en aquests moments i encara més intentar-ho fer en un espai reduït. Sinó puc córrer el risc que ocupin més que la tesi...

Gràcies a tu Marçal escric aquests agraiments. Un dia, pràcticament sense conèixe'm, vas confiar en mi i vas oferir-me la possibilitat de fer la tesi. Moltes gràcies per permetre'm entrar en aquest grup, que no sé si prefereixo per la qualitat de la ciència que s'hi fa o per la gent que hi treballa. Gràcies per encomanar-me la teva passió per la ciència, tot i que jo hi aportí una vessant més escèptica...

Gracias Javi por explicarme un millón de veces mis dudas tontas sobre estadística. Por aguantar mis visitas a tu despacho y decirme siempre lo que quería oír, aunque no fuese verdad... Y sobretodo por permitirme viajar y mejorar mis conocimientos sobre geografía y gastronomía. Aunque tengo que reconocer que mi sentido de la orientación no ha mejorado mucho...

Recordaré tota la vida el meu primer contacte amb els transportadors de nucleòsids. Més de dues hores a la sala d'estudis aguantant un rotllo del que no vaig entendre pràcticament res!! En molts moments vaig dubtar de què servís per això, sobretot quan sortia del despatx d'en Marçal amb una fulla escrita sense entendre que es el que volia que fes. Gracias Jose por ayudarme en mis inicios y no tan inicios, por contármelo todo y más. Muchas gracias por estar siempre ahí, por estar siempre listo para ayudar en lo que fuese sin esperar nada a cambio, por no quejarte cuando te llevaba la contraria, te hacía callar o sobretodo cuando te eché de la poyata... Por cierto, yo hablo mejor castellano que tu catalán!!

Amb en Jose comença la meua generació RST, que es completa amb les nenes. Sonia, contigo empecé esta aventura. Aunque veníamos de misma clase creo que nuestra amistad empezó el día que intentábamos redactar un proyecto para pedir una beca sin saber nada sobre transportadores... Hemos hecho un gran camino juntas y me has ayudado a soportar lo peor de la tesis (cursos de doctorado, becas...), aunque al final me dejaste y leíste la tesis antes que yo... Aunque no te lo creas eres la persona que más ha conseguido que hablara sobre mí. Eso sí, siempre delante de unas cervecitas. Muchas gracias por todo. Ivette, tu has estat la successora de la Sonia com a companya de burocràcia. Jo sóc un desastre en aquests temes, però he de reconèixer que em guanyes... Ara, juntes hem fet un bon tàndem. Tu has portat l'energia al laboratori, sempre corrent amunt i avall, robant coses i tornant-les. Moltes gràcies per acollir-me a casa teva, pels viatges a Canet amb cotxe i per milers de coses més (tu més que ningú m'entens quan et dic que no em surten les paraules). Potser també t'hauria de demanar perdó pels meus silencis en alguns moments... Hauríem de seguir la tàctica de les cerveses... Gracias Elena por ser como eres. Creo que eres la única persona a la que no he visto enfadarse nunca. Eres una perfecta psicóloga, te tendría que haber utilizado más... Gracias por ese humor que tienes, por tus regalitos (aún me acuerdo de mi enemigo invisible) y por entenderme cuando me cagaba en la RENFE...

Completa el grup de nenes la meua francesa (del nord) preferida. Gracias Sylvie por estar siempre dispuesta a ayudar en lo que fuese, por esos crêpes tan deliciosos, por intentar poner orden en el caos del laboratorio...

A la meua generació RST moltes gràcies per tot el viscut dins el laboratori, perquè amb vosaltres tot ha sigut molt més fàcil. Però sobretot gràcies per tot allò viscut fora del laboratori. Com oblidar el Transporters 2000, la mítica conversa sobre sexe a León, l'accidentat viatge a Madrid i milers de situacions més que em viscut al llarg d'aquests anys.

Sergi, tu vas ser la meua primera *xaperona* i amb tu comença una nova generació RST. Moltes gràcies per portar de nou l'esperit català al laboratori, fins i tot a mi m'has ensenyat paraules que no sabia (tot i que es diu flòr i no flòr). Si algun dia aconsegueixes que el teu recull de pífiles del laboratori es converteixi en un best-seller espero que t'enrecordis de nosaltres. Potser també t'hauria de demanar perdó per tots els projectes que t'he anat passant (CNT2, SIDA.... sense comentar!!). Pedro, con tu llegada me sentí obligada a hablar castellano de verdad y no esa mezcla catalán-castellano que hablaba. En ese momento me di cuenta de todas las catalanadas que hacía... Me ha encantado trabajar con un químico-químico, que ya es todo un bioquímico (aunque no me des la razón...). Muchas gracias por ser mi amigo, por entenderme y aguantarme... y por soportar alguna bronca... Que te voy a decir, sino "La vin compae lo que hay que aguantar". Muchas gracias por todo. Ekaitz, tú completas el trío maravillas. Que puedo decir de este vasco imponente y apretaculs que se pasa todo el día haciéndome cosquillas?? Muchas gracias Ekaitz por hacerme reír como lo haces, sobretodo en estos días que sabes que mi humor no es para tirar cohetes...

Què millor que el seny de la Isabel per compensar el trío maravillas. O potser no tant seny... perquè no ens hem d'oblidar de l'hora Isabel (& Míriam), d'en Carlitos i de les guerres de raspalls de dents. Moltes gràcies Isabel, perquè saps combinar la feina ben feta amb la diversió i per estar sempre disposada a ajudar en el que sigui. Laia, a tu primer de tot crec que t'he de demanar perdó per l'aquaporina 3... Moltes gràcies per la teua simpatia i per la teua tranquil·litat, fins i tot quan intentes que et faci cas... És un plaer treballar amb tu. Amb la Itziar, la Montse i l'Andrea suposo que comença una nova generació i augmenta un altre cop la proporció femenina. Ens hem conegut quan les poques estones que passava en el laboratori anava atabalada, però igualment sempre heu tingut un somriure a punt. Gràcies.

Durant tot aquest temps ha passat molta més gent pel laboratori. Gracias Joao, estés donde estés, por tu ayuda en los inicios. Gràcies Maite pel viatge pel centre d'Espanya. Cristina, tu sempre preparada per a parlar de qualsevol cosa... Gracias a los chilenos Claudio, Willy, Marcelo por los momentos divertidos que hemos pasado. I a tota la demás gent, gràcies pels moments viscuts.

Moltes gràcies a la gent dels altres grups per tenir sempre la porta oberta per a qualsevol cosa, per deixar-me aquells reactius que necessitava, per les estones passades a cultius... Gràcies INS, TAM, MP, TEC, Cancer, NO... la llista de gent és molt llarga... Rubén, gracias a ti las comidas siempre han sido divertidas. Espero que cuando montes un negocio millonario te acuerdes de mí. Que decir de ese malagueño que un día me robó un paquete de cornings de 50... Gracias Jose Carlos por hacerme reír cada vez que me cruzaba contigo. Gràcies Sandra per l'intercanvi d'informació transport-apoptosi. Ens queda un congrés pendent...

Gràcies a la gent de Secretaria, Raquel, Toni, Georgina, Pilar... per atendre sempre les meves demandes sense enviar-me a fer punyetes. Gràcies també als Serveis (citometria, real-time, confocal...), perquè m'heu fet la feina més fàcil.

Si una cosa puc agrair d'aquesta tesi és la quantitat de gent que he pogut conèixer a través de les col·laboracions. La gent del Clínic sempre disposats a donar-me qualsevol cosa, reactius, cèl·lules, ajuda... Moltes gràcies Dolors, Sílvia, Bea, Mònica... sense vosaltres aquesta a tesi no hagués estat possible. Al grup d'en Joan Gil, per atendre'm sempre que he necessitat ajuda. A la gent de can Ruti, gràcies per permetre'm descobrir un món nou, el de la SIDA, i una manera de treballar totalment diferent. Moltes gràcies Javier, Itziar, Gerard... Y finalmente agradecer a la gente de Madrid el haberme acogido tan bien, aunque venía de Barcelona y tenía acento catalán. Con vosotros aguanté la derrota del Barça, las elecciones catalanas y el pacto de Carod-Rovira, aún así los comentarios no dejaron de ser bromas divertidas. Gracias Pepe por permitirme trabajar en tu grupo, gracias a todos y sobretodo a Héctor y a Tati por guiarme en el complicado mundo del CNIO y por vuestra ayuda en los experimentos.

A tota la gent de la carrera, tant de química com de bioquímica, perquè heu fet que l'etapa universitària fos inoblidable. Meri, amb tu he compartit les dues carreres i una gran amistat. Moltes gràcies entendre'm tant bé, perquè les xerrades amb tu sempre són una teràpia i sobretot perquè gràcies a tu estic fent viatges increïbles.... A tu Carol no t'he vingut a visitar mai, ja veurem ara que estàs a l'altre costat de la bassa... Moltes gràcies per ser com ets.

I que puc dir del meu estimat poble, Canet, i de tota la gent que hi tinc allà. Heu aconseguit que m'oblidés de les complicacions del laboratori, tot acompanyat d'una cerveseta, un sopar o una bona sessió de xafarderies. Moltes gràcies Núria per tot, per escoltar els meus rotllos encara que no entenguessis res, per preocupar-te per mi, per ser-hi sempre. I que millor per desconectar que una tarda de compres o una visita a can teranyines. Moltes gràcies M Rosa i Conxi, per donar-me aquests moments.

I deixo pel final l'agraïment més important per a mi, la gent a la que dec ser on sóc i ser com sóc, la meva família. Al mimat de la casa, gràcies Xavier perquè al ser l'únic que podies entendre alguna cosa has hagut de suportar els meus rotllos. Gràcies Carlos per aconseguir que rigui cada vespre quan arribo a casa encara que hagi tingut un dia horrorós. Tot i que et passis el dia empenyant-me, em facis pessigolles, vulguis lluitar amb mi o hagi d'escombrar jo, gràcies per tot Panfi. Als dos gràcies aguantar-me encara que sigui una pesadilla, gràcies per les regates, per la mecànica del cotxe, per ser-hi sempre que us he necessitat... Als meus pares, gràcies per ser com sou, per acceptar totes les meves decisions i per recolzar-me en tot el que he fet sense demanar explicacions. Gràcies a vosaltres sóc ara aquí. Mama, dingú pot negar que ets una fantàstica cuinera, tot i que jo hagi heretat aquesta qualitat..., moltes gràcies pels teus tappers... Als meus avis, moltes gràcies per tot el que m'heu donat, per preocupar-vos per mi, per mimar-me com m'heu mimat. Mai vaig entendre el que feia, però igualment estàveu molt orgullosos de *vuestra nieta preferida*. No heu pogut veure el final de la feina, per això us la dedico a vosaltres. Un petó.



## ***ÍNDEX***

---



<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1. FÀRMACS ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS</b>	<b>3</b>
1.1. Metabolisme dels anàlegs de nucleòsids .....	3
1.1.1. Enzims anabòlics.....	4
1.1.2. Enzim catabòlics.....	4
1.1.3. Ribonucleòtid reductasa.....	5
1.2. Mecanisme d'acció dels anàlegs de nucleòsids.....	5
1.2.1. Fludarabina.....	7
1.2.2. Cladribina.....	8
1.2.3. Citarabina.....	8
1.2.4. Gemcitabina.....	9
1.2.5. 5-fluorouracil.....	9
1.2.6. Altres anàlegs de nucleòsids.....	11
1.3. Tractament amb anàlegs de nucleòsids.....	12
1.4. Mecanismes de resistència als anàlegs de nucleòsids.....	14
1.4.1. Alteracions en el metabolisme.....	14
1.4.2. Inducció de l'apoptosi.....	15
1.4.3. Resistència a multi-drogues.....	17
1.4.4. Transport d'anàlegs.....	18
<b>2. TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS</b>	<b>18</b>
2.1. Transportadors equilibratius.....	19
2.1.1. Propietats cinètiques.....	19
2.1.2. Característiques moleculars.....	20
2.2. Transportadors concentratius.....	23
2.2.1. Propietats cinètiques.....	23
2.2.2. Característiques moleculars.....	24
2.3. Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids.....	28
2.4. Regulació dels transportadors de nucleòsids.....	29
2.4.1. Regulació en cèl.lules del sistema immunitari.....	30
2.4.2. Regulació en altres tipus cel.lulars.....	31
<b>3. PAPER FARMACOLÒGIC DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS</b>	<b>33</b>
3.1. Transport d'anàlegs de nucleòsids.....	33
3.2. Paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs .....	35
3.2.1. Estudis <i>in vitro</i> .....	36
3.2.2. Estudis clínics i anàlisis <i>ex vivo</i> .....	37
<b>4. MALALTIES LIMFOPROLIFERATIVES</b>	<b>40</b>
4.1. Leucèmia limfàtica crònica de cèl.lules B.....	42
4.1.1. Característiques de les cèl.lules de LLC.....	42
4.1.2. Classificació dels estadis de LLC i pronòstic.....	43
4.1.3. Genètica de la LLC.....	43
4.1.4. Tractament de la LLC.....	44
4.2. Limfoma de cèl.lules de mantell.....	46

4.2.1.	Característiques del LCM.....	46
4.2.2.	Genètica del LCM.....	47
4.1.3.	Tractament del LCM.....	47
<b>OBJECTIUS</b>		<b>49</b>
<b>MATERIALS I METODEDES</b>		<b>55</b>
<b>1.</b>	<b>CULTIUS CEL·LULARS</b>	<b>57</b>
1.1.	Introducció.....	57
1.2.	Cultiu de línies cel·lulars.....	58
1.2.1.	Cultiu en monocapa: tripsinització i replaqueig.....	58
1.2.2.	Cultiu en suspensió.....	59
1.2.3.	Congelació i descongelació.....	59
1.3.	Línies cel·lulars utilitzades.....	60
1.3.1.	Línia cel·lular JVM-2.....	60
1.3.2.	Línia cel·lular Granta-519.....	60
1.3.3.	Línia cel·lular Jeko-1.....	61
1.3.4.	Línia cel·lular REC-1.....	61
1.3.5.	Línia cel·lular NCEB-1.....	61
1.3.6.	Línia cel·lular MCF7.....	62
1.3.7.	Altres línies cel·lulars utilitzades.....	62
1.4.	Cultiu primari.....	62
1.4.1.	Aïllament de cèl·lules mononucleades.....	63
1.4.2.	Aïllament de limfòcits T CD4.....	64
<b>2.</b>	<b>TRACTAMENTS EN CULTIUS CEL·LULARS</b>	<b>64</b>
2.1.	Tractament de cèl·lules amb agents quimioterapèutics.....	64
2.1.1.	Agents quimioterapèutics.....	64
2.1.2.	Anàlisi de la citotoxicitat: corbes de dosi-resposta.....	65
2.1.2.1.	Recompte cel·lular.....	65
2.1.2.2.	Reducció de sals de tetrazolium: MTT.....	66
<b>3.</b>	<b>MESURES DE TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS</b>	<b>66</b>
3.1.	Medis de transport, reactius i material.....	67
3.2.	Transport de cèl·lules en monocapa.....	68
3.2.1.	Preparació dels medis de transport.....	68
3.2.2.	Assaig de transport.....	68
3.2.3.	Valoració de proteïnes.....	69
3.2.4.	Càlculs.....	69
3.3.	Transport de cèl·lules en suspensió.....	69
3.3.1.	Preparació dels medis de transport.....	70
3.3.2.	Assaig de transport.....	70
3.3.3.	Valoració de proteïnes.....	71
3.3.4.	Càlculs.....	71



<b>4. TÈCNiques D'ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES</b>	<b>71</b>
4.1. Obtenció de lisats cel.lulars.....	71
4.1.1. Obtenció de lisats crus amb Tris-tritó.....	72
4.1.2. Obtenció d'extractes de membrana de cèl.lules de LLC.....	72
4.1.3. Obtenció de lisats crus amb tampó RIPA.....	73
4.1.4. Extracció d'homogenats crus de membrana.....	73
4.2. Valoració de la concentració de proteïnes.....	73
4.3. Purificació de IgGs.....	74
4.4. Electroforesi en SDS-PAGE.....	74
4.4.1. Preparació de les mostres.....	75
4.4.2. Preparació del gel i electroforesi.....	76
4.5. Assaig d'immunoblot.....	76
4.5.1. Electrotransferència de proteïnes.....	76
4.5.2. Immunodetecció.....	77
4.5.3. Revelat i anàlisi.....	77
4.5.4. Deshibridació de la membrana.....	78
4.6. Immunocitoquímica de cèl.lules en cultiu.....	78
4.7. Anticossos utilitzats.....	79
<b>5. ANÀLISI DE CICLE CEL.LULAR I APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX</b>	<b>80</b>
5.1. Anàlisi del cicle cel.lular.....	80
5.2. Determinació de l'apoptosi: incorporació d'anexina V.....	81
<b>6. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA I TÈCNiques AFINS</b>	<b>82</b>
6.1. Purificació d'ARN.....	82
6.2. Retrotranscripció: Síntesi d'ADNc.....	83
6.2.1. Protocol 1.....	84
6.2.2. Protocol 2.....	84
6.3. PCR: reacció en cadena de la polimerasa.....	85
6.3.1. Factors crítics.....	85
6.3.2. Selecció de <i>primers</i> .....	85
6.3.3. Reacció de PCR estàndard.....	86
6.4. PCR semiquantitativa.....	86
6.4.1. Reacció de PCR.....	87
6.4.2. Electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant.....	88
6.5. PCR a temps real.....	89
6.5.1. Quantificació relativa de l'expressió gènica.....	89
6.5.2. Disseny dels <i>primers</i> i sondes.....	90
6.5.3. Paràmetres universals de PCR a temps real.....	91
6.5.4. Anàlisi dels resultats pel mètode de comparació de $C_T$ .....	91
<b>7. MICROARRAYS D'ADN</b>	<b>92</b>
7.1. Introducció.....	92
7.1.1. Tipus de microarrays.....	92
7.1.2. Disseny experimental.....	93
7.2. Obtenció i amplificació de l'ARN.....	94

7.2.1. Extracció de l'ARN.....	94
7.2.2. Comprovació de la qualitat de l'ARN.....	95
7.2.2.1. Qualitat de l'ARN: valoració espectrofotomètrica d'àcids nucleics.....	95
7.2.2.2. Integritat de l'ARN: electroforesi en gel d'agarosa.....	96
7.2.3. Amplificació de l'ARN.....	97
7.3. Síntesi i marcatge de l'ADNc.....	99
7.3.1. Control de referència.....	99
7.3.2. Fluorocroms.....	100
7.3.3. Preparació de l'ADNc fluorescent a partir d'ARN amplificat.....	100
7.4. Hibridació amb microarrays.....	101
7.4.1. OncoChip™.....	101
7.4.2. Hibridació en l'OncoChip™.....	102
7.5. Anàlisi de les imatges i extracció de les dades.....	103
7.5.1. Escanneig.....	103
7.5.2. Quantificació: GenePix.....	104
7.6. Normalització: DN MAD.....	106
7.7. Processat de les dades.....	107
7.8. Procediments de <i>clustering</i> .....	109
7.9. Interpretació de les dades.....	111
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>113</b>
<b>1. EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN CÈL.LULES DEL SISTEMA IMMUNITARI</b>	<b>115</b>
<b>2. PAPER DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN LA SENSIBILITAT A ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS EN MALALTIES LIMFOPROLIFERATIVES</b>	<b>125</b>
2.1. Leucèmia limfàtica crònica.....	126
2.1. Limfoma de cèl.lules de mantell.....	138
<b>3. ANÀLISI FARMACOGENÒMIC DEL PAPER DEL TRANSPORTADOR hENT1 EN LA SENSIBILITAT A FLUOROPIRIMIDINES</b>	<b>147</b>
<b>4. EFECTE DELS ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS EN L'EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS</b>	<b>165</b>
<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>191</b>
<b>PUBLICACIONS</b>	<b>213</b>