
INTRODUCCIÓ

1. FÀRMACS ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS

Els anàlegs de nucleòsids i de nucleobases són una família farmacològicament diversa que inclou compostos antineoplàsics i agents antivírics. Els derivats de nucleòsids utilitzats en la quimioteràpia formen un important grup d'antimetabòlits administrats en el tractament de malalties hematològiques i de tumors sòlids. Aquests compostos mimetitzen els nucleòsids naturals en termes de captació i metabolisme i són incorporats a l'ADN, produint la inhibició de la seva síntesi i la terminació de la cadena. Alguns d'aquests fàrmacs poden, alhora, inhibir enzims clau del metabolisme de purines i pirimidines, inhibir la síntesi de l'ARN o activar directament la cascada de les caspases, efectes que en darrera instància produiran la mort de la cèl.lula.

1.1. Metabolisme dels anàlegs de nucleòsids

Els anàlegs de nucleòsids s'administren generalment com pro-fàrmacs i la seva eficiència depèn del metabolisme intracel.lular de la molècula, que es realitza mitjançant l'acció dels enzims del metabolisme dels nucleòsids naturals (**Figura 1**). En les cèl.lules de mamífer, l'anabolisme ve mediat pels enzims citosòlics, desoxicitidina quinasa (dCK) i timidina quinasa 1 (TK1) i pels enzims mitocondrials, desoxiguanosina quinasa (dGK) i timidina quinasa 2 (TK2), mentre que els enzims implicats en el catabolisme són les 5'-nucleotidases.

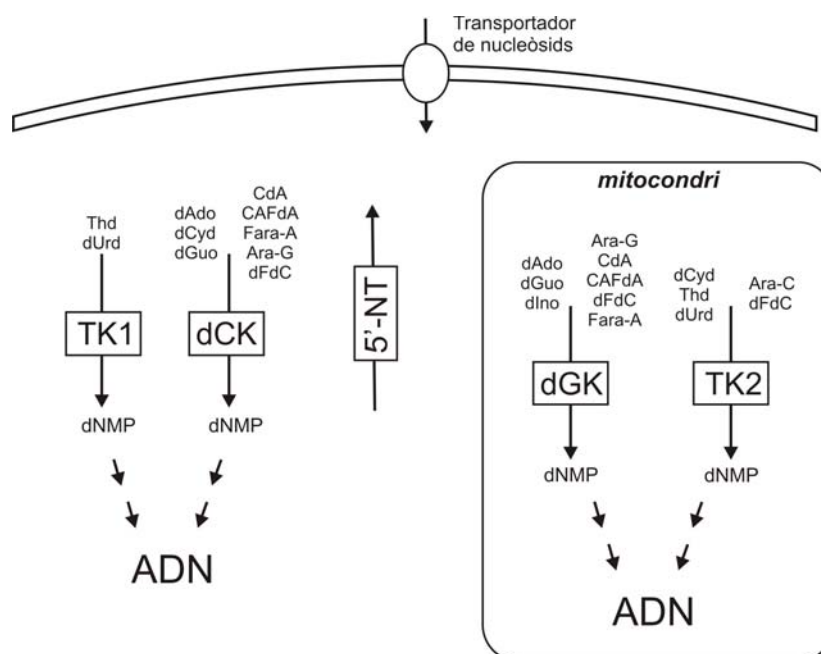


Figura 1. Desoxinucleòsid quinases i nucleotidases i els seus substrats. La timidina quinasa 1 (TK1), la desoxicitidina quinasa (dCK) i la 5'-nucleotidasa intracel.lular (5'-NT) es localitzen en el citosol, mentre que la desoxiguanosina quinasa (dGK) i la timidina quinasa 2 (TK2) es troben al mitocondri.

1.1.1. Enzims anabòlics

La **desoxicitidina quinasa** (dCK) és l'enzim responsable de la fosforilació inicial de molts anàlegs de nucleòsids. S'expressa de manera constitutiva durant el cicle cel·lular i, en general, els seus nivells d'expressió són força baixos, excepte en les cèl·lules limfoides, en les que es troben uns nivells particularment alts (Arner et al., 1988; Spasokoukotskaja et al., 1995). L'especificitat de la dCK és àmplia, fosforila desoxicitidina, desoxiadenosina i desoxiguanosina, tot i que té menor afinitat per les purines (Arner and Erikson, 1995). Els anàlegs de nucleòsids també són fosforilats de manera eficient, com la cladribina ($K_m = 5 \mu\text{M}$), la citarabina ($K_m = 14 \mu\text{M}$), la fludarabina ($K_m = 213 \mu\text{M}$) i la gemcitabina ($22 \mu\text{M}$) (Eriksson et al., 1991; Parker et al., 1999; Sabini et al., 2003; Tseng et al., 1982). Diversos estudis han demostrat que el tractament amb aquests anàlegs pot estimular l'activitat de la dCK, possiblement mitjançant modificacions post-transduccionals de l'enzim (Sasvari-Szekely et al., 1998; Spasokoukotskaja et al., 1998).

Els nucleòsids púrics també poden ser fosforilats per l'enzim mitocondrial **desoxiguanosina quinasa** (dGK). De manera similar a la dCK, fosforila els substrats naturals desoxiguanosina, desoxiadenosina i desoxiinosina i anàlegs com l'ara-G, la cladribina, la fludarabina i la gemcitabina (Sjoberg et al., 1998). L'ara-G presenta, fins i tot, una major afinitat per la dGK ($K_m = 7.6 \mu\text{M}$) i una major eficiència (V_{max}/K_m) que el nucleòsid natural desoxiguanosina (Wang et al., 1993).

Els enzims **timidina quinasa 1 i 2** (TK1 i TK2) s'encarreguen de la fosforilació de desoxinucleòsids a desoxinucleòtids. La TK1 s'expressa en elevats nivells durant la fase S del cicle cel·lular (Sherley and Kelly, 1988) i fosforila els substrats naturals timidina i desoxiuridina. D'altra banda, la TK2 es localitza al mitocondri i té una especificitat més àmplia, fosforilant també, amb certa eficiència, anàlegs com la citarabina i la gemcitabina (Wang et al., 1999).

1.1.2. Enzim catabòlics

Les **5'-nucleotidases** (5'-NT) desfosforilen els desoxinucleòtids per hidròlisi de l'enllaç éster generant el corresponent nucleòsid. Constitueixen una família d'enzims que difereixen en la seva localització subcel·lular i especificitat de substrat. L'ecto-5'-NT o CD73 es localitza a la membrana plasmàtica i degrada els nucleòtids extracel·lulars a nucleòsids, de manera que poden ser transportats a l'interior de la cèl·lula i reutilitzats (Resta et al., 1998). Existeixen dues 5'-NT majoritàries amb localització intracel·lular que es diferencien per la seva afinitat pel substrat, la 5'-NT de baixa K_m i la d'alta K_m (cN-I i cN-II, respectivament). La cN-II és específica de monofosfats púrics i és activada per ATP, mentre que els substrats de la cN-I són els monofosfats pirimidínics i la seva activitat és inhibida per ATP (Spychala et al., 1989). Darrerament, s'han descrit altres 5'-NT amb diferents localitzacions i especificitats, però el seu impacte en la desfosforilació d'anàlegs de nucleòsids no ha estat analitzat (Hunsucker et al., 2001).

1.1.3. Ribonucleòtid reductasa

La ribonucleòtid reductasa (RR) és un enzim essencial per a la formació dels desoxiribonucleòtids (dNTPs) necessaris per a la síntesi de l'ADN i per a mantenir uns nivells equilibrats de dNTPs. La RR de cèl·lules de mamífer es compon de dues subunitats diferents, R1 i R2. La subunitat gran **R1** de 85 kDa conté el centre actiu i els llocs d'unió al substrat, controlant, per tant, l'activitat catalítica i l'especificitat de substrat (Brown and Reichard, 1969). L'activitat de la RR ve regulada pels diferents nivells de la subunitat petita de 45 kDa, **R2**, els quals són modificats en funció del cicle cel·lular. La subunitat R2 conté un radical lliure d'un àtom de ferro en el seu centre actiu que és essencial per a la seva activitat.

La RR redueix ADP, GDP, CDP i UDP als seus corresponents desoxinucleòtids, que són posteriorment fosforilats per la quinasa de nucleòtids difosfat (NDPK), incorporant-se aleshores a l'ADN. L'únic nucleòtid que no és reduït per la RR és el TDP. Per a la seva síntesi el dUTP és desfosforilat per la dUTPasa a la seva forma monofosfat i seguidament la timidilat sintasa converteix el dUMP a dTMP, que és posteriorment fosforilat per la timidilat quinasa i la NDPK (Reichard, 1988).

L'activitat de la RR està controlada per un lloc d'unió d'ATP i de dATP. La unió d'ATP al lloc efector indueix l'activitat de la RR, mentre que la unió de dATP la disminueix. D'altra banda, els dNTPs i NTPs també poden regular la seva especificitat. Així, l'ATP indueix la formació de dCDP i dUDP, el TTP indueix la formació de dGDP i el dGTP la de dADP. L'únic dNTP que no afecta l'especificitat de la RR és el dCTP, si bé actua al·lostèricament sobre la dCK (Reichard, 1988; Jordan and Reichard, 1998).

Recentment s'ha descobert un nou gen que codifica per a una nova subunitat de la RR, **p53R2**, que està directament regulada per p53 (Tanaka et al., 2000; Xue et al., 2003). El gen p53R2 té un elevat grau de similitud amb la subunitat R2 i pot formar complexos actius amb la subunitat R1. De fet, la subunitat R2 és degradada de manera específica al final de la mitosi i és pràcticament absent en la fase G₀/G₁. La inducció de la subunitat p53R2 en resposta a dany a l'ADN explicaria com les cèl·lules quiescents poden obtenir dNTPs per a la reparació de l'ADN (Guittet et al., 2001). Aquesta hipòtesi va ser confirmada amb la generació de ratolins *knock-out*, els quals presentaven retards en el desenvolupament i una elevada mortalitat. Les anàlisis patològiques van demostrar que els nivells de dNTPs es trobaven disminuïts, deficiència que provocava una elevada taxa de mutació (Kimura et al., 2003).

1.2. Mecanisme d'acció dels anàlegs de nucleòsids

Existeixen diferents tipus d'anàlegs de nucleòsids que poden classificar-se en base al tipus de modificacions que presenten sobre el nucleòsid natural o bé en funció del tipus de base modificada (purina o pirimidina). Tots els anàlegs de nucleòsids presenten unes característiques comuns; el transport mitjançant transportadors específics, l'activació per quinases com la dCK permetent la retenció de la forma monofosforilada en l'interior cel·lular, la formació de metabolits trifosfat actius i la desfosforilació mitjançant les 5'-NT

(Figura 2). Addicionalment, cada anàleg posseeix unes propietats específiques que poden explicar les diferències d'activitat mostrades en les diverses malalties. Així, per exemple, els efectes citotòxics dels anàlegs de purina, fludarabina i cladribina, en cèl·lules quiescents són deguts a la seva actuació sobre la reparació de l'ADN, més que sobre la replicació.

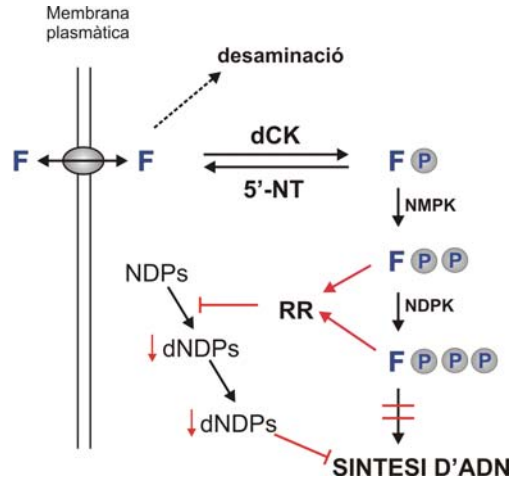


Figura 2. Representació esquemàtica del metabolisme i mecanisme d'acció dels anàlegs de nucleòsids. Els fàrmacs derivats de nucleòsids (F), són transformats mitjançant diferents enzims a la seves formes trifosfat que poden incorporar-se a l'ADN o inhibir la ribonucleòtid reductasa, modificant els nivells de dNTPs (Adaptada de Galmarini et al., 2001).

Els principals anàlegs de nucleòsids púrics són la cladribina (2-CdA, 2-clorodesoxiadenosina) i la fludarabina (F-ara-A, 9-β-D-arabinosil-2-fluoroadenina), ambdues utilitzades majoritàriament en el tractament de leucèmies i limfomes. Mentre que les principals pirimidines són la citarabina (ara-C, 1-β-D-arabinosilfuranosilcitosina), la gemcitabina (dFdC, 2',2'-difluorodesoxicitidina), la 5'-DFUR (5'-desoxi-5-fluorouridina), derivat del fàrmac capecitabina, i la nucleobase 5-fluorouracil (5-FU) (Figura 3).

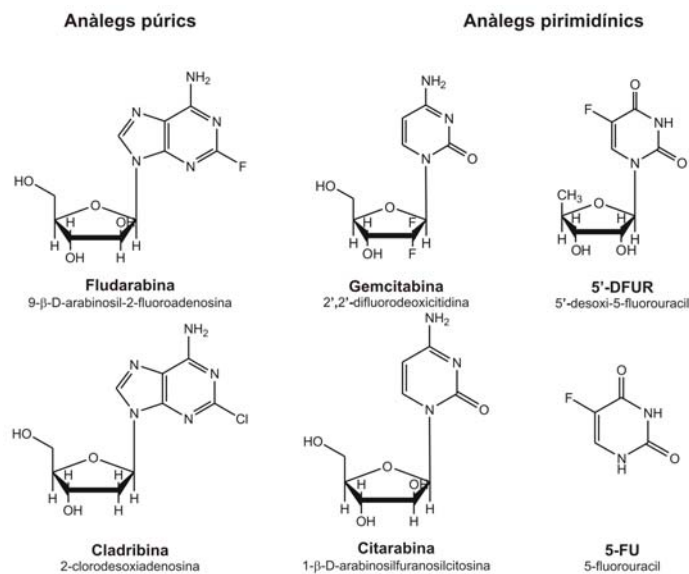


Figura 3. Principals anàlegs de nucleòsids utilitzats en quimioteràpia

1.2.1. Fludarabina

La fludarabina (F-ara-A, 9- β -D-arabinosil-2-fluoroadenina) és un anàleg d'adenosina resistent a la desaminació per l'adenosina desaminasa (ADA) (Brockman et al., 1977). Degut a la seva baixa solubilitat s'administra en forma 5'-monofosfat, si bé és ràpidament desfosforilada per la 5'-NT de membrana (CD73) a F-ara-A que seguidament és introduïda a la cèl.lula a través dels transportadors de nucleòsids. Un cop a l'interior cel.lular és fosforilada per la dCK a F-ara-AMP i fosforilada posteriorment fins la forma activa F-ara-ATP (Plunkett and Saunders, 1991).

La fludarabina és citotòxica tant en cèl.lules quiescents com en divisió. En cèl.lules en divisió els seus principals efectes són la inhibició de la síntesi de l'ADN i de la RR. La F-ara-ATP, degut a la seva similitud amb la dATP, és capaç d'inhibir al·lostèricament la RR reduint els nivells de dNTPs, el que té dos efectes potenciadors en l'acció de la fludarabina. Per una banda, la disminució del dCTP activa la dCK, que és l'encarregada de fosforilar F-ara-A a F-ara-AMP i d'altra banda, hi ha una competència entre F-ara-ATP i dATP per la incorporació a l'ADN. La disminució de dATP, conseqüència directe de la inhibició de la RR, produeix una major incorporació de F-ara-ATP a l'ADN i en darrer terme una terminació de l'elongació (Huang et al., 1990). Addicionalment, l'efecte de la fludarabina sobre la replicació de l'ADN es veu augmentat per la seva capacitat d'inhibir directa o indirectament altres enzims implicats en la síntesi de l'ADN, com l'ADN polimerasa α , l'ADN primasa, l'ADN lligasa i la topoisomerasa II (Tseng et al., 1982). Així doncs, l'acció de la fludarabina en cèl.lules proliferatives és dependent del cicle cel.lular, ja que és necessària la incorporació de la F-ara-ATP a l'ADN durant la fase S perquè es produeixi l'apoptosi.

En cèl.lules no replicatives la inhibició de la reparació de l'ADN sembla ser el principal mecanisme citotòxic de la fludarabina. La incorporació dels metabolits actius de la fludarabina a la maquinària de reparació de l'ADN genera danys irreversibles en l'ADN que acaben produint l'apoptosis mediada per p53 (Stoetzer et al., 1999). Alhora, l'augment de ruptures en l'ADN, degut a l'acció de la fludarabina, provoca una activació de PARP (poly(ADP-ribose) polimerasa) que s'uneix de manera covalent a l'ADP-ribose d'algunes proteïnes, utilitzant NAD^+ com a substrat. Aquest augment d'activitat produeix, per tant, una depleció de NAD^+ i com a conseqüència una baixada dels nivells d'ATP que condueixen en darrer terme a la mort cel.lular (Pettitt et al., 2000).

Addicionalment, la fludarabina també pot exercir la seva acció citotòxica en cèl.lules no replicatives en incorporar-se la F-ara-AMP i la F-ara-ATP a l'ARN, produint la terminació prematura de la transcripció i, en conseqüència, la depleció de proteïnes clau per a la supervivència cel.lular (Huang et al., 2000). D'altra banda, la fludarabina té altres efectes menys estudiats, com l'activació d'APAF-1 i la posterior activació de les caspases 3 i 9, la disminució de Bcl-2 i efectes sobre el mitocondri. Tot i això, aquests mecanismes s'han descrit com tardans i podrien estar relacionats amb l'activació de p53 més que amb l'acció directa de la fludarabina (Galmarini et al., 2001b).

1.2.2. Cladribina

La cladribina (2-CdA, 2-clorodesoxiadenosina) és un anàleg de la desoxiadenosina resistent a la desaminació per l'ADA. El seu metabolisme és similar al de la fludarabina, amb la diferència que la cladribina també pot ser fosforilada per la dGK mitocondrial (Wang et al., 1993).

Anàlogament a la fludarabina, és efectiva en cèl·lules proliferatives i no proliferatives. En cèl·lules en divisió, a part de la inhibició de la replicació de l'ADN i de la RR, té un mecanisme específic que consisteix en la inhibició de l'ADA i la S-adenosilhomocisteïna hidrolasa (SAHH). La inhibició d'ADA comporta un increment en els nivells d'adenosina i desoxiadenosina, provocant la inactivació de la SAHH i, en conseqüència, reduint la formació d'homocisteïna. Això produeix reaccions de metilació alterades, que indirectament inhibeixen la síntesi de nucleòtids i la proliferació cel·lular (Fabianowska-Majewska and Wyczechowska, 1996).

L'efecte de la cladribina sobre cèl·lules no replicatives és degut a la inhibició de la reparació de l'ADN i de la síntesi de l'ARN, de manera equivalent als efectes descrits per a la fludarabina (Galmarini et al., 2001b). No obstant, la cladribina presenta mecanismes alternatius d'inducció de l'apoptosi en cèl·lules no replicatives mitjançant alteracions en la funció o integritat mitocondrials. El dany mitocondrial promou la sortida del citocrom c i la posterior activació de la cascada apoptòtica. Paral·lelament, la cladribina interfereix de manera directa o indirecta en la transcripció mitocondrial, el que eventualment redueix els nivells de les proteïnes mitocondrials necessàries per al transport d'electrons i la fosforilació oxidativa. La diferent acció a nivell mitocondrial entre la fludarabina i la cladribina pot ser explicada pel fet que la cladribina és més eficientment activada en el mitocondri per l'acció de la dGK i perquè els derivats clorats són més hidrofòbics que els corresponents fluorats, el que els fa més permeables a la membrana mitocondrial (Genini et al., 2000a).

1.2.3. Citarabina

La citarabina (ara-C, 1- β -D-arabinosilfuranosilcitosina) és un anàleg estructural de la desoxicitidina utilitzat en el tractament de leucèmies agudes i limfomes. Un cop dins la cèl·lula és fosforilada per la dCK i les pirimidina quinases a la forma trifosfat activa, ara-CTP. El catabolisme de la citarabina és produït per una ràpida desaminació mitjançant la citidina desaminasa (CDD) que genera el metabolit no tòxic arabinòsid d'uridina. D'altra banda, l'ara-CMP també pot ser defosforilat per la 5'-NT (Plunkett et al., 1987).

L'acció citotòxica de la citarabina resulta d'una combinació de la inhibició de les subunitats α , β i γ de l'ADN polimerasa i de la incorporació de l'ara-CTP a l'ADN en competència amb el dCTP. Aquesta incorporació provoca una terminació de la cadena d'ADN, amb el bloqueig de la síntesi d'ADN corresponent (Iwasaki et al., 1997; Wright et al., 2002).

1.2.4. Gemcitabina

La gemcitabina (dFdC, 2',2'-difluorodesoxicitidina) és un anàleg de la desoxicitidina amb dos àtoms de fluor en la posició 2' de l'anell de la ribosa que, contràriament a la citarabina, té una elevada activitat en tumors sòlids. Després de la fosforilació inicial per la dCK, la gemcitabina és fosforilada per les pirimidina quinases als metabolits actius, dFd-CDP i dFd-CTP (Heinemann et al., 1988). Anàlogament a la citarabina la seva inactivació ve donada per la desaminació mitjançant la CDD i la desfosforilació per les 5'-NT.

La gemcitabina actua a diferents nivells. D'una banda, el dFd-CTP s'incorpora a l'ADN durant la seva replicació i seguidament s'afegeix un nucleòtid natural addicional, evitant-se d'aquesta manera la reparació de l'ADN per escissió d'un parell de bases. Aquest procés és conegut com la terminació emmascarada de la cadena (*mask DNA chain termination*) (Gandhi et al., 1995). D'altra banda, la gemcitabina inhibeix la síntesi de l'ADN indirectament mitjançant la inhibició de la RR, bloquejant d'aquesta manera la via de síntesi *de novo* de dNTPs. La depleció del nivell intracel·lular de dCTP resultant potencia alhora l'acció de la gemcitabina en augmentar la seva incorporació a l'ADN i l'activitat de la dCK, ja que aquesta està regulada pels nivells de dCTP (Heinemann et al., 1995). Els nivells de dCTP no són els únics afectats, sinó que també es veuen deplecionats els de dATP i dGTP, fins i tot en un major grau (Smid et al., 2001). Finalment, la gemcitabina és capaç d'incorporar-se a l'ARN (Ruiz van Haperen et al., 1993).

La major eficàcia de la gemcitabina en tumors sòlids pot ser deguda a diferents motius. Comparat amb la citarabina, la gemcitabina és millor substrat dels transportadors de nucleòsids, és fosforilat més eficientment i és eliminat de manera més lenta, afavorint un major temps de retenció del metabolit actiu en les cèl·lules tumorals, el que explicaria el seu efecte en cèl·lules tumorals amb un temps de duplicació lent. Aquestes diferències, conjuntament amb efectes no observats en la citarabina com la terminació emmascarada de l'ADN, la incorporació a l'ARN i la inhibició de la RR, poden explicar perquè la gemcitabina és activa en els tumors sòlids, i la citarabina no (Galmarini et al., 2001b).

1.2.5. 5-fluorouracil

El 5-fluorouracil (5-FU) és un anàleg d'uracil amb un àtom de fluor en la posició C5 que té activitat antitumoral en pacients amb càncer colo-rectal, de mama o de cap i coll. El 5-FU entra ràpidament a la cèl·lula per un mecanisme encara no descrit, si bé es postula que podria ser difusió passiva (Wohlhueter et al., 1980). Un cop a l'interior cel·lular és convertit als seus metabolits actius: 5-fluorodesoxiuridina monofosfat (5-FdUMP), 5-fluorodesoxiuridina trifosfat (5-FdUTP) i 5-fluorouridina trifosfat (5-FUTP) (**Figura 4**). La reacció limitant en l'efecte del 5-FU és el seu catabolisme mitjançant la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que converteix el 5-FU en el metabolit inactiu dihidrofluorouracil (DHPU). De fet, més del 80% del 5-FU que s'administra és catabolitzat en el fetge, on la DPD s'expressa de manera abundant (Diasio and Harris, 1989).

El mecanisme d'acció del 5-fluorouracil difereix del dels anàlegs de nucleòsids descrits fins ara. Els seus dos efectes principals són la inhibició de l'enzim timidilat sintasa (TS) i la incorporació a l'ARN (**Figura 4**).

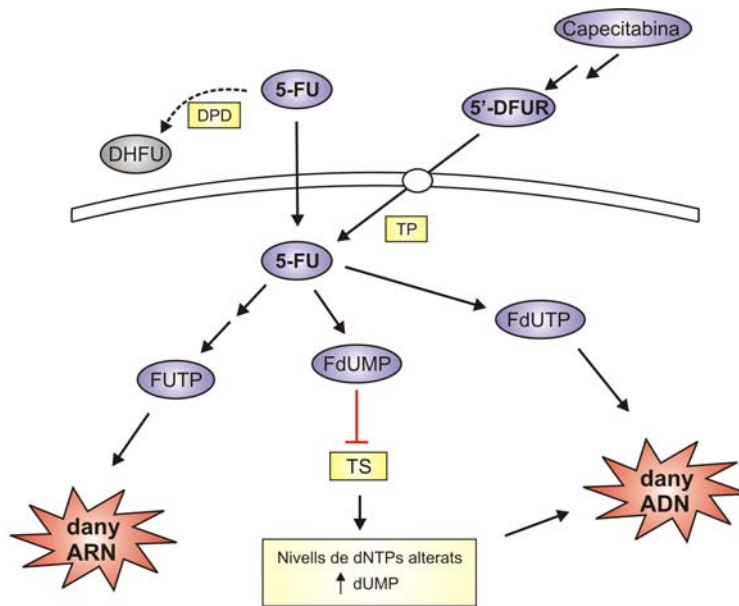


Figura 4. Mecanismes d'acció del 5-FU. El 5-FU pot actuar sobre l'ARN mitjançant la incorporació del FUTP a l'ARN o provocar danys en l'ADN en inhibir la timidilat sintasa (TS) o per la incorporació directa de FdUTP a la cadena d'ADN.

La TS catalitza el pas de dUMP a dTMP en presència del cofactor metileno-tetrahidrofolat, el que suposa l'únic procés de síntesi *de novo* de dTMP de la cèl.lula. El metabolit del 5-FU, 5-FdUMP, s'uneix al lloc d'unió del nucleòtid de la TS formant un complex ternari estable amb l'enzim i el cofactor, que bloqueja el lloc d'unió del substrat natural, el dUMP (Santi et al., 1974). La conseqüent depleció de TMP, provoca alhora una depleció de dTTP i perturbacions en els nivells dels altres dNTPs, canvis que desemboquen en problemes en la síntesi i la reparació de l'ADN i que poden arribar a ser letals. Addicionalment, la inhibició de la TS resulta en una acumulació de dUMP i, per tant, en un augment de dUTP. Tant el dUTP com el metabolit del 5-FU, 5-FdUTP, poden incorporar-se a l'ADN augmentant, d'aquesta manera, el dany en l'ADN. No obstant, els efectes d'inhibició de la TS per 5-FU poden ser revertits a través de la timidina quinasa mitjançant l'addició de timidina. Aquesta via de salvament representa un dels mecanismes potencials de resistència al 5-FU (Grem and Fischer, 1989).

El 5-FUTP es pot incorporar en major grau a l'ARN del que ho fa el 5-FdUTP a l'ADN. La incorporació a l'ARN no només inhibeix el pre-processament del pre-ARNr a ARNr madur, sinó que també altera les modificacions post-transcripcionals de l'ARNt i l'ensamblatge i activitat dels complexos ARNsn/proteïna i per tant el *splicing* del pre-RNAM (Longley et al., 2003). Aquestes efectes sobre l'ARN acaben provocant alteracions en el metabolisme cel.lular que en darrer terme produeixen la mort de la cèl.lula.

Amb l'objectiu d'aconseguir augmentar els nivells de 5-FU en els tumors i, en conseqüència, incrementar la seva eficàcia i reduir la seva toxicitat s'han sintetitzat noves fluoropirimidines. L'agent més actiu és la **capecitabina**, fluoropirimidina oral que és convertida selectivament en 5-FU en els tumors mitjançant una cascada de tres enzims. La capecitabina és absorbida per la paret gastrointestinal i convertida a 5'-desoxi-5-fluorocitidina mitjançant la carboxil esterasa que es troba pràcticament de manera exclusiva en el fetge i en hepatomes, però no en altres tumors ni en teixits adjacents a tumors. A continuació, la citidina desaminasa, que es localitza en elevades concentracions en el fetge i en diversos tipus de tumors sòlids, converteix la 5'-desoxi-5-fluorocitidina en 5'-desoxi-5-fluorouridina (**5'-DFUR**). La 5'-DFUR és introduïda en les cèl.lules a través dels transportadors de nucleòsids i és convertida a 5-FU mitjançant la timidina fosforilasa (TP), enzim molt més abundant en teixits tumorals que en normals. Per tant, el metabolisme de la capecitabina permet, a diferència del 5-FU, una activació selectiva en el tumor (Johnston and Kaye, 2001).

1.2.6. Altres anàlegs de nucleòsids

L'eficiència dels anàlegs de nucleòsids en tumors sòlids i malalties limfoproliferatives ha portat a la síntesi de nous anàlegs, alguns dels quals es troben en fases clíniques.

A part dels anàlegs púrics descrits, n'existeixen d'altres amb efectes citotòxics sobre leucèmies i limfomes, com per exemple l'**ara-G**, 9- β -D-arabinofuranosilguanina. L'ara-G va ser sintetitzat l'any 1964, però degut a la seva baixa solubilitat en aigua no va arribar a passar cap assaig clínic. L'any 1983, Cohen i col.laboradors van descriure que l'ara-G era resistent a la ruptura per la purina nucleòsid fosforilasa (PNP) i que era tòxic en limfòcits T (Cohen et al., 1983). Aquestes dades van fer que s'intentessin sintetitzar fàrmacs més solubles, un d'ells és la **nelarabina** (2-amino-6-metoxiarabinosilguanina) que és convertida en ara-G per l'adenosina desaminasa sèrica. L'ara-G és activa contra diverses neoplàsies hematològiques i el seu mecanisme d'acció és altament dependent del dany mitocondrial, ja que és molt millor substrat de la dGK que de la dCK. Malauradament, és altament neurotòxic i el seu futur en clínica és incert (Gandhi et al., 1998).

La **clofarabina** (2-cloro-2'-fluoro-desoxi-9- β -arabinofuranosiladenina) és una modificació de la fludarabina que incrementa la seva solubilitat. Addicionalment, aquesta variant també pot ser fosforilada per la dGK, el que millora la seva acció sobre les dianes mitocondrials (Sjoberg et al., 1998).

La **troxacitabina** ((-)-2'-desoxi-3'-oxacitabina) és un nou anàleg de la desoxicitidina amb una configuració no natural β -L que ha demostrat tenir eficàcia antitumoral en models pre-clínic de leucèmies i algunes neoplàsies epitelials (Alvarado et al., 2002). A diferència d'altres anàlegs de nucleòsids és pobrament transportat pels transportadors de nucleòsids i entra a la cèl.lula preferentment per difusió passiva (Gourdeau et al., 2001). És fosforilat per la dCK amb una K_m similar a la del nucleòsid natural desoxicitidina i, a diferència de la gemcitabina i la citarabina, no és desaminat per la CDD. La forma trifosfat s'incorpora a l'ADN i causa una ràpida terminació del creixement de la cadena. Tanmateix, no és capaç

d'inhibir la RR ni exerceix cap efecte citotòxic sobre la síntesi de l'ADN mitocondrial (Galmarini et al., 2001b).

1.3. Tractament amb anàlegs de nucleòsids

Tal com s'ha comentat prèviament, existeixen una gran varietat d'anàlegs de nucleòsids utilitzats en el tractament del càncer que, degut a les seves propietats específiques, mostren activitat en diversos tipus de tumors. Així, els anàlegs de pirimidina, fludarabina i cladribina, s'utilitzen majoritàriament en el tractament de malalties limfoproliferatives. La citarabina és la principal teràpia en el tractament de leucèmies agudes, mentre que un altre anàleg de pirimidina, la gemcitabina, té activitat en diversos tumors sòlids i en algunes malalties limfoproliferatives. Finalment, les fluoropirimidines com el 5-fluorouracil i la capecitabina han demostrat ser actives en càncers colorectals i de mama. En la **taula 1** es mostren les principals aplicacions dels anàlegs de nucleòsids més utilitzats en clínica, així com les dosis més habituals.

Fàrmac	Principals aplicacions	Dosis
Anàlegs de purina		
Fludarabina	Leucèmia limfàtica crònica	25 mg/m ² intravenós 30 minuts durant 5 dies; repetir cada 28 dies
Cladribina	Leucèmia de cèl.lules peludes, limfoma no-Hodgkin	4 mg/m ² diaris per infusió intravenosa durant 5 dies
Anàlegs de pirimidina		
Citarabina	Leucèmies agudes limfoblàstica i mielogènica	Dosi convencional: 100-200 mg/m ² intravenós 7 dies. Dosi alta: 12 dosis de 3 g/m ² intravenós durant 1-3 h cada 12h
Gemcitabina	Càncers de pàncrees, pulmó, mama i bufeta	1 g/m ² intravenós durant 30 minuts. 1 cop a la setmana, 3 setmanes consecutives cada 4 setmanes
5-fluorouracil	Càncers de pàncrees, gastrointestinal, cap i coll, renal, pell, pròstata i mama	Bolus intravenós 450/600 mg/m ² cada setmana o 5 dies durant 4 setmanes. O infusió continua de 200-400 mg/m ² diària
Capecitabina	Càncers de mama i colorectal	2-5 g/m ² oral diària; 2 setmanes de teràpia i una de repòs

Taula 1. Anàlegs de nucleòsids utilitzats en quimioteràpia. Modificada de Galmarini et al., 2002a

L'eficàcia del tractament amb fludarabina o cladribina s'ha estudiat àmpliament en pacients amb una gran varietat de malalties limfoproliferatives, tot i que la principal aplicació de la fludarabina està en el tractament de la leucèmia limfàtica crònica, mentre que la cladribina s'utilitza en la teràpia de la leucèmia de cèl.lules peludes (Beutler, 1992). No obstant, aquests fàrmacs mostren també activitat contra altres desordres malignes de cèl.lules limfoides, com els limfomes no-Hodgkin de baix grau, la macroglobulinèmia

Waldeström i els limfomes cutanis de cèl.lules T. En canvi, no presenten activitat en múltiples mielomes ni en tumors sòlids.

Similarment, la citarabina s'utilitza en el tractament de malalties hematològiques malignes, però no té activitat en tumors sòlids. Aquest fàrmac és un dels principals agents en el tractament de la leucèmia mieloide aguda. Dosis convencionals de 100-200 mg/m² administrades per via intravenosa cada dia durant 1-7 dies produeixen una remissió completa en un 30% dels casos. D'altra banda, quan la citarabina s'administra en combinació amb una antraciclina la remissió completa pot arribar fins a un 65-75% dels casos en pacients no tractats i a un 30-50% en pacients amb recaiguda (Galmarini et al., 2002a).

Tal com s'ha comentat anteriorment, la gemcitabina presenta major activitat que la citarabina gràcies a diferents factors que permeten una acumulació més eficient i una retenció major de la forma trifosforilada de la gemcitabina en cèl.lules tumorals. Aquestes característiques fan que la gemcitabina, a diferència de la citarabina, sigui activa en tumors sòlids. De fet, la gemcitabina mostra activitat en el tractament del tumors de pàncreas, mama, pulmó i ovari. Addicionalment, també presenta eficàcia en el tractament d'algunes malalties limfoproliferatives (Plunkett et al., 1995; Nabhan et al., 2001).

La nucleobase 5-fluorouracil presenta activitat en tumors sòlids, principalment en càncers colorectals, pancreàtic, de mama i de cap i coll. De fet, és el principal tractament per a les malalties malignes més comuns. S'utilitza des de fa més de 40 anys en el tractament de càncer colorectal, tot i que com a teràpia única la resposta completa és únicament de 10-15% (Longley et al., 2003). Això ha fet que durant els darrers anys s'hagi avançat força en l'estudi de teràpies combinades per millorar el seu efecte a través de la modulació bioquímica del seu mecanisme d'acció. Un altre tipus de millores que s'han realitzat ha estat la generació de nucleòsids fluoropirimidínics orals, com la capecitabina, que permeten assolir majors concentracions de fàrmacs en els tumors que en els teixits normals, el que fa que siguin més efectius i menys tòxics. En assajos clínics en fase II/III s'ha establert l'eficàcia i tolerabilitat de la capecitabina en pacients amb càncers metastàtics de mama i colorectals. A més, altres estudis han investigat la seva efectivitat, tant com a agent únic com en combinació, en un ampli tipus de tumors, com els de pàncreas, tracte gastrointestinal, ovaris, cèrvix i cap i coll (Johnston and Kaye, 2001).

Malgrat l'activitat demostrada dels anàlegs de nucleòsids en el tractament de diferents tipus de tumors, les seves eficàcies no són completes. L'avenç en la comprensió del metabolisme i dels mecanismes d'acció d'aquests compostos ha permès dissenyar estratègies que permeten millorar la seva eficàcia antitumoral, algunes de les quals tenen ja aplicacions clíniques. Una aproximació es basa en la utilització de compostos insensibles a l'efecte dels enzims anabòlics, com la fludarabina o la troxacitabina que són resistents a l'acció de l'ADA i la CDD, respectivament. D'altra banda, diferents combinacions d'anàlegs de nucleòsids o d'altres fàrmacs poden potenciar el seu metabolisme. Així, per exemple, la incorporació de citarabina a l'ADN es pot augmentar amb l'administració prèvia de fludarabina, ja que aquesta activa la dCK, enzim responsable de la fosforilació de la citarabina (Avramis et al., 1998). Finalment, l'administració

d'inhibidors de la reparació de l'ADN o d'agents que produeixin dany en l'ADN poden incrementar l'acció dels anàlegs de nucleòsids. De fet, l'efectivitat de la combinació de gemcitabina i cis-platí ja ha estat demostrada en càncer de pulmó i de bufeta (Mosconi et al., 1997).

Donat el creixent nombre d'anàlegs de nucleòsids utilitzats en la teràpia del càncer, de la gran varietat de dianes moleculars i de la multitud de mecanismes de resistència, els anàlegs de nucleòsids són tant el grup més prometedor d'agents antitumorals com el més complex. Durant la dècada passada, s'ha avançat enormement en l'estudi d'aquests compostos incloent-hi la seva captació, farmacocinètica, metabolisme, interacció amb dianes cel·lulars i efectes apoptòtics. Actualment, però, els esforços van dirigits cap a la identificació dels mecanismes claus de la seva resistència.

1.4. Mecanismes de resistència als anàlegs de nucleòsids

El tractament amb anàlegs de nucleòsids pot induir o seleccionar cèl·lules resistents a la quimioteràpia. La resistència a fàrmacs inclou un procés de selecció cel·lular, amb poblacions de cèl·lules resistents que sobreviuen i s'expandeixen durant repetits cicles. Les cèl·lules poden ser resistents inicialment o adquirir la resistència després de diversos cicles de tractament quimioterapèutic. A nivell molecular, hi ha diferents mecanismes mitjançant els quals es pot adquirir la resistència. Aquesta pot ser deguda a una concentració de fàrmac actiu insuficient en les cèl·lules, producte d'un transport deficient o bé del metabolisme del fàrmac. La resistència també pot sorgir per la incapacitat d'alterar de manera eficient les cadenes d'ADN o els nivells de dNTPs, possiblement com a conseqüència d'una afinitat alterada per les dianes dels metabolits actius. L'apoptosi és el destí final de les cèl·lules en les que la quimioteràpia ha tingut èxit. Defectes en la inducció de la maquinària apoptòtica inevitablement conduiran a una resistència degut a la incapacitat de causar la mort cel·lular.

1.4.1. Alteracions en el metabolisme

La **desoxicitidina quinasa** (dCK) és essencial per l'activació de molts anàlegs de nucleòsids. De fet, la resistència adquirida a aquestes substàncies ha estat atribuïda en molts casos a la deficiència d'aquest enzim. Verhoef i col·laboradors (1981) van mostrar que mutants deficients en dCK i en l'enzim adenosina quinasa presentaven resistència al tractament *in vitro* amb fludarabina en cèl·lules limfoides. Resultats similars es van obtenir en una línia cel·lular de leucèmia promielocítica humana resistent a citarabina (Bhalla et al., 1984). De fet, existeixen múltiples estudis en cèl·lules limfoides que correlacionen la deficiència en dCK amb la resistència a fàrmacs com la fludarabina (Bai et al., 1998), la citarabina (Stegmann et al., 1993), la cladribina (Orr et al., 1995), l'ara-G (Shewach and Mitchell, 1986; Curbo et al., 2001) i fins i tot amb anàlegs nous com la troxacitabina (Gourdeau et al., 2001). Addicionalment, la reintroducció mitjançant adenovirus de l'activitat dCK restitueix la sensibilitat a la citarabina i a la cladribina (Hapke et al., 1996). D'altra banda, també s'han descrit correlacions entre pacients refractaris i una deficiència o baixos nivells de dCK en malalts de leucèmies agudes i cròniques (Kawasaki et al., 1993;

Arner et al., 1994). Tanmateix, en altres estudis la correlació entre l'èxit del tractament i els nivells de dCK no ha estat significativa (Albertioni et al., 1998; Veuger et al., 2002). Resultats similars s'obtenen en el cas de tumors sòlids, on també hi ha estudis en els que es mostra una correlació entre la deficiència de dCK i la resistència a la gemcitabina (Ruiz van Haperen et al., 1994; Kroep et al., 1998) i d'altres en els que no es troba correlació (Seve et al., 2005). Tot i això, la deficiència de dCK és la forma de resistència més descrita en la literatura.

Les **5'-nucleotidases** (5'-NT) s'oposen a l'acció de les quinases al catabolitzar la reacció de producció de nucleòsid a partir de nucleòtids. Per tant, a diferència de les quinases, un excés d'activitat pot conferir resistència als anàlegs de nucleòsids, correlació que s'ha descrit en diversos treballs, tant en línies cel·lulars com en pacients. En la leucèmia limfàtica crònica i la leucèmia de cèl·lules peludes, Kawasaki i col·laboradors van demostrar que els nivells de 5'-NT abans del tractament eren un factor predictiu de la resposta a cladribina (Kawasaki et al., 1993). Resultats similars s'han descrit en leucèmia mieloblàstica aguda en resposta a citarabina (Galmarini et al., 2001a) i en tumors sòlids tractats amb gemcitabina (Seve et al., 2005). D'altra banda, Galmarini i col·laboradors han descrit en pacients de leucèmia mielocítica aguda que és la relació 5'-NT/dCK la que pot ser predictiva de la resposta a citarabina (Galmarini et al., 2003).

Un dels efectes principals de molts anàlegs de nucleòsids és la inhibició de la **ribonucleòtid reductasa** (RR), de manera que una manca d'efecte inhibitori o una activitat augmentada de l'enzim poden produir resistència (Goan et al., 1999). De fet, existeixen mutacions en el centre alostèric de l'enzim que provoquen una resistència al control negatiu exercit pel dATP (Caras and Martin, 1988). En aquest context, una major activitat de la RR produeix un augment dels nivells de dNTPs que competeixen amb els anàlegs en la incorporació a l'ADN. Addicionalment, l'augment de dCTP inhibeix la dCK, contribuint d'aquesta manera a augmentar la resistència (Ohno et al., 1988).

Existeixen també estudis que correlacionen altres enzims del metabolisme de nucleòsids amb la sensibilitat a anàlegs, com la timidina quinasa 2 (Nielsen et al., 1995), la desoxiguanosina quinasa (Loffi et al., 2002), la desoxicidina desaminasa (Eda et al., 1998; Neff and Blau, 1996) o la timidina sintasa, en el cas del 5-fluorouracil (Johnston et al., 1995). Tot i això, hi ha poques correlacions *in vivo* i força controvèrsia en els resultats.

1.4.2. Inducció de l'apoptosi

L'objectiu final del tractament amb anàlegs de nucleòsids és que els danys cel·lulars que produeixen acabin conduint la cèl·lula a l'apoptosi. S'han descrit dues vies principals d'apoptosi, una via intrínseca o mitocondrial i una via extrínseca o dels receptors de la mort (**Figura 5**). En aquest apartat es pretén únicament donar una visió general d'aquestes dues vies, per ampliar aquest apartat referir-se a les revisions (Hengartner, 2000; Ahskenazi et al., 2002 ; Cory and Adams, 2002).

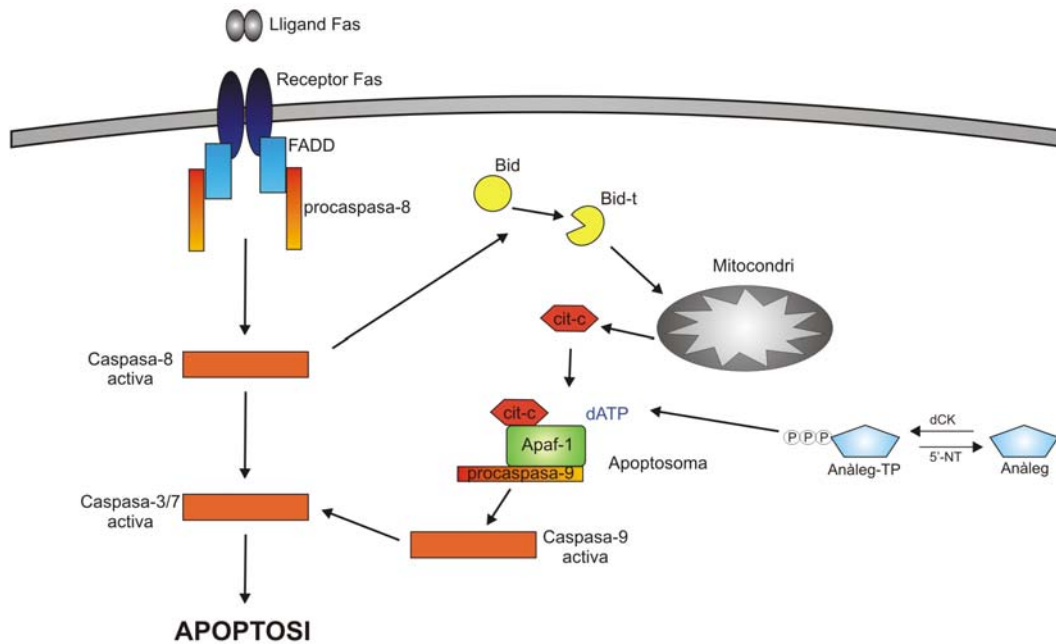


Figura 5. Esquema de la via extrínseca i de la via intrínseca d'apoptosi. El processament de la proteïna Bid connecta les dues vies.

La via dels receptors de la mort s'inicia per la unió de lligands de la superfamília del factor de necrosi tumoral (TNF) als seus receptors de la superfície cel·lular. El receptor Fas és un dels més estudiats. La unió del seu lligand permet la formació del complex DISC, constituït per les proteïnes adaptadores FADD i la pro-caspasa-8. El complex activa la caspasa-8 que seguidament activarà les caspases efectores (Hengartner, 2000). La via mitocondrial es desencadena en resposta a una gran varietat de situacions d'estrès, com el dany a l'ADN. En aquestes condicions es modifiquen diversos components cel·lulars que actuen com a sensors de dany o d'alteració i que poden iniciar una cascada apoptòtica. Un dels efectes d'aquesta cascada és la perforació de la membrana mitocondrial externa, fet que afavoreix l'alliberament del citocrom c i d'altres molècules de dins el mitocondri. El citocrom c s'uneix la proteïna Apaf-1, al dATP i a la caspasa 9 formant un complex anomenat apoptosoma, el qual permet l'activació de la caspasa-9 que alhora activa les caspases 3 i 7, caspases efectores que acabaran induint l'apoptosi de la cèl·lula (Li et al., 1997).

Les dues vies apoptòtiques estan connectades a través del membre de la família Bcl-2, Bid. La caspasa-8 és capaç de trencar Bid generant una forma truncada (t-Bid) que transloca al mitocondri on promou la sortida del citocrom c (Han et al., 1999). El fet que una cèl·lula hagi de morir o sobreviure està determinat, en part, per la família de proteïnes Bcl-2, que conté tant proteïnes pro-apoptòtiques (Bax, Bad, Bid, PUMA) com anti-apoptòtiques (Bcl-2, Bcl-X_L). Aquestes proteïnes responen a estímuls cel·lulars molt variats i poden interaccionar unes amb les altres, el que determinarà si s'ha de desencadenar la senyal apoptòtica que conduirà la cèl·lula a la mort (Cory and Adams, 2002).

Diversos estudis han demostrat que els anàlegs de nucleòsids són capaços d'activar alguna de les dues vies d'apoptosi. El dany en l'ADN provocat pels trifosfats indueix l'expressió de p53 i l'augment de proteïnes pro-apoptòtiques com Bax (Miyashita et al., 1994; Gartenhaus et al., 1996). Diverses formes trifosfat dels anàlegs de nucleòsids poden actuar com a co-factors en la formació de l'apoptosoma, en substitució del dATP (Leoni et al., 1998; Genini et al., 2000b; Marzo et al., 2001). La fludarabina i la cladribina són més eficients que l'ara-G en induir l'apoptosi mitjançant l'apoptosoma (Genini et al., 2000b). Finalment, s'ha demostrat que la cladribina i el 5-fluorouracil indueixen apoptosi a través de la via Fas/FasL (Nomura et al., 2000; Longley et al., 2004).

Malgrat la capacitat dels anàlegs de nucleòsids d'induir l'apoptosi, molts tipus de càncer en mostren deficiències, el que ha fet que aquest sigui un dels mecanismes de resistència més estudiat. El dany causat sobre l'ADN pels anàlegs de nucleòsids és detectat per la proteïna p53, el que la converteix un factor molt important de l'apoptosi. En aquest sentit, mutacions en el gen de p53 s'han descrit com un mecanisme de resistència a la quimioteràpia (Wattel et al., 1994; Johnston et al., 1997; Elsaleh et al., 2001). La perturbació de la integritat mitocondrial també s'ha suggerit com un mecanisme importat de la inducció de l'apoptosi per anàlegs de nucleòsids (Marzo et al., 2001). Així, les proteïnes de la família de Bcl-2, inhibidores o activadores de l'apoptosi, poden estar involucrades en mecanismes de resistència quan es troben desregulades. De fet, Bax i Bcl-2 s'han correlacionat amb resistència en assajos clínics (Lomo et al., 1996; Zaja et al., 1998), tot i que altres estudis no han trobat cap correlació (Thomas et al., 1996; Morabito et al., 1997).

1.4.3. Resistència a multi-drogues

Una causa de la resistència clínica a moltes drogues anti-cancerígenes és la sobre-expressió de proteïnes de resistència a multi-drogues (MRP; *multidrug resistance proteins*) que formen part de l'àmplia família de proteïnes ABC (*ATP-binding cassette*). Aquestes proteïnes de membrana funcionen com bombes d'extrusió dependents d'energia, ja que necessiten la hidròlisi d'ATP per mitjançar l'eflux de compostos molt variables estructuralment (Borst and Elferink, 2002).

Malgrat que un dels principals mecanismes descrits de resistència associats a MRPs és la sobre-expressió del gen MDR-1 (*multidrug resistance-1*), que codifica per la glicoproteïna-p (P-gp), no s'ha demostrat que aquesta proteïna transporti anàlegs de nucleòsids. La capacitat d'exportar nucleòtids i, per tant, algunes formes fosforilades d'anàlegs de nucleòsids només s'ha determinat en tres proteïnes de la família ABC, MRP4, MRP5 i MRP8. De fet, l'expressió heteròloga de MRP5 confereix resistència a la citarabina, la cladribina, la gemcitabina i el 5-fluorouracil, però no a la fludarabina (Reid et al., 2003; Pratt et al., 2005). D'altra banda, l'expressió de MRP4 confereix resistència a diversos antivírics derivats de nucleòsids com l'AZT, el ddl o el d4T, però només a un antineoplàsic, la cladribina (Schuetz et al., 1999; Reid et al., 2003). Finalment, l'expressió de MRP8 disminueix la sensibilitat al 5-fluorouracil (Guo et al., 2003). Tanmateix, degut a la dificultat de realitzar experiments de transport amb aquestes proteïnes, només s'ha demostrat el transport directe a través de MRP5 i de MRP8 de les formes fosforilades del 5-fluorouracil (Guo et al., 2003; Pratt et al., 2005). El fet que siguin proteïnes de recent clonació i que el

seu estudi acabi tot just de començar, fa que encara no s'hagin realitzat anàlisis de correlacions *in vivo*.

1.4.4. Transport d'anàlegs

Abans de ser metabolitzats els anàlegs de nucleòsids, degut a la seva natura hidrofílica, necessiten ser transportats a l'interior cel·lular mitjançant els transportadors de nucleòsids. Així doncs, deficiències en el seu transport poden provocar resistència. Els tipus de transportadors de nucleòsids existents, així com, la seva implicació en l'acció dels anàlegs de nucleòsids s'analitza àmpliament en els següents capítols.

2. TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS

Els nucleòtids tenen una gran importància en la fisiologia de la cèl·lula, ja que constitueixen els elements estructurals dels àcids nucleics i són, per tant, fonamentals per a la viabilitat cel·lular. A més, intervenen en l'homeòstasi energètica de la cèl·lula degut a la seva participació en nombrosos processos bioquímics, com el metabolisme energètic. Així, l'ATP és el principal intermediari en les reaccions de transferència d'energia, el GTP actua durant la síntesi proteica, mentre que el CTP és un element important en el metabolisme lipídic. Els nucleòsids també poden actuar com a mitjancers d'una gran varietat de funcions especialitzades i juguen un paper important en la fisiologia humana. El més important és l'adenosina que, a través de la interacció amb els seus receptors de membrana, participa en gran quantitat de processos fisiològics, com la neurotransmissió, l'activitat cardiovascular, la lipòlisi o l'agregació plaquetària.

Els requeriments metabòlics tant de nucleòsids i nucleòtids com de les seves bases corresponents poden obtenir-se mitjançant tres vies diferents: dieta, síntesi *de novo* i via de recuperació. Les purines i les pirimidines poden ser sintetitzades *de novo* a través d'una via que suposa un elevat cost energètic i que està restringida a alguns tipus cel·lulars. Un mecanisme alternatiu és la via de recuperació o *salvage* que, a partir de la recuperació de bases i nucleòsids preformats, permet mantenir els nivells de nucleòtids amb un menor consum energètic. Aquesta via és imprescindible en aquelles cèl·lules que no poden realitzar la síntesi *de novo*, com cèl·lules de la medul·la òssia, algunes cèl·lules cerebrals, eritròcits, leucòcits, etc (Lajtha and Vane, 1958; Rudolph et al., 1984).

Els nucleòsids són molècules relativament hidrofíliques, pel que la seva internalització a les cèl·lules depèn de transportadors específics de membrana. Els transportadors de nucleòsids tenen un paper important en la regulació de processos fisiològics, modulen els nivells extracel·lulars dels substrats que internalitzen i representen la via d'entrada de molts anàlegs citotòxics utilitzats en el càncer i en la teràpia viral.

Històricament, els transportadors de nucleòsids s'han classificat en base a les seves característiques cinètiques. Això ha portat a assumir que, com a mínim, existeixen set activitats de transport diferents responsables de la captació d'aquests substrats. Dos

d'elles es caracteritzen per realitzar un transport de tipus equilibratiu, independent de sodi, mitjançant difusió facilitada gràcies al gradient transmembrana de concentració. Les cinc restants es corresponen amb activitats concentratives i sodi-dependents, que contribueixen a l'acumulació de nucleòsids a l'interior cel.lular amb la conseqüent despesa energètica. Tanmateix, amb la recent clonació dels diferents sistemes de transport s'ha obtingut una proporció diferent de transportadors equilibratius i concentratius de la que s'havia descrit cinèticament, ja que, tal i com es comentarà posteriorment, fins a aquest moment s'han clonat quatre transportadors equilibratius i tres concentratius.

2.1. Transportadors equilibratius

2.1.1. Propietats cinètiques

Els sistemes de transport equilibratiu són proteïnes que faciliten la difusió dels nucleòsids a través de la membrana plasmàtica a favor del seu gradient de concentració. Són transportadors independents de sodi bidireccionals, és a dir, permeten tant l'influx com l'eflux del solut. Tot i que presenten una àmplia especificitat de substrat, acceptant tant purines com pirimidines, es caracteritzen per una baixa afinitat amb constants aparents que varien en el rang micromolar alt (100-800 μM). En la **taula 2** i la **figura 6** s'exposen les característiques cinètiques dels sistemes equilibratius.

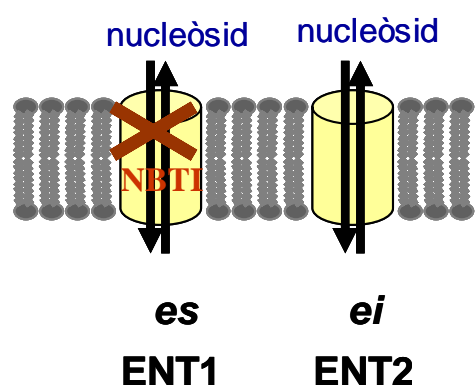


Figura 6. Agències cinètiques de transport de nucleòsids equilibratius i entitats moleculars que les identifiquen. es: transport equilibratiu sensible a NBTI. **ei:** transport equilibratiu insensible a NBTI. **ENT:** entitats moleculars "equilibrative nucleoside transporter"

Transportadors equilibratius			
Activitat	ADNc	Substrat (K_m)	Inhibidor
es	hENT1	Ado (40 μM)	
		Guo (140 μM)	NBTI
		Ino (170 μM)	(0.4 nM)
		Urd (260 μM)	dipirid.
		Tyd (300 μM)	(5 nM)
		Cyd (580 μM)	
ei	hENT2	Ado(100 μM)	
		Ino (50 μM)	NBTI
		Urd (250 μM)	(2.8 μM)
		Tyd (710 μM)	dipirid.
		Cyd(5610 μM)	(356 nM)
		Guo(2700 μM)	
		nucleobases	

Taula 2. Propietats cinètiques dels transportadors de nucleòsids equilibratius.

Cinèticament s'han descrit dos grans sistemes que es diferencien segons la seva sensibilitat a un anàleg estructural de l'adenosina, la nitrobenziltioinosina o NBTI. Així, es parla de transportadors **equilibratius sensibles (es)**, inhibibles per concentracions de NBTI

de l'ordre nanomolar, i transportadors equilibratius insensibles (**ei**), no inhibibles fins i tot a concentracions superiors a 1µM. La quantitat d'anàleg que s'uneix al transportador és proporcional al grau d'inhibició observat, amb una estequiometria inhibidor/transportador de 1:1. Aquesta característica ha fet que la NBTI s'hagi utilitzat de manera rutinària com a lligand per caracteritzar i quantificar el nombre de transportadors presents en la membrana plasmàtica (Jarvis et al., 1980; Tse et al., 1985, Lee, 1994).

El bloqueig per altres agents vasodilatadors com el dilazep, la draflazina i el dipiridamol afecta a ambdues entitats funcionals, si bé el sistema es segueix presentant una sensibilitat molt superior. Tot i això, la recent clonació de les isoformes humanes i de rosegadors ha posat de manifest una resposta inhibidora diferencial, de manera que el dipiridamol i el dilazep inhibeixen el transport *ei* en humans i, de fet, en la majoria d'espècies però no en rata, on ambdós sistemes de transport són resistents (Sundaram et al., 1998).

Malgrat que els sistemes equilibratius transporten tant purines com pirimidines, en general *ei* té una menor afinitat pels substrats que *es*, excepte en el cas de la inosina. Una altra característica diferencial és la capacitat del sistema *ei* de transportar nucleobases, com la hipoxantina. Malgrat que les afinitats per les nucleobases són menors, les concentracions extracel·lulars són majors, pel que en condicions fisiològiques les eficiències del transport de nucleòsids i nucleobases via *ei* són similars (Yao et al., 2002). La hipoxantina, per exemple, és produïda de manera continuada a partir del catabolisme de nucleòtids púrics i es suposa una font important de recuperació de l'anell púric, particularment en cèl·lules de la medulla òssia en les que pot arribar a concentracions de 30 µM (Tattersall et al., 1983).

2.1.2. Característiques moleculars

La clonació dels diferents sistemes de transport ha permès avançar en el coneixement de les característiques moleculars i estructurals dels transportadors de nucleòsids. En la **taula 3** es descriuen les característiques dels transportadors equilibratius clonats, que pertanyen a la família gènica SLC29 (*Solute Carrier 29*).

Transportador	Gen	Localització cromosòmica	Proteïna	Homologia respecte ENT1
hENT1	SLC29A1	6p21.1-p21.2	456 aa	
hENT2	SLC29A2	11q13	456 aa	46%
hENT3	SLC29A3	10q22.1	475 aa	29%
hENT4	SLC29A4	7 (locus no definit)	530 aa	18%

Taula 3. Característiques moleculars dels transportadors de nucleòsids equilibratius clonats.

L'estudi de les característiques moleculars dels sistemes equilibratius de transport de nucleòsids es va iniciar molt abans de la seva clonació mitjançant diverses estratègies. Històricament, un dels tipus cel·lulars més utilitzat, degut al seu fàcil accés, per a l'estudi i

descripció d'aquestes activitats eren els eritròcits humans. El sistema de transport descrit en aquestes cèl·lules es corresponia amb un sistema equilibratiu de difusió facilitada, independent del gradient de sodi i sensible a NBTI (**es**). A partir de la informació derivada de la seqüència aminoacídica del transportador es d'eritròcits humans, obtinguda per purificació parcial de la proteïna utilitzant un assaig d'unió de NBTI (Jarvis and Young, 1981), el 1996 es va aïllar un ADNc de placenta humana que codificava per una entitat proteica glicosilada de 456 residus (50 kDa) i que es va anomenar **hENT1** (human Equilibrative Nucleoside Transporter 1) (Griffiths et al., 1997a). Aquesta molècula, que presenta totes les característiques funcionals dels transportadors de tipus **es**, consta de 11 hipotètics dominis transmembrana connectats per regions hidrofíliques curtes, a excepció de dos grans *loops* compresos entre els dominis transmembrana 1/2 i 6/7, que contindrien tres possibles llocs de N-glicosilació (**Figura 7**). S'han identificat homòlegs en una gran varietat d'eucariotes (llevats, fongs, nemàtodes, plantes, mamífers i també en protozous paràsits). El seu gen ha estat mapat en el cromosoma humà 6p21.1-p21.2 (Coe et al., 1997). La corresponent expressió en oòcits de *Xenopus laevis* dona lloc a una activitat equilibrativa i sodi independent de transport, bloquejada per NBTI i per altres inhibidors coneguts per aquest sistema, com el dilazep o el dipiridamol.

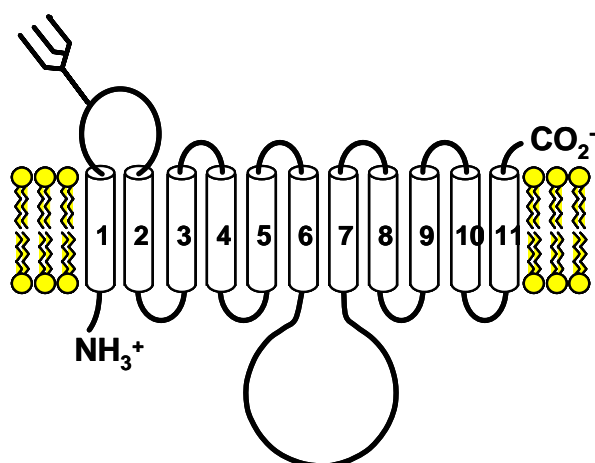


Figura 7. Estructura molecular predita per a la família gènica de transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs).

Posteriorment, Yao i col.laboradors (1997) van identificar les dues proteïnes **rENT** (rat Equilibrative Nucleoside Transporter) de rata mitjançant tècniques basades en l'homologia de seqüències i en l'expressió funcional en oòcits de *Xenopus* dels respectius ADNc. L'ADNc corresponent a rENT1, aïllat de pulmó, jejúnum i fetge, presenta un 78% d'identitat amb la seqüència aminoacídica d'hENT1 i codifica per una proteïna de 457 residus (50 kDa), un més que el seu homòleg humà, corresponent a una cisteïna. De manera anàloga, es va aïllar l'ADNc de jejúnum que codificava per a la proteïna rENT2, formada per 456 aminoàcids amb un 49% d'identitat amb rENT1 i un 50% amb hENT1. La proteïna rENT2 sembla correspondre a la seqüència completa de la forma truncada del producte gènic HNP36, que podria ser un transportador de nucleòsids de membrana plasmàtica resistent a NBTI (Yao et al., 1997).

Dos grups d'investigació independents i de manera gairebé simultània van clonar la isoforma **hENT2** (Griffiths et al., 1997b; Crawford et al., 1998b). Aquest transportador

correspon a una proteïna de 456 aminoàcids, que presenta un 46% d'identitat amb hENT1, localitzada majoritàriament a placenta, cervell, cor i teixit ovàric. La seva topologia és similar a la descrita per hENT1 i conté dos llocs consens de N-glicosilació en el primer *loop* predit. De la mateixa manera que rENT2, hENT2 es correspon amb la seqüència completa de la forma truncada del producte gènic de resposta proliferativa HNP36. La zona carboxil terminal del transportador és idèntica a aquesta petita proteïna de 326 residus, descrita en el *GenBank* i de funció encara desconeguda. Comparant ambdues seqüències s'ha suggerit que HNP36 és traduïda des d'un segon codó d'inici en la pauta de lectura oberta d'hENT2. L'expressió transitòria de la seqüència completa i d'una construcció truncada a 5' i que presenta un 99% d'homologia amb HNP36, demostren que només el primer confereix la capacitat del transport d'uridina a les cèl.lules.

Amb l'objectiu de determinar els dominis responsables de l'especificitat de substrat dels transportadors s'han realitzat diferents estudis basats en la generació de quimeres. Aprofitant que els inhibidors del transportador ENT1 deriven de nucleòsids naturals, i per tant comparteixen els requeriments estructurals, l'estratègia inicial ha suposat la determinació dels dominis estructurals del reconeixement i unió a l'anàleg més utilitzat, la NBTI. Aquestes regions, presumiblement involucrades en la translocació de nucleòsids, han estat confinades, pel moment, entre els dominis transmembrana 3-6 (Sundaram et al., 1998; 2001). Per altra banda, la substitució de la Gly¹⁵⁴ d'hENT1 pel residu equivalent d'hENT2 no afecta a l'activitat de transport però suposa la pèrdua de la sensibilitat a NBTI. No obstant, el procés contrari no sensibilitza hENT2, indicant que conjuntament amb la Gly¹⁵⁴, altres residus han de participar en la sensibilitat diferencial de *es* i *ei* a l'inhibidor (Hyde et al., 2001).

Recentment, s'han identificat dues noves isoformes denominades ENT3 i ENT4 en teixits humans i murins (Hyde et al., 2001; Baldwin et al., 2004), ambdues amb una àmplia distribució tissular. Tant hENT3, de 475 aminoàcids, com hENT4, de 530 aminoàcids, presenten una baixa homologia amb hENT1, 29% i 18%, respectivament. hENT3 es caracteritza per presentar un domini N-terminal de 51 aminoàcids que conté dues regions dileucina, similars als dominis de localització en endosomes/lisosomes, que li confereixen una localització intracel.lular. La mutació dels dos motius dileucina produeix l'expressió de la proteïna en la membrana cel.lular, el que ha permès la seva caracterització cinètica (Baldwin et al., 2005). hENT3 té una àmplia especificitat de substrat i transporta nucleòsids i adenina amb baixa afinitat, però, a diferència dels altres transportadors equilibratius, és relativament insensible als inhibidors NBTI, dipiridamol i dilazep. A més, és altament dependent del pH, amb un pH òptim de 5.5, el que és consistent amb la seva localització en compartiments intracel.lulars amb pH àcid, com els lisosomes. La isoforma hENT4 va ser identificada en una anàlisi de seqüències del genoma i malgrat que inicialment va ser caracteritzat com un transportador de baixa afinitat de monoamines, s'ha demostrat que és capaç de transportar adenosina (Baldwin et al., 2004).

L'avenç més recent en el terreny dels transportadors de nucleòsids ha estat la generació d'un ratolí *knock-out* pel transportador ENT1. Malgrat que ENT1, tal com es comentarà posteriorment, és un transportador important en proliferació i s'expressa de manera abundant en teixits fetals, els ratolins *knock-out* tenen un desenvolupament i un

comportament reproductor normals. Tanmateix, presenten algunes anormalitats neuronals i el seu pes és un 8.7% inferior als controls. L'estudi demostra que ENT1 juga un paper important en les respostes mitjançades per adenosina, principalment via els receptors d'adenosina A₁ (Choi et al., 2004).

2.2. Transportadors concentratius

2.2.1. Propietats cinètiques

Els sistemes de transport concentratius es classifiquen en funció de la seva especificitat de substrat, de manera que es coneixen, tal i com s'indica en la **taula 4**, fins a cinc subtipus diferents. Com ja s'ha comentat prèviament, es tracta d'entitats dependents del gradient transmembrana de sodi que en condicions fisiològiques duen a terme únicament l'influx de substrats, amb la conseqüent acumulació intracel·lular i despesa energètica (**Figura 8**).

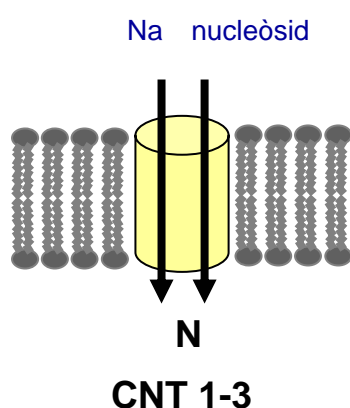


Figura 8. Agències cinètiques de transport de nucleòsids concentratius i entitats moleculars que les identifiquen. **N:** transport concentratiu. **CNT:** entitats moleculars "concentrative nucleoside transporter"

Transportadors concentratius		
Activitat	ADNc	Substrat (K _m)
N2 (cit)	hCNT1	Urd (40-60 μM)
		Tyd (6 μM)
		Cyd (34 μM)
N1 (cif)	hCNT2	Ado (8 μM)
		Guo (21 μM)
		Ino (4.5 μM)
		Urd (80 μM)
N3 (cib)	hCNT3	Urd (21.6 μM)
		Cyd (15.4 μM)
		Tyd (21.2 μM)
		Ado (15.1 μM)
		Guo (43.0 μM)
N4		Urd, Cyd, Ado
		Tyd, Guo
N5 (csg)		Ado, Urd, Guo
		Inhibit per NBTI

Taula 4. Propietats cinètiques dels transportadors de nucleòsids equilibratius.

Els dos sistemes majoritaris, **N1** i **N2**, són mútuament excloents per a la permeabilitat a formicina B (anàleg poc metabolitzable de la inosina) i timidina, respectivament. Anteriorment, N1 es coneixia amb el nom de **cif**, sistema **concentratiu insensible a NBTI** que accepta formicina B com a substrat. La seva especificitat es restringeix a nucleòsids púrics i uridina. De la mateixa manera, N2 s'anomenava **cit**, sistema **concentratiu insensible a NBTI** que accepta timidina com a substrat. Actualment

sabem que s'encarrega del transport de pirimidines i tot i que inicialment es va determinar que podia transportar adenosina, recentment s'ha comprovat mitjançant tècniques d'electrofisiologia que és capaç d'unir-la però no de transportar-la (Larrayoz et al., 2004). Finalment, el tercer dels sistemes de transport descrits en primera instància, **N3**, era antigament conegut com **cib**, degut a la seva àmplia especificitat de substrat, podent transportar tant formicina B com timidina. Respecte a l'estequiometria d'aquests sistemes de transport, s'ha descrit que el sistema N1 presenta una estequiometria Na^+ /nucleòsid 1:1, mentre que la del sistema N3 és de 2:1. En el cas de l'estequiometria del sistema N2 hi ha divergència en els resultats, ja que per mètodes d'electrofisiologia s'han determinat estequiometries 2:1 (Larrayoz et al., 2004) i 1:1 (Smith et al., 2004).

Els dos sistemes dependents de sodi N4 i N5 s'han descrit amb posterioritat en tipus cel.lulars molt concrets. **N4**, caracteritzat en vesícules de vora en raspall de ronyó humà, accepta purines i pirimidines, però no formicina B ni inosina (Gutierrez and Giacomini, 1993). **N5**, la única activitat concentrativa sensible a la inhibició per NBTI i dipiridamol definida fins el moment, correspon a una activitat de transport sodi-dependent preferent per guanosina. Ha estat detectada en cèl.lules humanes NB4 de leucèmia promielocítica aguda (Flanagan and Meckling-Gill, 1997) i en limfòcits B humans (línies cel.lulars Raji i BSL-1) (Soler et al., 1998; 2000). Recentment, s'ha demostrat la seva implicació en el transport d'anàlegs de guanosina com l'ara-G (Flanagan et al., 2003). El sistema N5 s'ha anomenat també **csq** degut a la seva condició de sistema **c**oncentratiu sensible a NBTI i preferent per **g**uanosina.

Les activitats concentratives i dependents de sodi presenten una elevada afinitat pels seus substrats, amb valors de K_m aparent en el rang micromolar baix (1-50 μM). Totes elles semblen acceptar uridina, la majoria accepten adenosina i es caracteritzen, excepte en algun cas concret com el de N5, per la seva insensibilitat a inhibidors del transport equilibratiu de nucleòsids com la NBTI, el dipiridamol i el dilazep. Tot i això, dosis altes de dipiridamol (>50 μM) poden arribar a produir certa inhibició.

2.2.2. Característiques moleculars

Malgrat l'absència d'inhibidors d'alta afinitat i d'anticossos dirigits contra els sistemes de transport concentratiu, la clonació d'aquests sistemes va ser anterior a la clonació dels sistemes equilibratius. Els transportadors concentratius clonats constitueixen la família gènica SLC28 (Solute Carrier 28), les seves característiques principals es descriuen en la **taula 5**.

Transportador	Gen	Localització cromosòmica	Proteïna	Homologia respecte CNT1
hCNT1	SLC28A1	15q25-26	650 aa	
hCNT2	SLC28A2	15q15	658 aa	72%
hCNT3	SLC28A3	9q22.2	691 aa	48%

Taula 5. Característiques moleculars dels transportadors de nucleòsids concentratius clonats.

El primer transportador de nucleòsids es va clonar el 1994 mitjançant la tècnica d'expressió diferencial en oòcits de *Xenopus laevis*. Es tracta d'una aproximació basada en l'activitat de transport i utilitzada de manera rutinària en la clonació d'altres transportadors que, donada la seva baixa proporció relativa davant el nombre total de proteïnes de membrana, no es podien purificar i seqüenciar directament. D'aquesta manera, es va aïllar un ADNc de 2.4 kb a partir d'epiteli de jejúnum de rata, corresponent a l'activitat de transport N2. Aquest sistema transportava timidina de manera saturable i inhibible per uridina i citidina però no per guanosina i coincidia amb el sistema expressat en enteròcits intactes i vesícules de membrana (Huang et al., 1994). Posteriorment es va demostrar l'expressió funcional de N2 en oòcits de *Xenopus laevis* per microinjecció d'ARNm poliadenilat de córtex renal humà (Gutierrez and Giacomini, 1994).

Aquest ADNc de 2.4 kb, clonat a partir de jejúnum de rata, que correspon a l'activitat funcional N2, codifica per una proteïna transportadora de nucleòsids de 648 aminoàcids (71 kDa) denominada **CNT1** (**C**oncentrativa **N**ucleoside **T**ransporter **1**). Inicialment es van proposar 14 dominis transmembrana potencials, tres possibles llocs de N-glicosilació, quatre d'O-glicosilació i quatre punts presumiblement fosforilables per la proteïna quinasa C (PKC). Amb la clonació posterior del seu ortòleg humà, el CNT1 de rata es va passar a anomenar rCNT1. A partir de ronyó humà i mitjançant tècniques de clonació per homologia es van aïllar una sèrie d'ADNc que codifiquen per les isoformes humanes de CNT1 (hCNT1a i hCNT1b) (Ritzel et al., 1997). hCNT1a consta de 650 aminoàcids amb un 83% d'identitat respecte a la seqüència aminoacídica de rCNT1. hCNT1b presenta més d'un 99% d'homologia respecte hCNT1a i es creu que aquestes petites diferències podrien ser degudes a un polimorfisme gènic, no afectant en cap cas la seva activitat de transport. Aquesta va ser la primera evidència de què un membre de la família dels CNTs existia en cèl·lules humanes. El gen de hCNT1 ha estat mapat en el cromosoma 15q25-26. Posteriorment a la realització d'aquests estudis, es va clonar en el nostre grup d'investigació un ADNc diferent a partir de fetge fetal humà. Aquest nova seqüència es caracteritza per presentar una regió 5', abans del codó d'inici ATG, formada per 116 parells de bases no presents en els ADNc descrits originalment. Es postula que aquesta seqüència podria ser el resultat d'un processament alternatiu de l'ARN o bé deguda a la utilització de diferents promotors del gen hCNT1 (Mata et al., 2001).

Per altra banda, Che i col.laboradors l'any 1995 van clonar un sistema concentratiu sodi-dependent expressat en fetge de rata i corresponent a l'activitat funcional N1 (Che et al., 1995). Utilitzant la mateixa estratègia d'expressió en oòcits de *Xenopus laevis* es va obtenir un ADNc de 2.9 kb que codificava pel transportador hepàtic i que inicialment es va anomenar **SPNT** (**S**odium-dependent **P**urine-preferring **N**ucleoside **T**ransporter **1**) tot i que actualment se l'ha rebatejat com **rCNT2** (**r**at **C**oncentrativa **N**ucleoside **T**ransporter **2**). La seqüència nucleotídica preveu una proteïna de 659 aminoàcids (72 kDa) i, en un principi, es va proposar una topologia de 14 dominis transmembrana, amb 5 possibles llocs de N-glicosilació, diferents llocs consens per a la fosforilació per proteïnes quinasa A i C i un motiu d'unió ATP/GTP en l'extrem amino terminal. Tot i que existeix una similitud estructural amb el transportador rCNT1 (64% d'identitat a nivell aminoacídica), es poden destacar diferències notables en l'especificitat de substrat i la distribució tissular. Addicionalment, petites diferències, com la presència del motiu ATP/GTP o dels llocs

fosforilables per la proteïna quinasa A, fan pensar en una regulació diferencial d'ambdues isoformes.

A partir de ronyó humà i mitjançant estratègies de clonació per homologia i RT-PCR, es va aïllar l'ADNc corresponent a l'activitat concentrativa purino-preferent N1, que en aquell moment es va anomenar **hSPNT1** (Wang et al., 1997b). Paral·lelament, Ritzel i col.laboradors (1998) van clonar i caracteritzar funcionalment, a partir d'intestí prim humà, el transportador corresponent a l'activitat funcional N1, que van anomenar **hCNT2** (Ritzel et al, 1998). Aquesta proteïna presenta, a l'igual que hSPNT1, 658 aminoàcids i és idèntica a l'anterior, excepte en un polimorfisme en el residu 75 (Arg per Ser), per tant es considera la mateixa isoforma, que anomenarem hCNT2. Aquesta proteïna presenta un 83% d'homologia amb rCNT2 i un 72% respecte hCNT1.

Anàlogament als estudis realitzats pels transportadors equilibratius, els dominis estructurals implicats en la unió dels substrats i els determinants moleculars responsables de la diferent selectivitat de transport s'han identificat mitjançant la generació de quimeres a partir dels transportadors de rata clonats, rCNT1 i rCNT2. En aquest context, la substitució dels dominis transmembrana 8-9 de la isoforma rCNT1 pels de rCNT2 converteix un transportador pirimidino-preferent en un transportador selectiu per purines. Per contra, si el que es transfereix és exclusivament el domini transmembrana 8, la quimera mostra una àmplia especificitat de substrat, de manera similar a l'activitat de transport N3 (Wang and Giacomini, 1997). Donat que entre el domini transmembrana 8 de rCNT2 i rCNT1 només hi ha 5 residus diferents, la seva substitució un a un ha permès identificar els aminoàcids crítics per a la seva selectivitat de substrat, demostrant que la Ser³¹⁸ és la més important per a la selectivitat de rCNT1 (Wang and Giacomini, 1999a; 1999b). Anàlogament i mitjançant la utilització de tècniques diverses, s'han identificat els aminoàcids responsables de l'especificitat de substrat de les isoformes humanes, que han resultat ser equivalents (Loewen et al., 1999).

La topologia de 14 dominis transmembrana definida en un principi no ha estat corroborada. És més, estudis realitzats en base a la generació d'anticossos van cap a una nova predicció de 13 hèlix transmembrana (Hamilton et al., 1997; Felipe et al., 1998). Aquesta hipòtesi va ser confirmada per Hamilton i col.laboradors (2001) en definir la distribució subcel·lular i la topologia de rCNT1. Inequívocament una o ambdues de les asparagines Asn^{605/648} situades en l'extrem carboxílic de la proteïna estarien glicosilades, fet que confereix la seva ubicació a l'espai extracel·lular. Els potencials llocs de N-glicosilació en l'extrem amino-terminal o entre els dominis transmembrana (hèlix 4 i 5) es mantindrien sense cadenes d'oligosacàrids. El model proposat és, en conseqüència, un model amb 13 dominis transmembrana, amb l'extrem amino-terminal citoplasmàtic i l'extrem C-terminal extracel·lular (**Figura 9**).

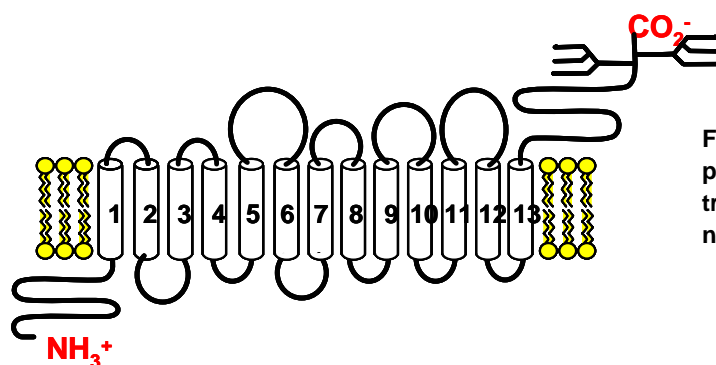


Figura 9. Estructura molecular predita per a la família gènica de transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs).

El darrer ADNc clonat ha estat el corresponent a l'activitat funcional N3. En uns inicis el candidat proposat per aquest tipus d'activitat va ser el transportador SNST1, clonat a partir de ronyó de conill i relacionat amb la família del transportador de glucosa SGLT1 (Pajor and Wright, 1992). Tot i això, la pobre similitud de seqüència amb les famílies de CNTs i ENTs i la baixa activitat de transport concentratiu d'uridina en oòcits de *Xenopus* van fer pensar que, probablement, el veritable substrat d'aquest transportador sigui un altre metabòlit. Per altra banda, atenent a les evidències que descriuen l'activitat N3 en plexe coroideu de conill (Wu et al., 1992), oòcits de *Xenopus laevis* microinjectats amb ARNm de jejúnum de rata (Huang et al., 1993), cèl.lules de leucèmia humana (Belt et al., 1992), cèl.lules de carcinoma colorectal Caco-2 (Belt et al., 1993) i cèl.lules de microglia de rata (Hong et al., 2001), es van buscar entitats del tipus CNT com a potencials representants del sistema de transport N3. Això va dur finalment a la identificació d'**ESTs** (Expressed Sequences Tags) que codifiquen per regions parcialment solapades, corresponents a l'extrem carboxi-terminal d'un nou CNT humà, diferent a hCNT1/2 i no identificat prèviament. L'ADNc *full-length* del potencial transportador es va obtenir mitjançant tècniques de 5'-RACE i RT-PCR a partir del missatger de cèl.lules HL-60 diferenciades amb ésters de forbol (PMA) i de glàndula mamària, que va ser l'origen d'un dels EST identificats. L'ADNc codifica per una proteïna de 691 aminoàcids (77 kDa) que s'ha atribuït a **hCNT3** (Ritzel et al, 2001b).

En concordança amb els altres CNTs, hCNT3 es caracteritza per presentar 13 hèlix transmembrana i nombrosos llocs potencials de N-glicosilació en l'extrem carboxi-terminal. hCNT3 presenta una baixa similitud estructural amb hCNT1 i hCNT2 (48 i 47% en la seva estructura primària) amb diferències marcades en els extrems amino i carboxi terminals. Això ha propiciat la seva classificació dins d'una de les subfamílies gèniques dels CNTs, diferent a la de h/rCNT1/2 i que inclou el transportador recentment clonat hCNT, definit en el vertebrat marí mixino (*Eptatretus stouti*), respecte al qual presenta una homologia del 57%. Tal i com ja s'havia descrit cinèticament, hCNT3 transporta una àmplia varietat de nucleòsids amb constants d'afinitat entre 15-50 μM i una estequiometria Na^+ /nucleòsid de 2:1. El gen d'aquest transportador es troba en el cromosoma 9q22.2 (Ritzel et al., 2001a).

Amb el projecte de seqüenciació del genoma humà completat, s'ha realitzat un anàlisi extensiu, amb resultats negatius, de les bases de dades per tal de trobar nous gens de la família dels CNTs. Aquestes dades apunten que els transportadors no clonats N4 i N5 formarien part d'una altra família gènica o serien variants dels CNTs o ENTs ja clonats (Kong et al., 2004). Aquesta idea ha estat recentment demostrada per Lai i col.laboradors (2005) en un treball en el que l'objectiu inicial era realitzar estudis de mutagènesi dirigida en residus conservats del transportador hCNT1 per tal de definir aquells funcionalment rellevants. Una de les mutacions analitzades, Phe³¹⁶, manté l'activitat del transportador però sorprenentment aquest és més sensible a la inhibició per guanosina, en concordança amb les característiques del sistema de transport N4. El genotipat de l'exó 7 ha permès determinar una nova variant, His³¹⁶, que també presenta una elevada sensibilitat a la inhibició per guanosina. Malgrat que es tracta d'un polimorfisme de molt baixa incidència aquests resultats indicarien que el sistema de transport N4 és una variant polimòrfica del transportador hCNT1, possiblement en la posició 316 (Lai et al., 2005).

Recentment, un ampli projecte ha caracteritzat els polimorfismes dels gens de transportadors responsables de la captació de fàrmacs, inclosos el transportadors de nucleòsids (<http://www.pharmgkb.org> i <http://www.pharmacogenetics.ucsf.edu>). L'estudi posa de manifest que els transportadors equilibratius estan més conservats que els concentratius i, dins d'aquests, el transportador hCNT1 és el que major nombre de polimorfismes presenta. No obstant, l'estudi del paper funcional dels polimorfismes acaba tot just de començar. Gray i col.laboradors (2004) han analitzat mitjançant mutagènesi dirigida 15 variants polimòrfiques de hCNT1. Totes elles presenten característiques cinètiques similars amb l'excepció de Ser545Pro i la deleció-1153, que no transporten timidina. Sorprenentment, la variant Val189Ile presenta menor afinitat per l'anàleg de nucleòsid gemcitabina, el que suggereix que els polimorfismes poden tenir un paper important en la resistència a fàrmacs (Gray et al., 2004). Estudis similars realitzats en polimorfismes dels transportadors hCNT2 i hCNT3 no han trobat diferències significatives en les variants analitzades, el que suggereix un elevat grau de conservació en l'activitat d'aquestes isoformes (Badagnani et al., 2005; Damaraju et al., 2005; Owen et al., 2005).

2.3. Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids

La majoria de les cèl.lules animals combinen diversos sistemes de transport de nucleòsids. Tot i que inicialment les entitats equilibratives es creien majoritàries, de manera que el transport concentratiu quedava relegat bàsicament als epitelis especialitzats, avui dia es sap que ambdós tipus de sistemes presenten una àmplia distribució tissular, coexistent en un gran nombre de tipus cel.lulars.

Estudis de missatger i de proteïna han demostrat que ENT1 es troba expressat de manera ubiqüa en els teixits humans i de rosegadors, malgrat que la seva abundància varia entre els diferents teixits (Griffith and Jarvis, 1996; Griffiths et al., 1997a). Anàlisis immunohistoquímiques en córtex de ronyó de rata, així com transfeccions del transportador hENT1 unit a la GFP (*Green Fluorescent Protein*) han demostrat que en sistemes polaritzats ENT1 es localitza en la membrana basolateral, a diferència dels transportadors concentratius que es situen en la membrana apical (Hamilton et al., 2001;

Lai et al., 2002). Anàlogament, ENT2 s'expressa en gran quantitat de teixits, com cervell, cor, placenta, pàncrees, ronyó i múscul esquelètic, on és particularment abundant (Griffiths et al 1997b; Crawford et al, 1998b). En concordança amb ENT1, també es troba principalment en la membrana basolateral dels sistemes polaritzats (Lai et al., 2002). Els transportadors ENT3 i ENT4 presenten també una àmplia distribució tissular, pràcticament ubiqua. De fet, ENT3 és particularment abundant en placenta, d'on ha estat clonat, i tal i com s'ha comentat prèviament presenta una localització intracel·lular (Baldwin et al., 2004).

El primer transportador de nucleòsids clonat, CNT1, es va detectar inicialment, mitjançant tècniques de Northern blot, en ronyó i jejúnum, però no en cor, cervell, melsa, pulmó, fetge ni múscul esquelètic (Huang et al., 1994), el que va fer pensar que s'expressava únicament en teixits epitelials especialitzats. Tanmateix, la utilització de tècniques de detecció d'ARNm més sensibles i la generació d'anticossos ha revelat que presenta un patró d'expressió molt més ampli del definit inicialment, malgrat que els seus nivells d'expressió són menors dels observats pels transportadors equilibratius (Valdés et al., 2000; Pennycooke et al., 2001). Diversos estudis han demostrat una expressió predominant de CNT1 en les membranes en raspall de jejúnum, en els túbuls renals corticals i en el canalicle biliar de les cèl·lules parenquimals hepàtiques, dades consistents amb el seu paper indispensable en l'absorció de nucleòsids de la dieta, del filtrat glomerular o dels derivats de l'acció de les nucleotidases extracel·lulars, respectivament (Hamilton et al., 1997; 2001; Duflo et al., 2002). Comparat amb CNT1, CNT2 sembla tenir una distribució tissular més àmplia. Estudis de Northern blot han demostrat la seva expressió en cor, fetge, múscul esquelètic, ronyó, intestí, pàncrees, així com en leucòcits normals i en un gran nombre de teixits i línies cel·lulars tumorals (Wang et al., 1997a; Pennycooke et al., 2001). Mitjançant RT-PCR i estudis recents d'hibridació *in situ*, s'ha demostrat també la seva presència en cervell (Anderson et al., 1996; Guillen-Gómez et al., 2004). La distribució de hCNT3 es va analitzar mitjançant un array d'ARN. Els nivells d'expressió més elevats es van trobar en un gran nombre de teixits com glàndula mamària, pàncrees, medulla òssia i tràquea, tot i que també es van detectar nivells baixos d'expressió en fetge, pulmó, placenta i cor, entre d'altres (Ritzel et al., 2001b).

2.4. Regulació dels transportadors de nucleòsids

Anàlogament a molts sistemes de transport, els transportadors de nucleòsids estan regulats per un ampli ventall d'elements que poden incloure des d'hormones i factors de creixement fins a efectes nutricionals o de progressió en el cicle cel·lular. Tanmateix, no s'han realitzat molts estudis al respecte i aquests han estat generalment dispersos degut, bàsicament, a que l'interès principal s'ha centrat en la clonació de les diferents isoformes. Tot i això, gràcies a l'aparició en els darrers anys de noves eines moleculars, s'està començant a conèixer amb més detall la regulació d'aquestes proteïnes. En alguns casos, però, els resultats poden ser contradictoris. Per exemple, l'activació de la proteïna quinasa C (PKC) en cèl·lules cromafins produeix una disminució del transport d'adenosina com a conseqüència d'una reducció dels transportadors en la membrana (Delicado et al., 1994). Per contra, l'estimulació de la PKC en cèl·lules MCF7 i HeLa augmenta la captació de nucleòsids (Coe et al., 2002), mentre que en un cultiu primari de cèl·lules endotelials adrenals bovines no té cap efecte (Sen et al., 1996). Aquestes observacions suggereixen

que la regulació dels transportadors de nucleòsids és dependent del tipus cel.lular i pot ser deguda a múltiples mecanismes.

Alguns dels estudis de regulació detallats a continuació són anteriors al clonatge dels transportadors de nucleòsids pel què utilitzen la nomenclatura clàssica dels sistemes de transport, descrita en les taules 1 i 3 (es, ei i N1-5). Tot i això, per facilitar la lectura i evitar possibles confusions en aquesta memòria s'utilitzarà únicament la nomenclatura CNTs i ENTs.

2.4.1. Regulació en cèl.lules del sistema immunitari

El sistema immunitari engloba una família de tipus cel.lulars molt heterogènia que presenten funcions altament específiques. Segons el requeriment funcional les cèl.lules poden ser activades, o bé, induïdes a proliferar, diferenciar-se o apoptotitzar, el que podria implicar una regulació diferencial dels transportadors de nucleòsids. A més, aquestes cèl.lules són altament dependents de les vies de recuperació de nucleòsids i, en general, co-expressen transportadors concentratius i equilibratius. Aquestes característiques fan que siguin considerades un bon model cel.lular a l'hora d'estudiar el paper fisiològic d'aquests sistemes de transport. De fet, els estudis d'expressió i regulació dels transportadors de nucleòsids en el sistema immunitari s'han analitzat principalment en dos tipus cel.lulars, els macròfags i les línies cel.lulars derivades de limfòcits B.

Existeixen evidències derivades d'estudis en cèl.lules quiescents que confirmen que el tipus de transportador de nucleòsids expressat, així com la seva activitat de transport, és modulada durant la progressió del cicle cel.lular. Així, en macròfags quiescents de medul.la òssia de ratolí SI, s'observa un increment de transport via ENT1 d'adenosina i d'uridina després de l'addició del factor estimulador de colònies 1, CSF-1, que podria estar relacionat amb l'entrada en fase S del cicle cel.lular (Meckling-Gill et al., 1993). De manera similar, l'addició del factor estimulador de colònies (CM-CSF) en pacients amb leucèmia mieloide aguda induïx un increment progressiu en l'expressió del transportador ENT1 (Wiley et al., 1994).

L'activació i/o proliferació dels macròfags juga un paper important en la resposta immune i és una etapa crítica en l'adquisició de l'activitat citotòxica. Estudis realitzats en el nostre grup d'investigació han demostrat que l'activació del macròfag mitjançant interferó- γ o LPS incrementa específicament els transportadors concentratius CNT1 i CNT2, mentre que la inducció del macròfag a proliferar amb M-CSF activa únicament el transportador equilibratiu ENT1. En aquest model la inhibició d'ENT1 mitjançant NBTI bloqueja tant la incorporació de timidina a l'ADN com la proliferació, però no la incorporació d'uridina a l'ARN, el que suggereix que, com a mínim en aquest teixit, els transportadors CNTs aporten precursors per a l'ARN, mentre que els substrats d'ENT1 són utilitzats en la síntesi d'ADN (Soler et al., 2001a, 2001b). Aquests resultats indicarien que la regulació selectiva dels transportadors de nucleòsids és crítica per a la proliferació i diferenciació dels macròfags i confirmarien l'existència d'una regulació diferencial dels transportadors.

La regulació dels transportadors de nucleòsids en limfòcits B humans ha estat caracteritzada en les línies cel.lulars Raji i BLS-1. Aquestes cèl.lules expressen el

transportador equilibratiu ENT1 i els concentratius CNT2 i N5 (actualment sense clonar). Activadors de les cèl.lules B, com el PMA i el LPS, incrementen l'activitat dels dos sistemes concentratius i disminueixen la de l'equilibratiu per un mecanisme dependent de la proteïna quinasa C. Ambdós elements reguladors indueixen la síntesi de TNF- α , el que suggereix que aquesta citoquina podria mitjançar algun dels efectes produïts per aquests agents, ja que la seva addició incrementa les activitats concentratives per un mecanisme dependent de PKC. En canvi, malgrat que inhibeix l'activitat equilibrativa aquest efecte no pot ser abolit per la inhibició de la PKC (Soler et al., 1998). Posteriorment, es va analitzar, en la línia cel.lular Raji, l'efecte de l'òxid nítric (involucrat en la modulació de la resposta apoptòtica dels limfòcits B) en l'expressió dels transportadors de nucleòsids. Els estudis revelen que l'efecte activador del PMA sobre les isoformes concentratives no requereix la presència d'òxid nítric, a diferència de l'efecte inhibidor sobre el transportador equilibratiu que és dependent de l'òxid nítric sintasa (iNOS), així com de l'activació dels limfòcits B (Soler et al., 2000).

La línia cel.lular derivada de leucèmia promielocítica HL-60 també s'ha utilitzat àmpliament com a model de regulació dels transportadors de nucleòsids per diferenciació, ja que pot ser induïda a diferenciar per vies diferents a granulòcit o a monòcit. Les cèl.lules HL-60 presenten majoritàriament una activitat equilibrativa. La seva diferenciació tant a monòcit, amb PMA, com a granulòcit, amb DMSO, produeixen una disminució del transport equilibratiu acompanyat d'un augment del concentratiu (Lee et al, 1991; 1994). La component concentrativa que s'indueix correspon principalment al transportador hCNT3. De fet, aquest transportador va ser clonat de cèl.lules HL-60 diferenciades amb PMA, ja que aquestes augmenten substancialment els seus nivells d'ARNm de hCNT3 (Ritzel et al., 2001b).

L'expressió dels transportadors de nucleòsids també pot ser regulada per nucleòsids i fàrmacs derivats de nucleòsids. En aquest sentit, la fludarabina i la cladribina semblen augmentar l'expressió d'hENT1 en cèl.lules de leucèmia limfàtica crònica, possiblement degut a un augment de cèl.lules en fase S (Petersen et al., 1996). Per altra banda, la seqüència primària dels transportadors de nucleòsids revela diversos possibles llocs de fosforilació que poden ser reconeguts per una varietat de quinases i ser responsables de canvis a curt termini de l'activitat dels transportadors. Malgrat que alguns estudis mostren evidències d'aquest tipus de regulació en altres teixits, encara no es coneix res sobre la regulació post-traducciona a curt termini d'aquestes proteïnes en cèl.lules del sistema immunitari.

2.4.2. Regulació en altres tipus cel.lulars

Els estudis de regulació en altres tipus cel.lulars s'han centrat essencialment en cèl.lules epitelials, com els hepatòcits. La diferenciació dels hepatòcits pot determinar l'expressió dels transportadors de nucleòsids. Del Santo i col.laboradors (2001) descriuen que els hepatòcits fetals, cèl.lules altament replicatives, presenten una major activitat basal de transportadors equilibratius si es compara amb hepatòcits neonatals o hepatòcits adults. Una fracció significativa de l'activitat equilibrativa és deguda a ENT1, mentre que en hepatòcits neonatals (també altament proliferatius) la major part de l'activitat és insensible

a NBTI (ENT2). La inducció de la diferenciació d'hepatòcits fetals mitjançant hormones com la dexametasona i l'hormona tiroidea T3 han demostrat un increment en l'expressió de CNT2, aproximant-se als nivells del l'hepatòcit adult (del Santo et al., 2001).

La hipòtesis de què la diferenciació determina el patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en l'hepatòcit i que la proliferació té lloc quan els sistemes equilibratius són els components majoritaris de l'activitat de transport es corrobora amb el fet que la línia cel.lular FAO (derivada d'hepatoma de rata) sobreexpressa ENT1 i ENT2, però no CNT2 (del Santo et al., 1998). Característica que no és exclusiva d'aquesta línia cel.lular sinó que també pot produir-se en cultius primaris de cèl.lules parenquimals hepàtiques. En concordança, Dragan i col.laboradors (2000) han descrit una pèrdua selectiva de les isoformes CNTs en dos models d'hepatocarcinogènesi en rata.

Els transportadors de nucleòsids també es poden regular per assequibilitat dels seus substrats. Valdés i col.laboradors (2000) han estudiat l'efecte de la disponibilitat de nutrients *in vivo* sobre l'expressió de les isoformes concentratives rCNT1 i rCNT2 en dos epitelis, parènquima hepàtic i jejúnum. Es van aïllar i caracteritzar vesícules de membrana de raspall de jejúnum de rates control i dejunades 48 hores i es va observar que tant l'expressió de rCNT1 com la captació dependent de sodi de timidina i gemcitabina mostraven un clar augment en les rates sotmeses al dejuni. Contràriament, l'expressió de rCNT1 en fetge disminueix lleugerament. El responsable d'aquest efecte sembla ser el contingut de nucleòtids de la dieta, ja que l'efecte es mimetiza en administrar a les rates una dieta lliure en nucleòtids (Valdes et al., 2000).

Estudis de regulació de l'expressió de transportadors de nucleòsids concentratius demostren que la inducció d'un arrest en G₁/S en les cèl.lules FAO disminueix l'expressió de la proteïna CNT1 i aquesta es restitueix amb l'eliminació del medi de l'agent que causava l'arrest, la mimosina. La regulació de la seva expressió amb el temps es produeix de manera paral.lela a l'acumulació de proteïnes de cicle cel.lular implicades en l'arrest, com la ciclina E i la ciclina A, demostrant que CNT1 es troba altament regulat pel cicle cel.lular (Valdes et al., 2002).

Diversos autors han trobat evidències de la regulació dels transportadors de nucleòsids a curt termini. Com s'ha comentat prèviament, l'activació de la PKC amb PMA durant 10 minuts provoca, en les línies cel.lulars Hela i MCF7, un ràpid augment de l'activitat equilibrativa corresponent al transportador ENT1. Tanmateix, no es produeix un augment de llocs d'unió de NBTI a la membrana, el que suggereix que el nombre de transportadors a la membrana no canvia. Per altra banda, de manera similar als resultats descrits en cèl.lules del sistema immunitari, el tractament de 24 hores amb PMA, que provoca una inactivació de la PKC, produeix una disminució de l'activitat equilibrativa (Coe et al., 2002). Recentment, Dufлот i col.laboradors (2004) han demostrat en hepatòcits que l'activació del receptor d'adenosina A1 produeix un ràpid augment de l'activitat de CNT2, amb un efecte màxim als 10 minuts del tractament. No obstant, no es tracta d'una activació directa sinó que els canals de potassi K_{ATP} actuen com a intermediaris de l'efecte, ja que la seva inhibició bloqueja l'activació de CNT2. Paral.lelament, en el mateix model, la doctora Sonia Fernández ha demostrat que el tractament d'una hora amb àcids biliars augmenta

també l'activitat de CNT2. En aquest cas, però, malgrat no hi ha canvis en els nivells totals de proteïna, l'augment d'activitat és degut a un increment del nombre de transportadors en la membrana plasmàtica.

3. PAPER FARMACOLÒGIC DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS

Com ja s'ha comentat en el primer capítol, els anàlegs de nucleòsids actuen sobre les cèl·lules mitjançant un procés de tres etapes: captació, metabolització i acció farmacològica. Malgrat que, com s'apuntava anteriorment, deficiències en la metabolització o en els efectors de l'acció farmacològica poden produir resistència, cal tenir en compte que el transport dels fàrmacs a través de la membrana plasmàtica és el pas limitant per a la seva bioassequibilitat i subsegüent acció. Per tant, la primera etapa de l'acció dels anàlegs, el transport, també podria jugar un paper important en la sensibilitat o resistència a un fàrmac.

3.1. Transport d'anàlegs de nucleòsids

Els fàrmacs derivats de nucleòsids utilitzats en el tractament de la SIDA i en teràpies del càncer presenten, en general, petites modificacions estructurals respecte als nucleòsids naturals, el que fa suposar que la seva via d'entrada serà la mateixa que per aquestes molècules, els transportadors de nucleòsids. Tot i això, el fet que la majoria dels transportadors involucrats en la captació d'aquests derivats nucleosídics no hagin estat clonats fins recentment ha contribuït a l'endarreriment d'aquest tipus d'estudis.

Existeixen pocs treballs, i aquests són força dispersos, sobre el transport d'anàlegs de nucleòsids abans de la clonació dels seus transportadors. El 1984, Chen i col.laboradors van determinar que el transport de desoxicoformicina era inhibible per NBTI i dipiridamol, inhibidors dels transportadors de nucleòsids equilibratius. Resultats similars es van obtenir en mesurar la captació de 2-cloroadenosina en eritròcits humans (Jarvis et al., 1985). D'altra banda, Gati i col.laboradors (1984) van anar més enllà en els seus estudis en analitzar l'efecte de les modificacions en les posicions 2' i 3' del sucre en el reconeixement dels transportadors. Els resultats suggerien que la posició 3' és important per a la permeabilitat dels nucleòsids, hipòtesi que ha estat demostrada, tal com es comentarà posteriorment, en estudis recents.

Tot i la clonació dels transportadors, la capacitat d'aquests per reconèixer fàrmacs derivats de nucleòsids s'ha analitzat normalment mitjançant inhibicions creuades, bàsicament degut a la dificultat d'obtenir els anàlegs marcats radioactivament. Així, per exemple, CNT2 pot ser inhibit per aciclovir, ddl, ddA i cladribina, mentre que AZT i ddC no inhibeixen de manera significativa la seva activitat (Schaner et al., 1997). El problema d'aquesta aproximació és que la inhibició del transport no assegura una captació mitjançada pel transportador. En aquest sentit, tot i que s'havia determinat que la fludarabina inhibia CNT2, posteriorment es va demostrar que no n'era substrat (Lang et al., 2001). Una complicació afegida és el fet que en alguns casos s'han detectat diferències en

l'especificitat entre ortòlegs. Així, mentre el CNT2 de rata és capaç de transportar cladribina, l'humà no (Schaner et al., 1997; Lang et al., 2001). Aquesta variabilitat en el transport de cladribina suggereix diferències en les selectivitats pel substrat entre les proteïnes CNT2 humanes i de rata.

Un altre mètode que s'ha utilitzat per determinar els substrats dels transportadors de nucleòsids ha estat la mesura de les corrents de sodi generades en la captació del substrat mitjançant el *two-electrode voltage clamp* en oòcits de *Xenopus* que expressen de manera heteròloga el transportador. Donat que aquesta tècnica aprofita que el transportador sigui electrogènic, només és útil pels transportadors concentratius. En el nostre grup de recerca s'ha utilitzat l'electrofisiologia per a caracteritzar tant la captació d'anàlegs com l'estequiometria Na:nucleòsid del transportador hCNT1 (Lostao et al., 2000; Larrayoz et al., 2004). Addicionalment, l'expressió del transportador en oòcits de *Xenopus* també es pot utilitzar per a mesurar la captació de substrats marcats radioactivament. L'avantatge d'aquesta aproximació és que els oòcits presenten baixos nivells d'expressió de transportadors i un baix metabolisme, per tant, les mesures de transport no es veuran afectades pel metabolisme cel·lular. De fet, l'expressió en oòcits ha estat un dels models més utilitzats en l'anàlisi del transport d'anàlegs, tant pels transportadors concentratius com pels equilibratius (Mackey et al., 1999; Lostao et al., 2000; Yao et al., 2002).

Tot i que en els darrers anys l'estudi del transport d'anàlegs de nucleòsids ha avançat força calen encara més estudis per a completar la identificació dels transportadors específics responsables de la seva captació, i sobretot, les afinitats amb les que són transportats. En la **taula 6** es mostra la selectivitat de substrat i el patró farmacològic, encara incomplet, dels transportadors de nucleòsids.

Les dades mostren que els anàlegs de nucleòsids utilitzats en la teràpia del càncer són millor substrat dels transportadors de nucleòsids que els antivírics. La diferència entre els dos tipus de molècules es troba en la posició 3' de la ribosa, ja que mentre els antitumorals mantenen el grup hidroxil, característic dels nucleòsids naturals, els antivírics el tenen substituït. Dins del marc de la tesi doctoral d'en Pedro Cano, s'ha determinat que la substitució del grup 3'OH disminueix enormement l'afinitat del substrat pel transportador hCNT1 (Cano-Soldado et al., 2004) o fins i tot aquest no és captat pel transportador, com en el cas de la ddC. La importància d'aquesta posició en el reconeixement dels substrats també s'ha demostrat per a les isoformes hCNT2, hCNT3 i hENT1 (Lum et al., 2000; Patil et al., 2000; Zhang et al., 2003). Els estudis sobre els requeriments moleculars dels transportadors de nucleòsids són d'especial importància a l'hora de dissenyar nous anàlegs per a la teràpia antivírica o antitumoral. Amb aquest objectiu, Chang i col.laboradors (2004) han dissenyat un model computacional per predir l'afinitat dels anàlegs de nucleòsids pels transportadors hENT1, hCNT1 i hCNT2.

ANÀLEGS ANTITUMORALS					
	ENT1	ENT2	CNT1	CNT2	CNT3
Citarabina	S	inh	S	NT	
Gemcitabina	S (160µM)	S (740µM)	S (17µM)	NT	S
5'-DFUR	S		S (209µM)	inh	
Fludarabina	S (107µM)	S	NT	NT ^a	S
Cladribina	S (23µM)	S	NT	NT ^a	S
Troxacitabina	difusió passiva				
Clofarabina	S (108µM)	S (328µM)	NT	S (81µM)	S (52µM)

ANÀLEGS ANTIVÍRICS					
	ENT1	ENT2	CNT1	CNT2	CNT3
AZT (zidovudina)	NT ^a	S	S (964µM)	NT	S
ddC (zalcitabina)	S	S(>7,5 mM)	NT	NT	S
ddl (didanosina)	S	S (3 mM)	NT	NT ^a	S
d4T (stavudina)	NT		S(15,6 mM)	NT	
3tC (lamivudina)	NT		NT	NT	

Taula 6. Transport d'anàlegs de nucleòsids

S: substrat. Entre parentèsi, si s'ha descrit, s'indica la K_m . **inh:** no s'ha determinat si és substrat, però inhibeix el transport. **NT:** no es transporta. **NT^a:** no es transporta, però inhibeix el transport. Els espais en blanc corresponent a interaccions no determinades fins al moment.
Referències: Chandrasena et al., 1997; Ritzel et al., 1997; Lum et al., 1998; 2000; 2001b; Schaner et al., 1999; Lostao et al., 2000; Ward et al., 2000; Galmarini et al., 2001b; Yao et al., 2001; Cano-Soldado et al., 2004; King et al., 2005

3.2. Paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs

Com s'ha anat comentant en aquesta memòria, els transportadors de nucleòsids poden tenir una importància clínica per diferents motius. En primer terme, els anàlegs administrats en el tractament del càncer utilitzen aquests transportadors per entrar a la cèl.lula i exercir la seva acció farmacològica. Per tant, l'expressió dels transportadors de nucleòsids en les cèl.lules tumorals és indispensable per a la seva acció citotòxica, en cas contrari poden presentar-se casos de resistència. En segon terme, la distribució dels transportadors de nucleòsids en diferents òrgans o teixits, particularment en el sistema absortiu o excretor, pot influir en la seva farmacocinètica i propietats toxicològiques. Finalment, els transportadors de nucleòsids poden ser per ells mateixos dianes terapèutiques. Així, els inhibidors dels sistemes equilibratius dipiridamol i dilazep s'han utilitzat en el tractament de malalties del cor o cardiovasculars. A més, s'ha analitzat àmpliament el paper sinèrgic d'aquests inhibidors en l'efecte de fàrmacs no derivats de nucleòsids. Malgrat aquests diferents efectes, en aquesta memòria ens centrarem únicament en el primer punt, és a dir, en el paper dels transportadors de nucleòsids en la captació i sensibilitat als anàlegs de nucleòsids utilitzats en la quimioteràpia.

3.2.1. Estudis *in vitro*

Ja en 1977, Greenberg i col.laboradors, en estudis realitzats en cèl.lules d'hepatoma resistents a 5-fluorouracil, van apuntar que els sistemes de transport de nucleòsids podien jugar un paper limitant en l'activació dels anàlegs i en la seva acció citotòxica. En concordança, la caracterització d'una línia cel.lular de carcinoma humà resistent a 5-fluorodesoxiuridina va demostrar que era la deficiència en la difusió facilitada dels nucleòsids i no el seu metabolisme la responsable de la resistència (Sobrero et al., 1985). De manera similar, la línia limfoid H9 resistent a citarabina presentava nivells de proteïna d'hENT1 més baixos que la línia parental però, sorprenentment, els nivells d'ARNm eren similars, el que suggereix que la causa de la resistència és deguda a una deficiència en la producció o en el recanvi d'hENT1 (Sarkar et al., 2005).

Els estudis de cèl.lules deficientes en transportadors de nucleòsids també han generat evidències de la seva importància en la sensibilitat a anàlegs. La mutagènesi i selecció de cèl.lules de ronyó de porc PK-15 deficientes en transport va permetre aïllar unes cèl.lules 100 cops més resistents a tubercidina, citarabina i 5-fluorodesoxiuridina que la línia parental. Addicionalment, aquestes cèl.lules no transportaven ni timidina ni uridina i havien perdut els llocs d'unió d'alta afinitat per NBTI, corresponents a ENT1 (Aran & Plagemann, 1992). La línia cel.lular derivada de leucèmia CEM és sensible a l'acció dels anàlegs de nucleòsids gemcitabina, citarabina i troxacitabina, mentre que la línia deficient en dCK és resistent als tres anàlegs. Per contra, la línia deficient en transportadors de nucleòsids és únicament resistent a gemcitabina i citarabina, però no a troxacitabina. L'estudi de la captació de troxacitabina va demostrar que aquest no era mitjançat per transportadors de nucleòsids, sinó que es produïa per difusió passiva, el que explica les diferències de sensibilitat entre anàlegs (Gourdeau et al., 2001). Mackey i col.laboradors van analitzar la toxicitat a gemcitabina en diferents línies cel.lulars. Les seves dades van confirmar que les cèl.lules deficientes en transportadors de nucleòsids presentaven una resistència a gemcitabina, que podia arribar fins a 1800 cops. En concordança, la inhibició dels transportadors equilibratius amb dipiridamol en aquelles cèl.lules sensibles a gemcitabina les feia resistents a la seva acció (Mackey et al., 1998). Contràriament, un anàlisi similar fet en 3 línies cel.lulars de tumor de pàncrees i una de bufeta no va trobar cap tipus de correlació entre l'expressió d'ENT1 i la sensibilitat a gemcitabina (Rauchwerger et al., 2000).

El National Cancer Institut (NCI) conté informació sobre sensibilitat a una gran varietat de fàrmacs en un ampli nombre de línies cel.lulars. Aprofitant aquestes dades, es va analitzar en 50 línies cel.lulars l'expressió dels 7 transportadors de nucleòsids clonats i els resultats obtinguts es van comparar amb les sensibilitats descrites en aquestes línies tant pels anàlegs de nucleòsids com per altres fàrmacs. Les anàlisis no van trobar cap correlació amb els anàlegs de nucleòsids, no obstant, n'hi havia entre l'expressió de CNT1 i la toxicitat a 2-metilguanina i entre ENT2 i la hidroxidurea (Lu et al., 2002). De manera similar, es van analitzar 60 línies cel.lulars mitjançant microarrays d'ADN específics per transportadors i els nivells d'expressió gènica resultants es van comparar amb la sensibilitat a 119 fàrmacs. A diferència de l'estudi anterior, en aquest existia una correlació positiva entre ENT1 i la sensibilitat als anàlegs azacitidina i inosina-glicodialdehid. A més,

la inhibició d'ENT1 disminuïa l'efecte citotòxic d'aquests, el que demostrava el paper del transportador en la seva sensibilitat. Addicionalment, l'expressió de CNT1 correlacionava amb la sensibilitat a 6-mercaptopurina i la de CNT3 amb la de gemcitabina, citarabina i tioguanina (Huang et al., 2004).

El fet que els transportadors equilibratius siguin bidireccionals fa que aquests també puguin eliminar el fàrmac de l'interior cel·lular, per tant la inhibició de l'eflux podria augmentar l'efecte citotòxic. En aquest sentit, en cèl·lules tumorals humanes la inhibició dels transportadors equilibratius amb dipiridamol, després d'un tractament de dues hores amb citarabina, potencia fins a 3 cops la sensibilitat a l'anàleg, el que ve recolzat amb un augment d'ara-CTP intracel·lular (Chan, 1989). Resultats similars es van obtenir en la línia cel·lular de leucèmia L1210, en la que el dipiridamol potencia la citotoxicitat a 2-clorodesoxiadenosina. Addicionalment, en cèl·lules L1210 deficientes en ENT1, la presència de NBTI no afecta a la sensibilitat al fàrmac, mentre que en cèl·lules que expressen ENT1 i CNT2 la inhibició produeix una baixada de tres cops de la IC_{50} (Crawford et al., 1990).

Tots els estudis detallats fins ara analitzen únicament el paper dels transportadors equilibratius, en concret d'ENT1. Malgrat que els transportadors concentratius presenten una elevada afinitat pels seus substrats i, per tant, s'esperaria un major sensibilitat als anàlegs quan aquests s'expressen, existeixen pocs estudis al respecte. L'expressió heteròloga de hCNT1 en cèl·lules CHO produeix una major sensibilitat de les cèl·lules a 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR), metabòlit actiu de la capecitabina, fet que demostra la importància de hCNT1 en la sensibilitat a aquest anàleg de nucleòsid (Mata et al., 2001). De manera similar, l'expressió de hCNT2 en cèl·lules CEM deficientes en transportadors augmenta la resposta citotòxica a cladribina, 5'-dFUR i 5-FUd, però no a fludarabina (Lang et al., 2001).

3.2.2. Estudis clínics i anàlisis *ex vivo*

El paper dels transportadors de nucleòsids en la resistència a anàlegs en clínica està menys estudiat degut, en part, a la dificultat d'obtenir i d'analitzar mostres de tumors. Aquesta limitació ha fet que la majoria d'estudis s'hagin realitzat en mostres de leucèmia, ja que aquestes es poden extreure amb relativa facilitat i a més permeten realitzar mesures de citotoxicitat de les cèl·lules *ex vivo*. Alhora, els treballs s'han centrat en l'anàlisi d'hENT1, ja que és el transportador més abundant en cèl·lules de mamífer i presenta una àmplia distribució tissular.

La relació entre la resistència clínica a citarabina i el transportador hENT1 ha estat, de lluny, la més estudiada. Les primeres evidències daten del 1982, quan Wiley i col·laboradors van observar en cèl·lules de leucèmies mieloblàstica i limfoblàstica agudes (LMA i LLA) que la captació de citarabina correlacionava amb el nombre de llocs d'unió de NBTI, mesura de la quantitat de transportadors ENT1. Addicionalment, aquells pacients que tenien baixos nivells d'hENT1 no responien de manera efectiva a la teràpia amb citarabina (Wiley et al., 1982). Similarment, en cèl·lules aïllades de leucèmies agudes, la sensibilitat a fludarabina, citarabina i cladribina correlacionava amb l'abundància cel·lular d'ENT1 (Gati et al., 1997; 1998). Wright i col·laboradors (2002) van utilitzar la unió del

compost fluorescent SAENTA per quantificar en nombre de transportadors hENT1 en LLA infantil. En aquest cas però, tot i que es va obtenir una correlació positiva amb la sensibilitat a citarabina, la correlació amb la cladribina va ser negativa.

Galmarini i col.laboradors van utilitzar la PCR a temps real per mesurar diferents factors importants en l'acumulació de la forma activa de la citarabina en cèl.lules de LMA. Els resultats mostren que la disminució de l'expressió d'hENT1 es correlaciona amb un temps de supervivència lliure de la malaltia (DFS) més curt. Addicionalment, altres gens com l'ADN polimerasa i la 5'-nucleotidasa també podrien ser importants en l'anàlisi de la resistència, el que suggereix que és la combinació de diferents factors el que determina la sensibilitat o resistència (Galmarini et al., 2002b; 2002c). Resultats similars s'han obtingut en LLA infantil, on existeix una correlació entre la sensibilitat a citarabina i els nivells d'ARNm d'hENT1 (Stam et al., 2003).

La recent generació d'anticossos contra els transportadors de nucleòsids ha permès la realització d'estudis immunohistoquímics i, per tant, l'anàlisi de tumors sòlids. Utilitzant anticossos es va determinar l'expressió d'hENT1 en cèl.lules Reed-Sternberg de nòduls limfàtics de pacients amb la malaltia de Hodgkin. Els resultats no van mostrar cap correlació clínica, tot i que un 60% dels tumors tenien nivells molt baixos d'hENT1 (Reiman et al., 2002a). En concordança, els nivells d'expressió d'hENT1 en diferents subtipus de limfomes no-Hodgkin i en nòduls limfàtics reactius són força baixos i aquest s'expressa majoritàriament en els centres fol.liculars (Chow et al., 2005).

També Mackey i col.laboradors (2002) van utilitzar un anticòs monoclonal per determinar mitjançant immunohistoquímica l'expressió diferencial de la proteïna hENT1 en tumors de mama. Dels 33 tumors analitzats, 5 presentaven nivells molt baixos d'hENT1 i 4 eren deficientes en aquesta proteïna. Malgrat no van comparar els nivells d'expressió amb dades clíniques, els autors suggereixen que la deficiència d'hENT1 podria estar associada amb resistència a fàrmacs derivats de nucleòsids. En tumors ginecològics s'ha realitzat un estudi més ampli en analitzar, mitjançant un array de teixits, els nivells d'expressió de les proteïnes hENT1, hENT2 i hCNT1. Contràriament a l'estudi anterior, en aquest tipus de tumor la majoria de teixits retenien l'expressió d'hENT1 i hENT2. En canvi, entre un 15 i un 30%, en funció del tipus de tumor, eren deficientes en hCNT1. Addicionalment, la major pèrdua de hCNT1 es produïa en els tumors de pitjor prognosi (Farre et al., 2004).

Els estudis en tumors sòlids descrits fins ara únicament demostren l'elevat grau de variabilitat que existeix entre pacients, però en cap cas es mostra una correlació clínica entre la sensibilitat a un anàleg i l'expressió dels transportadors de nucleòsids. Fins al moment, l'únic treball que presenta aquest tipus de correlació ha estat realitzat per Spratling i col.laboradors (2004) en tumors de pàncrees. Els autors analitzen l'expressió d'hENT1 i de hCNT3 en mostres de 21 pacients amb tumor de pàncrees tractats amb gemcitabina. L'expressió de hENT1 correlaciona amb una major supervivència després del tractament amb gemcitabina, mentre que hCNT3 no mostra cap tipus de correlació.

Amb l'objectiu de determinar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a fludarabina es van analitzar en 56 mostres de pacients de leucèmia limfàtica

crònica (LLC) els nivells d'expressió d'ARNm dels transportadors responsables de la seva captació, hENT1, hENT2 i hCNT3. Els transportadors equilibratius no van mostrar cap tipus de relació, en canvi i sorprenentment, una major expressió de hCNT3 correlacionava amb un augment del risc de progressió de la malaltia. Addicionalment, aquests pacients tenien una resposta completa a la teràpia amb fludarabina menor. L'anàlisi de la localització de la proteïna va demostrar que aquesta no es trobava en la membrana, sinó que es localitzava en el citoplasma, per tant, no estaria implicada en la captació de la fludarabina a l'interior cel.lular (Mackey et al., 2005). Resultats similars s'han obtingut en el marc de la tesi doctoral d'Elena Guillén. En aquest cas, l'anàlisi de l'expressió de hCNT1 en noranta tumors de mama demostra que el marcatge és majoritàriament citoplasmàtic. A més, el percentatge de cèl.lules positives es correlaciona amb una menor supervivència a llarg termini, suggerint que hCNT1 seria indicatiu de mala prognosi.

La **taula 7** resumeix els estudis realitzats de correlacions clíniques entre l'expressió de transportadors de nucleòsids i la sensibilitat a anàlegs.

Transp.	Tècnica	Malaltia	Fàrmac	Correlació	Referència
hENT1	Unió NBTI	LMA, LLA	ara-C	+	Wiley, 1982
hENT1	Unió NBTI	LMA, LLA	ara-C, 2CdA, Fara-A	+	Gati, 1997
hENT1	SAENTA	LLA	ara-C	+	Wright, 2002
hENT1	mRNA	LMA	ara-C	+	Galmarini, 2002
hENT1	mRNA	LLA	ara-C	+	Stam, 2003
hENT1	anticòs	T. pàncreas	dFdC	+	Spratling, 2004
hENT1	mRNA	LLA	2CdA	no	Stam, 2003
hENT1	anticòs	HD		no	Reiman, 2002
hCNT3	anticòs	T. pàncrees	dFdC	no	Spratling, 2004
hCNT3	anticòs	LLC	Fara-A	-	Mackey, 2005
hCNT1	anticòs	T. mama	CMF	-	E. Guillén

Taula 7. Correlacions clíniques entre els transportadors de nucleòsids i la sensibilitat a anàlegs.

HD: malaltia de Hodgkin; ara-C: citarabina; 2-CdA: cladribina; Fara-A: fludarabina; dFdC: gemcitabina; CMF: teràpia combinada ciclofosfamida-metrotexat-5fluorouracil.

+: correlació positiva; -: correlació negativa; no: no s'ha trobat cap tipus de correlació

L'anàlisi de la taula permetria concloure que existeix una correlació entre la sensibilitat a citarabina i l'expressió del transportador ENT1 en LMA, ja que gairebé la meitat dels estudis han estat realitzats en aquest model i tots han donat una correlació positiva. Malgrat aquests resultats, la rellevància farmacològica de la sobreexpressió o deficiència de determinats tipus de transportadors de nucleòsids com a causa directa de sensibilitat o resistència no està del tot ben establerta. Això és degut, en part, a la dificultat intrínseca que suposa fer estudis de transport en mostres clíniques, a la possible i

previsible contribució i interrelació entre les diferents isoformes de transportadors i a les dificultats tècniques associades a la quantificació d'aquestes per contaminació dels clons neoplàsics amb teixit normal (Pastor-Anglada et al., 1998; Baldwin et al., 1999).

4. MALALTIES LIMFOPROLIFERATIVES

Tal com s'ha anat comentant al llarg d'aquesta introducció, els anàlegs de nucleòsids s'utilitzen àmpliament en el tractament de les malalties limfoproliferatives i de tumors sòlids. Malgrat que en la realització d'aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat algun model de tumor sòlid, el principal objectiu ha estat l'estudi dels transportadors de nucleòsids en les malalties limfoproliferatives, en concret en la leucèmia limfàtica crònica i en el limfoma de mantell. Per aquest motiu, en aquest capítol s'aprofundeix únicament en les característiques d'aquestes dues malalties.

El sistema immunitari és un conjunt complex de teixits i tipus cel·lulars. Les cèl·lules que el formen, malgrat tenir un aspecte morfològic molt diferent, tenen un origen comú en una cèl·lula mare (*stem cell*) localitzada en la medul·la òssia, a partir de la qual la diferenciació donarà lloc als diferents tipus cel·lulars. El gran nombre de cèl·lules existents i els diferents graus de diferenciació, conjuntament amb la seva localització en diferents òrgans, fa que les malalties limfoproliferatives constitueixin un grup complex. El terme **leucèmia** inclou una sèrie de trastorns que, si bé presenten una evolució i pronòstic diferents, es caracteritzen per la proliferació maligna de cèl·lules hematopoietiques que produeixen la disminució de les cèl·lules sanguínies normals de les tres sèries i la infiltració d'òrgans per cèl·lules atípiques. Així, s'acumulen en la medul·la òssia, n'ocupen l'espai sencer i substitueixen els elements cel·lulars normals, de manera que l'hematopoiesi s'altera globalment. Igualment, les cèl·lules tumorals poden envair altres òrgans hematològics i en darrer terme òrgans no hematològics.

Les leucèmies es classifiquen segons l'evolució que presenten i el tipus de cèl·lula responsable de la proliferació exagerada. Pel que fa a l'evolució es poden dividir en aguda i crònica. La leucèmia aguda es caracteritza per una proliferació sobtada i intensa de cèl·lules poc madures de tipus blàstic. Sense tractament, sol ocasionar alteracions i complicacions tant greus que provoquen la mort de la persona afectada a curt termini. Per contra, la leucèmia crònica es caracteritza per una proliferació lenta de leucòcits més diferenciats o madurs. La classificació en funció del tipus de cèl·lula que augmenta és més complexa, ja que pot proliferar de manera atípica qualsevol tipus cel·lular o bé qualsevol dels precursors. Tanmateix, és possible d'establir-ne bàsicament dos tipus: la leucèmia d'origen medul·lar, que correspon a la proliferació de cèl·lules procedents de la medul·la òssia, i la d'origen limfoide, on les cèl·lules implicades provenen del teixit limfoide o dels ganglis limfàtics (Gonzalo, 1999).

Els **limfomes** són un grup heterogeni de tumors malignes originats en el teixit limfoide, que es caracteritzen per l'expansió clonal d'una línia o sublínia limfoide alterada per mecanismes que produeixen la transformació neoplàsica d'aquestes cèl·lules. La

classificació dels limfomes es basa fonamentalment en la natura de la cèl.lula proliferant. D'aquesta manera es classifiquen en tres grans grups que inclouen els limfomes derivats de limfòcits B, de limfòcits T i un grup particular englobat sota el concepte de limfoma de Hodgkin. Malgrat hem separat els conceptes leucèmia i limfoma, una classificació més detallada inclou conjuntament processos leucèmics i limfomes, ja que gran nombre de processos limfoproliferatius poden presentar-se en forma leucèmica, de limfoma o ambdues segons el moment de l'evolució (Gonzalo, 1999).

En la **taula 8** es detallen els principals tipus de **limfomes de cèl.lules B**, així com el percentatge d'incidència respecte al total de limfomes no-Hodgkin (Chan et al., 2001). Les cèl.lules que proliferen de manera descontrolada en cada tipus de limfoma provenen de diferents zones dels fol.licles secundaris, el que determinarà el tipus de limfoma resultant (**Figura 10**). Alhora, els limfomes, de manera similar a la majoria de càncers, presenten lesions genètiques que inclouen l'activació de proto-oncogens i la disrupció de gens supressors de tumors, principalment produïdes per translocacions cromosòmiques (Capello et al, 2000).

Limfoma difós de cèl.lules grans B	31%
Limfoma fol.licular	22%
Leucèmia limfàtica crònica B/ limfoma limfocític de cèl.lula petita	6%
Limfoma de mantell	6%
Limfoma B de la zona marginal extranodal de tipus MALT	5%

Taula 8. Tipus més comuns de limfoma no-Hodgkin de cèl.lules B

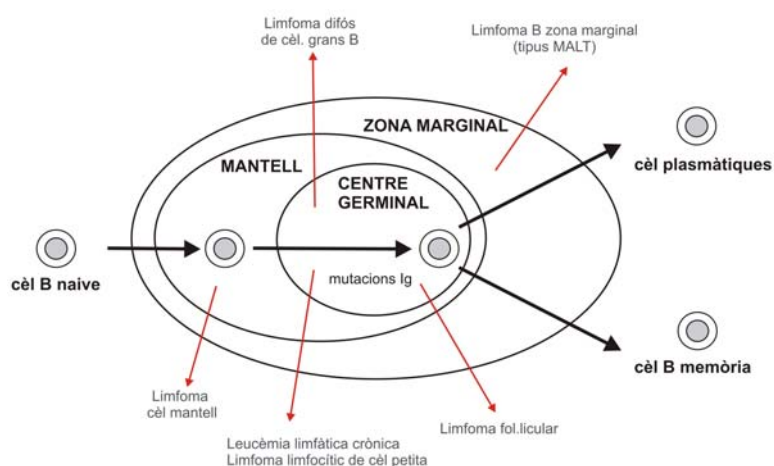


Figura 10. Origen dels diferents tipus de limfomes de cèl.lules B. Adaptada de Capello et al., 2000

4.1. Leucèmia limfàtica crònica de cèl.lules B

La leucèmia limfàtica crònica de cèl.lules B (LLC) va ser caracteritzada per primera vegada l'any 1966 com una malaltia on es dona un augment progressiu del nombre de limfòcits B monoclonals, de mida petita, funcionalment inerts, amb baixa capacitat de multiplicació i una vida mitjana llarga. Aquesta acumulació es troba en sang perifèrica, en la medul.la òssia i en els ganglis limfàtics (Galton et al., 1966). Es tracta d'una malaltia comú en els països desenvolupats, on representa el 30% de totes les leucèmies i el 75% de les cròniques, que es manifesta majoritàriament en individus d'edat mitjana o avançada, essent els 65 anys l'edat mitjana de diagnosi (Rozman and Montserrat, 1995). Presenta un curs clínic variable, ja que mentre alguns pacients sobreviuen durant dècades sense necessitat de tractament, d'altres presenten una malaltia resistent als fàrmacs i moren al cap d'un o dos anys.

4.1.1. Característiques de les cèl.lules de LLC

La morfologia de les cèl.lules B de LLC és característica, ja que tot i tenir una aparença madura són de mida petita i tenen la cromatina nuclear condensada i separada per franges cromàtiques més clares. A més, presenten una elevada relació nucli/citoplasma, ja que la majoria del volum cel.lular està ocupat pel nucli. Són cèl.lules de tipus B1, a diferència de les normals de tipus B2, que es troben aturades en fase G₀ del cicle cel.lular i que responen dèbilment a estímuls mitogènics (Rozman and Montserrat, 1995). Per tant, aquesta malaltia no és caracteritzada per un excés de proliferació, com la majoria de tumors, sinó que en aquest cas hi ha un defecte en l'apoptosi (Kipps et al., 2000).

Es tracta d'un desordre limfoproliferatiu bastant característic ja que les cèl.lules presenten paràmetres immunofenotípics peculiars. La població monoclonal de cèl.lules B de LLC expressa en la seva superfície CD5, CD19, CD23 i baixos nivells de CD79b (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997). El darrer correspon a un fenotip de limfòcits B madurs i activats, mentre que l'antigen CD5 és característic de les cèl.lules T. Una altra propietat de les cèl.lules de LLC, que s'utilitza pel seu diagnòstic, és que presenten una baixa densitat d'immunoglobulines de superfície IgM i/o IgD, constituïdes per un sol tipus de cadena pesada i un tipus de cadena lleugera, el que indica la seva monoclonalitat (Rozman and Montserrat, 1995).

El fet que les cèl.lules de LLC expressin CD5 va fer pensar que el seu origen podria ser el mateix que el de les cèl.lules CD5⁺ que es produeixen en els primers estadis del desenvolupament embrionari. Tot i això, anàlisis de microarrays de diferents tipus cel.lulars han determinat que les cèl.lules de LLC són més similars a les cèl.lules B de memòria que a les cèl.lules CD5⁺ (Alizadeh et al., 2000; Klein et al., 2001). No obstant, l'origen de les cèl.lules B de LLC encara no està clar.

4.1.2. Classificació dels estadis de LLC i pronòstic

Tal com s'ha comentat prèviament, existeixen pacients amb una progressió lenta de la malaltia i d'altres que, tot i tractar-se d'una leucèmia crònica, presenten una ràpida evolució. Amb l'objectiu de diferenciar el grau de la malaltia s'utilitzen dos criteris, el de Rai (Rai et al., 1975) i el de Binet (Binet et al., 1981), que defineixen diferents estadis en base a una sèrie de criteris clínics i de diagnòstic. El sistema Rai classifica la malaltia en 5 estadis (0-IV) mentre que Binet ho fa en 3 (A-C). El paper principal d'aquests sistemes és ajudar als metges a decidir quan s'hauria de començar la teràpia, ja que, en general, es considera que els pacients amb un estadi de Binet C o de Rai III i IV requereixen tractament. El problema està en què aquestes aproximacions no són tan útils com indicadors de pronòstic a llarg termini perquè no prediuen l'evolució clínica del pacient amb precisió. Per tant, malgrat es sap que existeixen malalties de ràpida evolució els metges no poden determinar-ho per tal d'iniciar el tractament abans, sinó que han d'esperar a que els pacients arribin a un estadi de Binet o de Rai avançat (Chiorazzi et al., 2005).

Per aquest motiu, actualment els estudis es centren en la determinació de nous factors de pronòstic. Un d'aquests és l'anàlisi de l'estat mutacional de les immunoglobulines (IgV_H), ja que s'ha demostrat que aquells pacients que presenten un nivell mutacional més alt tenen una supervivència mitjana menor. El problema és que es tracta d'una tècnica complexa i cara, pel que els esforços van dirigits cap la recerca de marcadors que es correlacionin amb aquest estat mutacional. Tot i que inicialment es creia que aquest marcador podria ser CD38, resultats més recents apunten cap a ZAP-70 (Chen et al., 2002).

4.1.3. Genètica de la LLC

Els limfomes de cèl.lules B són causats freqüentment per translocacions cromosòmiques que afecten a oncogens. La LLC, per la seva banda, és un cas especial ja que les translocacions cromosòmiques no són molt comuns i no s'han identificat mutacions habituals. Tot i això, la natura monoclonal del limfòcit B que prolifera en aquesta malaltia implica que han d'existir lesions en el clon progenitor.

Les lesions citogenètiques no són molt freqüents en el començament de la malaltia i, per tant, no serien els factors inductors, tanmateix, algunes anormalitats apareixen durant la proliferació de la malaltia. La més comú és la deleció 13q14.3, que es dona en aproximadament un 50% dels casos (Dohner et al., 2000). En la **taula 9** es mostren les principals alteracions cromosòmiques i mutacions detectades, així com la seva incidència.

Alteració	Incidència	Efecte
Delecions 13q14	~50%	Inactivació d'un possible gen supressor de tumors
Trisomia 12	~35%	Possible protooncogen
Delecions 11q22	~20%	Inactivació d'un possible gen supressor de tumors
Alteracions 17p	~5%	Inactivació de p53
Translocacions 18q21	~1-4%	Activació de Bcl-2

Taula 9. Alteracions citogenètiques més freqüents en LLC (modificat de Reed, 1998; Stankovic et al., 1999)

Malgrat que el gen p53 és el més mutat en diferents tipus de tumors, en la LLC només s'han detectat mutacions en un 10% dels casos. En general, aquestes mutacions estan associades a resistència a la quimioteràpia, a un estat més avançat de la malaltia o a la transformació a una malaltia més agressiva, el síndrome de Richter (Fenaux et al., 1992; Newcomb, 1995).

La translocació t(14;18)(q32;q21) provoca la deslocalització del gen bcl-2 posant-lo sota control de potenciadors presents en els promotors de les immunoglobulines (Tsujiimoto et al., 1984a; 1984b). Malgrat que aproximadament un 70% dels pacients presenten nivells alts de la proteïna Bcl-2, no pot ser conseqüència de la translocació, ja que aquesta té una baixa incidència (1-4%). Una hipòtesi que explica aquesta sobreexpressió suggereix que aquesta podria ser deguda a la hipometilació del locus de Bcl-2 (Hanada et al., 1993).

4.1.4. Tractament de la LLC

Degut a que els pacients amb LLC són generalment d'edat avançada i que la progressió de la malaltia és lenta, es sol tractar d'una manera conservadora, amb l'objectiu d'alentir la seva progressió i d'alleujar els símptomes. El protocols de teràpia acceptats indiquen que no s'ha d'administrar tractament en els pacients amb uns baixos estadis de la malaltia a no ser que hi hagi una progressió d'aquesta o la presència de símptomes evidents, com febre, pèrdua de pes o fatiga pronunciada. Així doncs, el tractament s'inicia quan s'evidencia un increment de les masses limfàtiques, pèrdua progressiva dels nivells d'hemoglobina o plaquetes, adenopatia severa, esplenomegàlia, trombocitopènia i/o anèmia severes, augment en el recompte absolut de limfòcits en sang ($>150-200 \times 10^9$ cèl.lules/litre) o recomptes inferiors acompanyats d'una alta taxa de duplicació, infiltració medullar difusa o complicacions autoimmunes (Cheson et al., 1996; Montserrat, 1997).

Anteriorment, el tractament amb clorambucil amb o sense esteroids, com la prednisona, eren la teràpia més acceptada per pacients amb LLC. Actualment, però, els tractaments inclouen també anàlegs de purina i anticossos monoclonals i fins i tot trasplantaments de medulla òssia. En la **taula 10** s'indiquen els principals fàrmacs utilitzats, sols o en combinació, en la teràpia de la LLC.

Tipus de fàrmac	Fàrmac
Glucocorticoid	Prednisona
Agent alquilant	Clorambucil, ciclofosfamida, melfalan
Anàleg de purina	Fludarabina, cladribina, pentostatina
Inhibidor topoisomerasa II	Doxorrubicina, mitoxantrona
Anticòs monoclonal	Rituximab, Campath-1H
Inhibidor del fus mitòtic	Vincristina

Taula 10. Principals fàrmacs utilitzats en el tractament de la LLC

Malgrat que durant dècades el tractament amb clorambucil, sol o amb prednisona, ha estat el més utilitzat en la teràpia de la LLC, diferents estudis han intentat trobar teràpies més eficients (Byrd et al., 1998). Així, per exemple, la comparació amb altres tractaments combinats, com ciclofosfamida-vincristina-prednisona (COP) o ciclofosfamida-doxorrubicina-vincristina-prednisona (CHOP), han donat generalment una supervivència similar en tots els casos (Raphael et al., 1991). Tot i que alguns d'aquests tractaments eren eficaços, el principal problema era que no existia una teràpia alternativa per aquells pacients resistents als agents alquilants. En les darreres dues dècades, però, els anàlegs de purina, fludarabina, cladribina i pentostatina, han aparegut com un nou grup de fàrmacs en el tractament de la LLC i actualment s'han convertit en la opció més habitual (Robak and Kasznicki, 2002).

La fludarabina i la cladribina s'han convertit en la principal teràpia de segona línia per aquells pacients que recauen o no responen al tractament amb agents alquilants (Cao et al., 2003). Addicionalment, també tenen altes taxes d'efectivitat quan s'utilitzen com a tractament de primera línia. De fet, diversos estudis en fase II i fase III han demostrat que els anàlegs de nucleòsids són més efectius que els agents alquilants (Robak et al., 2002), el problema és que en molts casos poden aparèixer resistències. No obstant, dades recents indiquen que l'administració dels anàlegs de purina en combinació amb altres agents quimioterapèutics i/o anticossos monoclonals produeix millors respostes, incloent-hi millor resposta completa, que la monoteràpia amb anàlegs o amb agents alquilants (Hallek et al., 2001). D'aquestes, la combinació més estudiada ha estat fludarabina o cladribina amb ciclofosfamida i mitoxantrona, tot i que estudis recents apunten cap a la combinació d'anàlegs amb anticossos monoclonals (Bosch et al., 2002; Savage et al., 2003).

Els anticossos monoclonals desenvolupats en els darrers anys són una nova opció terapèutica que pot millorar de manera significativa el tractament de la LLC. El fet que les cèl.lules de LLC expressin antígens característics en la seva membrana fa que aquests siguin dianes ideals per les teràpies amb anticossos monoclonals, el que permet una major especificitat i selectivitat. L'anticòs dirigit contra l'antigen CD52, Alemtuzumab (Campath-1H), és el que major eficàcia ha mostrat en el tractament de la LLC. De fet, és actiu tant en pacients que han fracassat en altres teràpies com en la teràpia de primera línia (Robak et al., 2004). A més, tal com s'ha comentat prèviament, sembla efectiu en combinació amb

anàlegs de nucleòsids, ja que aquests dos tipus de fàrmacs tenen mecanismes d'acció totalment diferents i, per tant, no hi ha resistències creuades. D'altra banda, l'anticòs dirigit contra l'antigen CD20, Rituximab (Rituxan), també sembla efectiu en el tractament de la LLC i el LLS (limfoma limfocític de cèl.lules petites) tant en monoteràpia com en combinació. Tanmateix, el percentatge de resposta total és molt menor a l'aconseguit en el limfoma fol.licular (McLaughlin et al., 1998), possiblement degut a la menor densitat de CD20 de les cèl.lules de LLC i LLS.

4.2. Limfoma de cèl.lules de mantell

El limfoma de cèl.lules de mantell (LCM) és produït per una proliferació neoplàsica de limfòcits B de la zona del mantell dels fol.licles limfàtics. L'edat mitjana de presentació és de 65 anys, amb un lleuger predomini masculí. La incidència de la malaltia és d'uns 2 ó 3 casos per 100.000 persones cada any, el que suposa aproximadament un 6% dels limfomes no-Hodgkin d'Europa i Estats Units. Es tracta d'una malaltia amb un curs clínic agressiu i baixa resposta a la teràpia convencional, el que fa que se la consideri incurable. En conseqüència, el LCM es caracteritza per un pobre pronòstic amb una mitjana de supervivència de només 3 anys i un 10-15% de supervivents a llarg termini. En contrast amb altres subtipus de limfomes, la seva etiologia i patogènesi molecular encara no es coneixen (Lenz et al., 2004).

4.2.1. Característiques del LCM

El LCM es caracteritza per una proliferació atípica d'una població monoclonal de cèl.lules B madures que expressen CD19, CD20, CD22 i CD79a i presenten nivells moderats o alts d'immunoglobulines IgM i/o IgD a la superfície. Una característica única entre els limfomes non-Hodgkin és que expressen de manera més freqüent cadenes d'Ig lleugeres lambda que cadenes kappa. Similarment a la LLC, les cèl.lules de LCM expressen CD5, CD43 i no CD10, però a diferència d'aquestes són CD23-negatives. Addicionalment, el LCM es caracteritza per una sobre-expressió de ciclina D1 degut a la translocació t(11;14)(q13;q32), tal i com es detallarà posteriorment (Bertoni et al., 2004).

La nova classificació de l'Organització Mundial de la Salut divideix el LCM en dos subtipus morfològics, el LCM típic i la variant blastoid. El LCM típic es caracteritza per una proliferació monòtona de limfòcits de mida petita o mitjana, amb un nucli irregular, la cromatina condensada, els nucleols poc visibles i escàs citoplasma. D'altra banda, en la variant blastoid les cèl.lules són limfòcits de mida mitjana, semblants als limfoblasts, escàs citoplasma, un nucli esfèric amb la cromatina finament dispersada i els nucleols poc visibles. La taxa de mitosi és baixa en la variant típica i alta en la blastoid, el que fa que la segona presenti un pitjor pronòstic, amb una supervivència menor de dos anys. Generalment s'assumeix que la forma blastoid representa una transformació del LCM clàssic (Bertoni et al., 2004; Campo, 2003).

Histològicament el LCM pot presentar tres patrons que representen els diferents graus d'infiltració del nòdul limfàtic i, per tant, són indicatius de l'estadi de la malaltia. En la lesió primerenca hi ha una infiltració de la zona de mantell envoltant els centres germinals

normals. A continuació, apareix un patró nodular, semblant als pseudofol·licles, que pot ser considerat una infiltració més extensiva i, finalment, el darrer nivell és un patró difús que mostra la pèrdua dels centres germinals degut a la infiltració de les cèl·lules neoplàsiques (Bertoni et al., 2004). La majoria dels casos de LCM es diagnostiquen en estadis avançats de la malaltia (III o IV) amb freqüent afectació extraganglional, com la medul·la òssia (>80%), afectació gastrointestinal (poliposi limfomatoide) (25%) o de l'anell de Waldeyer (20-30%) (Gonzalo, 1999).

4.2.2. Genètica del LCM

Estudis del cariotip de les cèl·lules de LCM mostren que la translocació t(11;14)(q13;q32) és la principal característica d'aquesta malaltia, tot i que també pot presentar altres aberracions cromosòmiques. Com a conseqüència de la translocació el gen de la ciclina D1, situat en 11q13, es juxtaposa en la regió "Joining" (J) de la IgH, en 14q32. Aquest canvi produeix una desregulació de l'expressió de la ciclina D1, ja que aquesta passa a estar controlada pels forts factors de transcripció de la IgH de les cèl·lules B (Bertoni et al., 2004). Malgrat que la sobreexpressió de la ciclina D1 és característica en tots el LCM, aquesta per si sola no és suficient per mantenir les cèl·lules en cicle. De fet, ratolins transgènics que sobre-expressen ciclina D1 en les seves cèl·lules B no presenten una major incidència del limfoma (Adams et al., 1999). Així doncs, addicionalment a la desregulació de la ciclina D1 calen defectes en altres molècules reguladores que contribuiran a la patogènesi del limfoma. Diversos estudis demostren que la variant blastoid es caracteritza per un major nombre de defectes genètics, el que explicaria l'índex mitòtic més elevat i la pitjor prognosi en comparació amb la variant clàssica. Pinyol i col·laboradors (1998) van trobar una pèrdua de l'expressió de p16 en un 43% de les variants blastoids analitzades i només en un 5% de les clàssiques. En concordança, la inactivació de p53 produïda per delecions o mutacions és més freqüent en la variant blastoid que en la clàssica (Greiner et al., 1996). Similarment al LCM, la translocació t(11;14) ha estat identificada en un 5-10% dels casos de LLC, en un 20% de les leucèmies prolimfocítiques i un nombre de malalties limfoproliferatives de difícil classificació (Campo, 2003).

D'altra banda, entre un 20 i un 40% dels casos de LCM mostren una deleción del cromosoma 11q22-23. Una deleción similar es pot trobar en la LLC, ja que aquestes malalties presenten algunes anormalitats genètiques similars (Monni et al., 1998; 1999). Aquesta alteració afecta al gen de l'ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) que codifica per una proteïna que fosforila p53 en resposta al dany en l'ADN, promovent, per tant, l'arrest del cicle cel·lular i l'apoptosi (Banin et al., 1998). S'han descrit altres alteracions cromosòmiques que poden afectar a gens del cicle cel·lular o de l'apoptosi, però les incidències són menors (Bertoni et al., 2004).

4.1.3. Tractament del LCM

Els pocs casos de LCM que es detecten en estadis I ó II es tracten normalment amb radiació amb radioquimioteràpia seqüencial. Per contra, aquest tractament no és útil en estadis més avançats, de fet, en aquest cas les respostes als tractaments

convencionals són en la seva majoria parcials, amb una mitjana de supervivència de 3 anys. La teràpia estàndard que s'administra és la combinació ciclosfosfamida-doxorubicina-vincristina-prednisona (CHOP), tot i que en diversos estudis no ha demostrat tenir una major resposta comparat amb altres teràpies (Lenz et al., 2004). Alguns resultats encoratjadors s'han aconseguit amb elevades dosis de citarabina (Romaguera et al., 2000) i també han demostrat majors nivells de remissió teràpies amb els anàlegs de purina fludarabina i cladribina, sobretot quan es combinen amb agents alquilants o antraciclins (Cohen et al., 2001; Decaudin et al., 1998). Per contra, recentment Ferrer i col.laboradors han demostrat que són necessàries dosis molt altes de fludarabina per aconseguir un mínim efecte en cèl.lules de LCM *ex vivo* (Ferrer et al., 2004). Un altre anàleg de nucleòsid analitzat ha estat la gemcitabina, que ha aconseguit remarcables respostes en combinació amb cis-platí i dexametasona. El problema, com en la majoria de casos, és que la duració de la resposta era curta (Chau et al., 2003). Altres teràpies utilitzen interferó- α o l'anticòs monoclonal rituximab sols o en combinació amb altres fàrmacs (Lenz et al., 2004). Tanmateix, l'agressivitat clínica i la incurabilitat d'aquest tipus de limfoma amb els esquemes habituals requereix la valoració d'estratègies terapèutiques més agressives, com el trasplantament autòleg o alogènic de progenitors hematopoiètics, especialment en els pacients més joves. Addicionalment, algunes de les noves teràpies analitzades actualment es basen en la utilització del flavopiridol, un inhibidor específic del complex CDK4-ciclina D1, o de l'inhibidor del proteasoma Bortezomib (PS-341) (Kouroukis et al., 2003; O'Connor et al., 2004).