
RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN CÈL·LULES DEL SISTEMA IMMUNITARI

Les cèl·lules del sistema immunitari comprenen una família àmplia i heterogènia de tipus cel·lulars amb funcions altament especialitzades, que poden activar-se o proliferar en funció dels seus requeriments funcionals. Alhora, el fet que siguin dependents de les vies de recuperació de nucleòsids fa que se les consideri un bon model per a l'estudi de l'expressió i regulació dels transportadors de nucleòsids. El nostre grup d'investigació ha aportat diversos estudis al respecte, principalment en la caracterització i regulació de macròfags i de línies cel·lulars derivades de limfòcits B. Malgrat aquests tipus cel·lulars no són epitelials, expressen tant transportadors equilibratius com concentratius. Així, línies cel·lulars derivades de limfòcits B, com Raji, expressen majoritàriament el transportador ENT1, si bé també presenten una activitat concentrativa mitjançada per les isoformes CNT2 i N5 (Soler et al., 1998). Anàlogament els macròfags murins co-expressen transportadors equilibratius (ENT1 i ENT2) i concentratius (CNT1 i CNT2) (Soler et al., 2001a). Alhora, en ambdós models estímuls proliferatius o diferenciadors poden variar de manera diferencial els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes.

Tanmateix, en el moment de l'inici d'aquest treball la majoria d'estudis en cèl·lules del sistema immunitari s'havien centrat en l'anàlisi de l'expressió del transportador hENT1 (Smith et al., 1989; Wiley et al., 1989) i eren pocs els que havien estudiat l'expressió de les altres isoformes. De fet, no existien estudis que analitzessin alhora l'expressió de totes les isoformes dels transportadors de nucleòsids en aquests tipus cel·lulars. Aquesta caracterització és d'especial importància si tenim en compte que aquests transportadors són els responsables de la captació dels anàlegs de nucleòsids, utilitzats àmpliament en el tractament de leucèmies i limfomes. Per aquest motiu, ens vam plantejar com a principal objectiu d'aquest capítol l'anàlisi de l'expressió dels transportadors de nucleòsids presents en les cèl·lules del sistema immunitari, principalment limfòcits B i T.

Per a realitzar l'objectiu plantejat, vam posar a punt la PCR a temps real per a les cinc isoformes de transportadors de nucleòsids clonades en aquell moment (hENT1, hENT2, hCNT1, hCNT2 i hCNT3). Les seqüències dels *primers* i sondes utilitzats, així com els protocols de validació d'aquests, es detallen en l'apartat de Materials i Mètodes. Aquests experiments han estat realitzats en col·laboració amb la Dra. Dolors Colomer del Servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic.

Inicialment, vam analitzar el patró d'expressió dels diferents transportadors en cèl·lules mononucleades i en granulòcits. Les cèl·lules mononucleades estan constituïdes per diferents proporcions de limfòcits T, limfòcits B i monòcits, mentre que la mostra de granulòcits correspon a una població de neutròfils, eosinòfils i basòfils. Els resultats van mostrar que els diferents tipus cel·lulars analitzats expressaven de manera significativa hENT1, hENT2 i hCNT2 i en menor grau hCNT3 (**Taula 1**). En cap cas es va detectar l'expressió de hCNT1. Per tant, per a comprovar que els *primers* i les sondes dissenyats

per aquest transportador funcionaven correctament, vam avaluar l'expressió gènica de hCNT1 en ronyó i en una línia cel.lular derivada d'adenocarcinoma de colon, models en els que en la bibliografia s'havia descrit la presència d'aquest transportador.

	ENT1	ENT2	CNT1	CNT2	CNT3
Cèl. mononucleades	+++	++	-	+++	+
granulòcits	++	++	-	+++	+
SW480	+++	+++	+	+	-
ronyó	nd	nd	++	nd	++

Taula 1. Expressió dels transportadors de nucleòsids en leucòcits normals.

L'expressió dels 5 transportadors es va analitzar mitjançant PCR quantitativa a temps real. La línia cel.lular derivada de colon SW480 i l'ADNc de ronyó es van utilitzar com a control positiu de l'expressió de hCNT1. Els valors de C_T normalitzats s'han substituït per símbols que mostren el grau d'expressió: + baixa expressió ($r > 1.3$); ++ expressió moderada ($r = 1-1.3$); +++ expressió alta ($r < 1$); - no s'expressa; nd no s'ha determinat. On r correspon a la relació entre la C_T del transportador i la del control endogen β -glucuronidasa.

Els resultats obtinguts concordaven amb els pocs treballs presents en la literatura que indicaven que les cèl.lules del sistema immunitari expressaven tant les isoformes concentratives com les equilibratives (Lee et al., 1994; Soler et al., 1998; 2001b). Per tant, un cop comprovat que les eines generades funcionaven correctament, l'objectiu va ser analitzar el patró d'expressió dels limfòcits B amb més detall. De fet, el percentatge de limfòcits B en una població de cèl.lules mononucleades és molt baix, per tant, no sabem amb exactitud si les dades obtingudes reflecteixen el patró d'expressió dels limfòcits B. Això, alhora, suposa un problema afegit, ja que és necessària una gran quantitat de cèl.lules mononucleades per aïllar els limfòcits B requerits per a l'obtenció de l'ADNc. En conseqüència, es va utilitzar com a model els ARN de 6 línies cel.lulars derivades de diferents tipus de leucèmies o limfomes de cèl.lules B. Alhora, i amb finalitats comparatives, es va avaluar també una línia derivada de cèl.lules T i una de mielocítica. En la **taula 2** s'indica l'origen de les línies cel.lulars utilitzades.

Línia cel.lular	Origen
JVM-2	Leucèmia pro-limfocítica de cèl. B
Granta-519	Limfoma de mantell
NCEB	Limfoma de mantell
DOHH-2	Limfoma fol.licular
Raji	Limfoma de Burkit
DAUDI	Limfoma de Burkit
NB4	Leucèmia pro-mielocítica aguda
Jurkat	Leucèmia limfoblàstica aguda (cèl. T)

Taula 2. Origen de les línies cel.lulars analitzades

Els resultats obtinguts en la determinació dels nivells d'expressió de les diferents agències de transport de nucleòsids es mostren com a quantificació relativa, seguint el procediment detallat en l'apartat de Materials i Mètodes, on el valor d'1 d'expressió s'ha donat de manera arbitrària a la línia cel.lular JVM-2 (**Figura 1**).

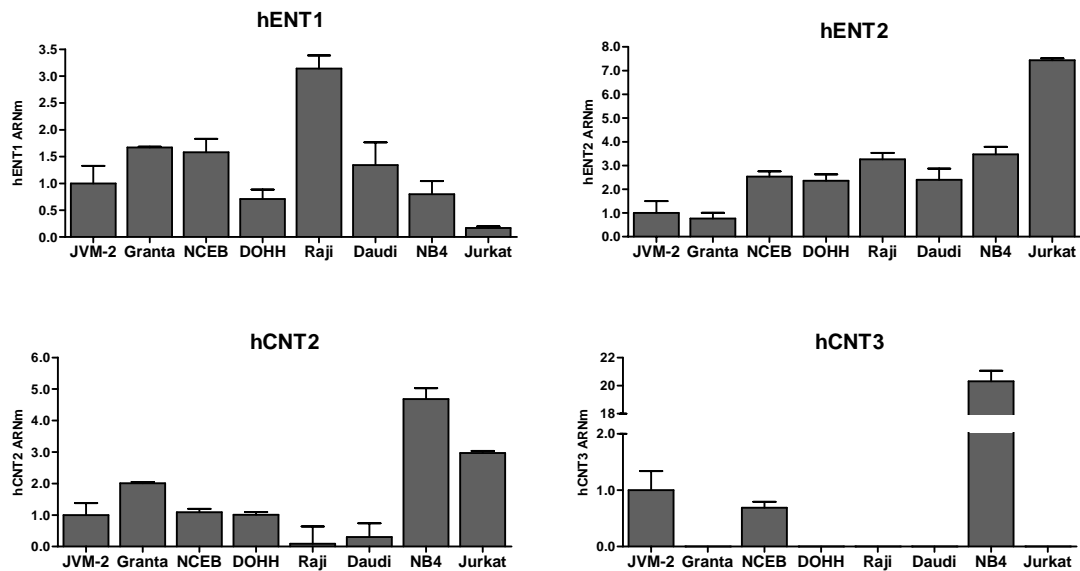


Figura 1. Patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en línies cel.lulars derivades de limfòcits B. En l'anàlisi s'ha inclòs també una línia derivada de cèl.lules T (Jurkat) i una mielocítica (NB4). Els valors de C_T obtinguts per a cada transportador han estat normalitzats respecte al control endogen (β -glucuronidasa). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant la línia JVM-2 com a control de referència.

Anàlogament als resultats obtinguts en les cèl.lules mononucleades, les línies cel.lulars analitzades expressen els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 i la isoforma concentrativa hCNT2 i en cap cas es detecta l'expressió del transportador hCNT1. D'altra banda, només s'observa expressió de hCNT3 en tres línies cel.lulars, essent la línia derivada de leucèmia pro-mielocítica aguda, NB4, la que majors nivells d'ARNm presenta. Degut a les característiques de la tècnica i al tipus d'aproximació que s'ha utilitzat (quantificació relativa), ens és impossible comparar els nivells d'expressió entre els diferents gens, pel que no es pot determinar quina és la isoforma més expressada. Tot i això, els valors de C_T dels transportadors equilibratius són de l'ordre de 20-25 mentre que els dels concentratius són majors de 30. Aquesta diferència considerable en els valors de C_T ens permet postular que els nivells d'ARNm dels transportadors equilibratius serien en general més elevats que els dels concentratius.

En comparació amb les cèl.lules mononucleades observem que cinc de les vuit línies cel.lulars han perdut l'expressió del transportador hCNT3. En aquest sentit, en alguns casos s'ha descrit que les línies cel.lulars poden perdre l'expressió d'algun transportador de la família SLC28 en comparació amb el teixit d'origen (Dragan et al., 2000; Garcia-Manteiga et al., 2003). Tanmateix, si tenim en compte que les línies analitzades provenen de leucèmies o limfomes, la deficiència de hCNT3 concordaria amb altres

estudis que apunten que diferents tipus de tumors poden perdre selectivament l'expressió d'alguna de les isoformes (Dragan et al., 2000, Farre et al., 2004).

D'altra banda, si bé en cap cas es perd l'expressió de hCNT2 aquest és el que major variabilitat presenta. De fet, les línies cel.lulars Raji i Daudi, que són les que mostren nivells més baixos, deriven de limfoma de Burkitt, que es caracteritza per la proliferació de cèl.lules limfoides molt immadures. Aquests resultats concorden amb dades obtingudes en altres teixits, com fetge, en què s'ha demostrat que les cèl.lules poc diferenciades tenen una menor expressió dels sistemes concentratius, essent els equilibratius els predominants (del Santo et al., 1998; Fernandez-Veledo et al., 2004). Per altra banda, la comparació dels valors d'expressió obtinguts per hCNT2 amb els de les cèl.lules mononucleades posa en evidència que aquestes presenten uns nivells d'expressió uns 500 cops majors que les línies cel.lulars. Això pot ser degut a dos motius, el primer, i més probable, és que els nivells d'expressió dels transportadors concentratius d'un teixit són generalment majors que els de les línies cel.lulars que se'n deriven, en concordança amb els estudis comentats anteriorment (Dragan et al., 2000; Fernandez-Veledo et al., 2004). La segona hipòtesi és que l'expressió de CNT2 en limfòcits T, components majoritaris de les cèl.lules mononucleades, sigui molt major que la dels limfòcits B. Per comprovar aquesta hipòtesi, i alhora analitzar el patró d'expressió gènica dels 5 transportadors de nucleòsids, es van estudiar 6 línies cel.lulars derivades de limfòcits T, incloent-hi la línia ja mostrada Jurkat (**Figura 2**). Els experiments amb limfòcits T que es detallen a continuació s'han fet en col.laboració amb el Dr. Javier Martínez-Picado de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

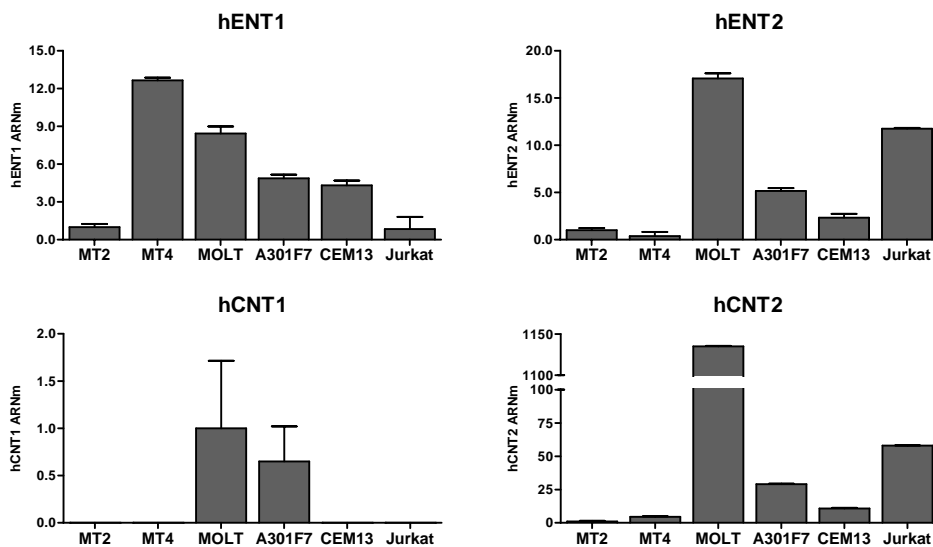


Figura 2. Patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en línies cel.lulars derivades de limfòcits T. Els valors de C_T obtinguts per a cada transportador han estat normalitzats respecte al control endogen (β -glucuronidasa). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant la línia MT2 com a control de referència, excepte en el cas de hCNT1 on el control ha estat la línia Molt-4.

L'anàlisi dels resultats obtinguts mostra que, anàlogament als limfòcits B, totes les línies cel·lulars expressen hENT1, hENT2 i hCNT2. Sorprenentment, les línies Molt-4 i A301F7 expressen també hCNT1. Addicionalment, tot i que no es mostra en la figura, l'expressió de hCNT3 només es detecta en la línia MT4 i aquesta es troba en uns nivells molt baixos, gairebé en el límit de detecció de la tècnica. Per altra banda, i a diferència dels limfòcits B, existeix una major variabilitat entre les diferents línies estudiades, principalment en el cas de hCNT2. Totes les línies expressen el transportador concentratiu purino-preferent, fins i tot MT2 que degut a l'escala de la gràfica sembla que no l'expressi, si bé la línia Molt-4 presenta uns nivells molt més elevats que les demés, amb valors similars a les cèl·lules mononucleades. Resultats obtinguts dins el marc de la tesi doctoral d'en Sergi Purcet han determinat que aquesta línia cel·lular presenta uns nivells elevats d'activitat concentrativa en els primers passatges del cultiu que es van perdent amb el temps. No podem descartar, doncs, que l'ARN s'hagi extret en aquestes condicions, el que explicaria els elevats nivells d'expressió que es detecten. D'altra banda, si no tenim en compte la línia Molt-4, el promig dels valors d'ARNm de hCNT2 de les línies de limfòcits B és similar als dels limfòcits T (17.9 ± 5 i 20.7 ± 10 , respectivament), el que evidencia que els nivells d'expressió de hCNT2 de les cèl·lules mononucleades és molt major que el de les línies cel·lulars. De manera equivalent, els valors d'hENT1 i d'hENT2 tampoc presenten diferències estadístiques.

En resum, les dades obtingudes fins el moment indiquen que les línies cel·lulars derivades de limfòcits B i T expressen els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 i el concentratiu hCNT2. El fet que en cap de les línies analitzades es perdi l'expressió de la isoforma purino-preferent hCNT2 podria indicar que aquesta és d'especial importància per aquest tipus cel·lular. En canvi, la majoria de línies cel·lulars perden l'expressió de l'altre transportador concentratiu, hCNT3.

Donat que el percentatge de limfòcits T dins d'una població de cèl·lules mononucleades és major que el de limfòcits B, en aquest cas ens vam proposar analitzar els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids en aquest tipus cel·lular. En base a aquest objectiu es van aïllar cèl·lules mononucleades de quatre donants sans i d'una fracció d'aquestes es van separar els limfòcits T CD4. Així doncs, l'anàlisi del patró d'expressió gènica dels diferents sistemes de transport es va realitzar en els dos tipus de poblacions, cèl·lules mononucleades i limfòcits T CD4 (**Figura 3**).

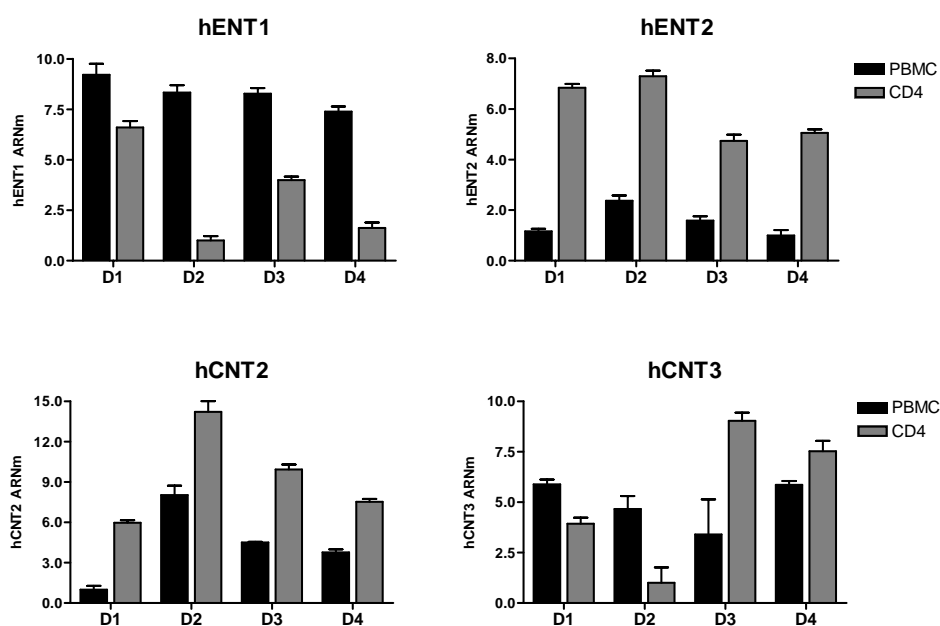


Figura 3. Patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl.lules mononucleades i limfòcits T CD4 de quatre donants sans. De cada donant (D1-4) s'han analitzat mitjançant PCR a temps real els nivells d'expressió dels cinc transportadors tant de les cèl.lules mononucleades (PBMC; *peripheral blood mononuclear cells*) com dels limfòcits T CD4 (CD4). Els nivells d'expressió de l'ARNm normalitzats respecte el control endogen (β -glucuronidasa) es donen com unitats arbitràries.

De manera equivalent a les cèl.lules mononucleades analitzades prèviament, s'observa l'expressió dels transportadors equilibratius i dels concentratius hCNT2 i hCNT3, però no de hCNT1. Alhora, els resultats obtinguts en permeten extreure diferents conclusions. D'una banda i en concordança amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de les línies cel.lulars, hCNT2 és el transportador que més variabilitat presenta en els nivells d'expressió. La resta de transportadors no mostren variació entre els quatre donants estudiats si s'analitza la població de cèl.lules mononucleades. Per contra, els limfòcits T CD4 presenten també una elevada variabilitat en la quantitat d'ARNm del transportador equilibratiu hENT1 i del concentratiu hCNT3. Diversos estudis han demostrat una variabilitat en els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids, tanmateix, aquestes anàlisis s'han realitzat generalment en cèl.lules tumorals, en les que el grau de diferenciació pot determinar el patró d'expressió, però aquest no s'havia descrit en cèl.lules normals (Mackey et al., 2002; Farre et al., 2004). Així doncs, malgrat el nombre de mostres analitzades és baix, els resultats obtinguts evidencien que existeix una elevada variabilitat en els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl.lules d'individus sans.

D'altra banda si es comparen els nivells d'ARNm de les cèl.lules mononucleades i dels limfòcits T CD4 de cada donant observem que en tots els casos les cèl.lules T presenten una major expressió d'hENT2 i de hCNT2 i nivells menors d'hENT1 que les cèl.lules mononucleades totals. Aquest fet reafirma que els nivells d'expressió dels diferents transportadors en els tipus cel.lulars que constitueixen la població de cèl.lules mononucleades no són equivalents. Així, per exemple, algun d'aquests tipus cel.lulars

tindrà menor expressió de hCNT2 que els limfòcits T CD4. Alhora, la baixa expressió d'hENT1 i alta de hCNT2 concorda amb el fet que la població de cèl.lules T CD4 està formada per cèl.lules altament diferenciades. Aquesta observació dona suport a la idea, que ja s'ha comentat anteriorment, de que les cèl.lules diferenciades tenen major expressió de transportadors concentratius.

Com a resum d'aquests darrers resultats, en la **figura 4** es mostren les mitjanes dels nivells d'expressió per a cada transportador de les cèl.lules mononucleades i dels limfòcits T dels 4 donants. S'observa que només són estadísticament significatives les diferències en els nivells d'hENT1 i d'hENT2. Això és degut a que hCNT2 és el que major variabilitat presenta, tal i com es pot veure per les barres d'error. Tot i això, analitzant cada donant per separat la major expressió de hCNT2 dels limfòcits T respecte a les cèl.lules mononucleades corresponent és evident.

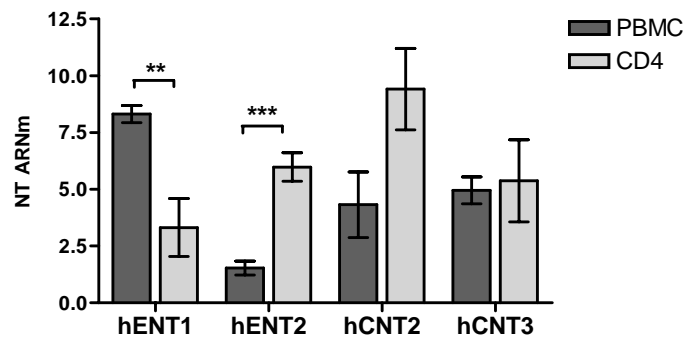


Figura 4. Mitjana dels nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl.lules mononucleades i limfòcits T CD4 de 4 donants sans. Els resultats són la mitjana \pm SE dels valors mostrats en la figura 3. La seva significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

A continuació vam decidir utilitzar aquest mateix model amb l'objectiu d'analitzar si la proliferació afectava els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids. En aquest sentit, tant les cèl.lules mononucleades com els limfòcits T CD4 es van incubar durant tres dies amb fitohematoglutininina (PHA). Anàlogament als experiments anteriors, es van analitzar els nivells d'expressió dels cinc transportadors de nucleòsids mitjançant PCR a temps real. Els canvis produïts es van comparar respecte a les cèl.lules control, que havien estat tres dies en cultiu sense estimulació (**Figura 5**).

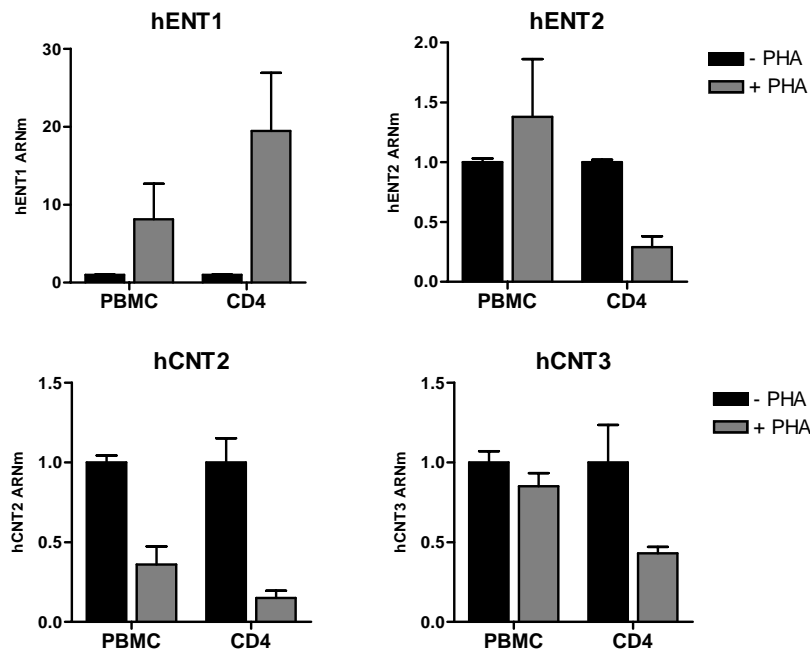


Figura 5. Efecte de la proliferació sobre l'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl.lules monucleades i limfòcits T CD4. Les cèl.lules es van incubar durant tres dies en presència de PHA (3 µg/ml). Posteriorment, es va analitzar per PCR a temps real els nivells d'expressió dels cinc transportadors de nucleòsids. Els resultats es mostren com unitats arbitràries, en les que el valor 1 s'ha donat al control (cèl.lules sense PHA). Els resultats són la mitjana ± SE de dos donants independents.

Analitzant únicament l'efecte de la proliferació en les cèl.lules T CD4 podem observar que aquesta produeix un clara inducció de l'expressió d'hENT1, acompanyada d'una disminució en els nivells de la resta de transportadors de nucleòsids, principalment de hCNT2. Les cèl.lules monucleades per la seva banda presenten un patró similar en el cas d'hENT1 i hCNT2. Tot i això, en aquest cas els resultats són el sumatori de l'efecte de la PHA en els diferents tipus cel·lulars que formen la població de cèl.lules monucleades pel que són de difícil interpretació.

En concordança amb els resultats obtinguts, Smith i col.laboradors el 1989 ja van descriure que el tractament de cèl.lules monucleades amb PHA produïa un increment de 30 cops dels llocs d'unió de NBTI, el que implica un major nombre de transportadors hENT1 en la membrana. Similarment, la inducció d'un cultiu primari de macròfags de ratolí amb MCSF incrementa tant l'ARNm com l'activitat d'hENT1. Per contra, en aquest model l'expressió d'hENT2 i dels transportadors concentratius no es veu afectada (Soler et al., 2001a). En la mateixa línia, cèl.lules altament proliferatives, com els hepatòcits fetals de rata, tenen una major activitat d'hENT1 que els hepatòcits adults (del Santo et al., 2001). Tanmateix, aquest tipus de regulació sembla dependent de l'estímul i del tipus cel·lular, ja que les cèl.lules derivades d'hepatoma de rata FAO augmenten els nivells d'ARNm de CNT2 quan són induïdes a proliferar mentre que els nivells d'hENT1 no varien (del Santo et al., 1998).

En darrer terme vam voler analitzar l'efecte oposat, la diferenciació. Degut a que les cèl.lules CD4 ja són altament diferenciades es va escollir un altre model, la línia cel.lular derivada d'un limfoma histiocític difós U937. Aquestes cèl.lules es poden diferenciar a monòcit mitjançant un tractament de 24 hores amb l'éster de forbol PMA. Els canvis en els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids com a conseqüència de la diferenciació es representen en la **figura 6**.

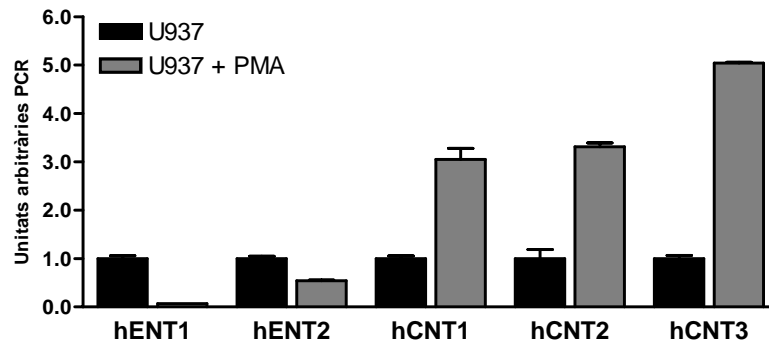


Figura 6. Efecte de la diferenciació sobre l'expressió dels transportadors de nucleòsids en línia cel.lular U937. Les cèl.lules es van incubar durant 24 hores en presència de PMA 25 nM i a continuació es va analitzar per PCR a temps real els nivells d'expressió dels cinc transportadors de nucleòsids. Els nivells d'expressió de l'ARNm, normalitzats respecte el control endogen (β -glucuronidasa), es donen com unitats arbitràries, on el valor d'1 correspon al control (cèl.lules sense PMA).

La diferenciació de les cèl.lules U937 produeix un efecte pràcticament oposat al de la proliferació dels limfòcits T CD4. S'observa una inducció dels transportadors concentratius, en aquest cas els tres ja que la línia cel.lular expressa també hCNT1, i una clara disminució de l'expressió d'hENT1, de més de 13 cops. Alhora, hi ha també una lleugera disminució d'hENT2. Les dades obtingudes concorden amb les descrites prèviament en la línia cel.lular HL-60, que presenta un origen similar a la línia U937, on la diferenciació amb PMA produïa un augment de l'activitat concentrativa i una disminució de l'equilibrativa (Lee et al., 1991; 1994). En aquells experiments, però, l'efecte s'havia descrit a nivell cinètic i no s'havien definit exactament les isoformes implicades. L'única isoforma caracteritzada havia estat hCNT3, ja que les cèl.lules HL-60 activades amb PMA es van utilitzar posteriorment com a model per a la clonació del transportador hCNT3 (Ritzel et al., 2001b). De fet, en el nostre model és la isoforma que més incrementa. L'augment dels transportadors concentratius com a conseqüència de la diferenciació cel.lular s'ha descrit en altres models com els macròfags, els limfòcits B o els hepatòcits (del Santo et al., 1998; Soler et al., 1998; 2001a).

En resum, els resultats presentats en aquest capítol demostren que les cèl.lules del sistema immunitari, en concret els limfòcits B i T, expressen hENT1, hENT2, hCNT2 i hCNT3, si bé, l'expressió del transportador hCNT3 es perd en la majoria de línies cel.lulars. Tanmateix, els nivells d'expressió d'aquests transportadors poden variar en funció del seu origen i principalment en funció del seu grau de proliferació i diferenciació.

2. PAPER DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN LA SENSIBILITAT A ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS EN MALALTIES LIMFOPROLIFERATIVES

Els anàlegs de nucleòsids, utilitzats àmpliament en el tractament de les malalties limfoproliferatives, són majoritàriament internalitzats en les cèl.lules a través dels transportadors de nucleòsids, per tant els tipus de transportadors expressats o els nivells d'expressió d'aquests podrien determinar casos de resistència o, en cas contrari, de major sensibilitat. De fet, diferents autors han demostrat una correlació entre l'anàleg de pirimidina citarabina i el transportador equilibratiu hENT1 en malalts de leucèmia mieloide aguda (AML) (Wiley et al., 1982; Galmarini et al., 2002c). Tanmateix, la majoria d'estudis realitzats fins al moment s'han centrat en aquest tipus de leucèmia i el nombre de treballs que analitzen l'expressió dels transportadors de nucleòsids i el seu paper en la sensibilitat d'altres tumors és reduït.

Els resultats mostrats en el capítol anterior evidencien una variabilitat en els nivells d'expressió de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids entre individus. Alhora, diversos estudis han demostrat que en les cèl.lules tumorals pot existir també una elevada variabilitat i, fins i tot, casos de deficiències en alguna de les entitats. Així, en un model d'hepatocarcinogènesi induïda es perd selectivament l'expressió del transportador rCNT1 (Dragan et al., 2000). En concordança, en tumors ginecològics s'observa en alguns casos la pèrdua de hCNT1, conjuntament amb una elevada variabilitat en els nivells de proteïna, tant dels transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 com del concentratiu hCNT1 (Farre et al., 2004). En aquest sentit l'estudi de tumors de mama va permetre detectar casos deficientes en la isoforma hENT1, malgrat no es va trobar cap correlació amb la sensibilitat al tractament (Mackey et al., 2002). L'anàlisi de tumors sòlids normalment es fa a través d'estudis retrospectius, el que suposa diversos inconvenients. D'una banda, la majoria de tumors es tracten amb teràpies combinades, pel que és difícil determinar el paper dels transportadors en la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids. D'altra banda, l'anàlisi dels nivells d'expressió es realitza després del tractament pel que aquests poden haver variat. A més, cal tenir en compte la dificultat que suposa obtenir un grup considerable de mostres amb els historials clínics corresponents. Amb les malalties limfoproliferatives l'anàlisi es simplifica, ja que en el cas de leucèmies és senzill obtenir mostres mitjançant una simple extracció de sang i l'aïllament de les cèl.lules corresponents i, addicionalment, les sensibilitats als anàlegs es poden mesurar *ex vivo*.

Per tant, tenint en compte la variabilitat en els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids en les cèl.lules del sistema immunitari i aprofitant l'avantatge de treballar amb malalties limfoproliferatives ens vam plantejar com a objectiu principal d'aquest capítol analitzar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs en dos malalties concretes, la leucèmia limfàtica crònica i el limfoma de mantell.

2.1. LEUCÈMIA LIMFÀTICA CRÒNICA

L'anàlisi dels nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids realitzats en el capítol anterior fa suposar que les cèl.lules de leucèmia limfàtica crònica (LLC) expressen tant transportadors concentratius com equilibratius. Tanmateix, en alguns casos s'ha demostrat que el fet que un tipus cel.lular expressi un transportador, principalment concentratiu, no és garantia de què en presenti activitat. Addicionalment, en el moment d'inici d'aquesta tesi doctoral no es coneixien els transportadors implicats en la captació de fludarabina, anàleg de purina utilitzat en el tractament de la LLC. Per tant, els primers objectius que ens vam plantejar van ser realitzar una caracterització cinètica dels transportadors de nucleòsids de les cèl.lules de LLC, així com determinar les isoformes responsables del transport de fludarabina. La utilització de cèl.lules de pacients per aquest objectiu implicaria introduir una gran variabilitat, ja que es tracta de mostres extremadament heterogènies, i alhora serien necessàries una gran quantitat de cèl.lules, que són mostres molt valuoses i quantitativament limitades. Tanmateix, no existeixen bons models de línies cel.lulars de LLC degut, en part, a que la LLC es caracteritza per una baixa taxa de proliferació. Per aquest motiu, vam decidir utilitzar com a model la línia cel.lular derivada de leucèmia pro-limfocítica JVM-2. Aquest tipus de leucèmia és una variant de la LLC en la que hi ha un major nombre de pro-limfòcits.

Amb la finalitat de trobar el temps adequat de transport en el qual realitzar els estudis cinètics i d'inhibició es van dur a terme experiments de transport en funció del temps en la línia cel.lular JVM-2 (**Figura 7**). El substrat escollit va ser uridina ja que és reconegut per tots els transportadors de nucleòsids i, a més, és pobrament metabolitzat.

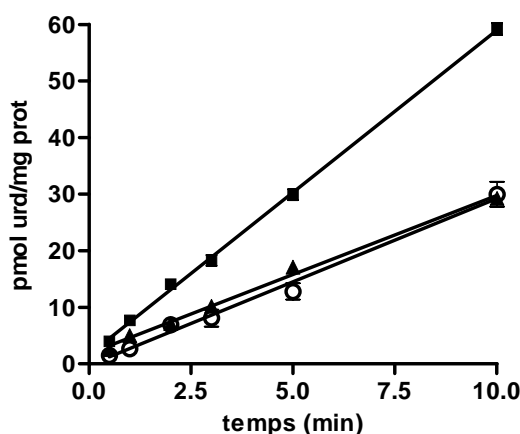


Figura 7. Transport d'uridina en funció del temps en les cèl.lules JVM-2. Les cèl.lules es van incubar amb uridina 1 μ M amb medi en presència (■) o absència (▲) de sodi. El transport sodi-dependent (O) es va calcular com la diferència de transport en els dos medis. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per triplicat.

L'experiment evidencia la presència d'una component significativa de transport dependent de sodi que és lineal fins als 10 minuts. Amb l'objectiu de determinar les isoformes implicades en aquesta component concentrativa vam analitzar la captació d'altres nucleòsids naturals, aprofitant la diferent especificitat de substrat dels

transportadors de la família SLC28. Així, el transportador preferent per pirimidines CNT1 transporta citidina i no guanosina, mentre CNT2, que és preferent per purines, té una selectivitat oposada. Finalment, CNT3 presenta una àmplia especificitat de substrat, transportant tant purines com pirimidines. La presència de CNT3 es pot determinar mitjançant inhibicions creuades ja que, com que els dos nucleòsids són substrat del transportador, la citidina ha de poder inhibir el transport de guanosina mitjançat per CNT3 i viceversa. Els resultats obtinguts en els transports es mostren en la **figura 8**.

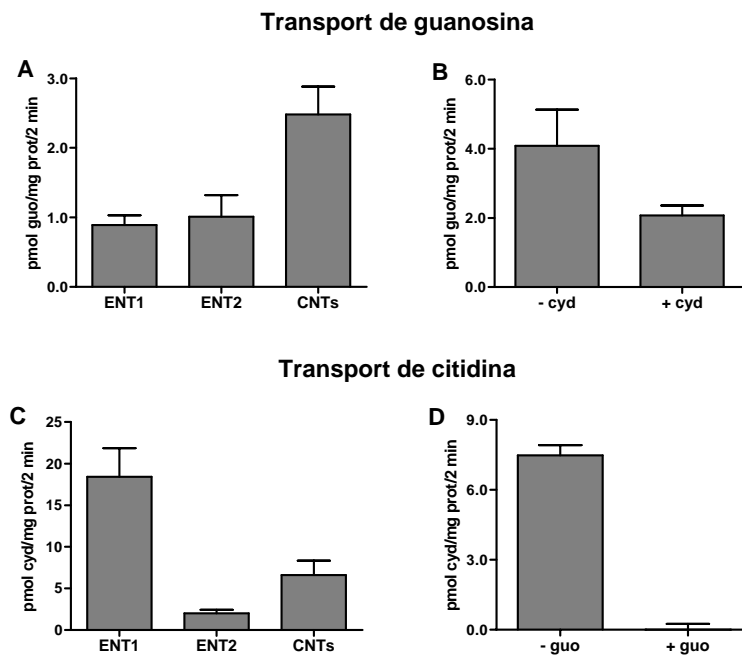


Figura 8. Caracterització del transport de nucleòsids en les cèl.lules JVM-2. Les cèl.lules es van incubar amb guanosina (**A-B**) o citidina (**C-D**) a una concentració 1 μ M en condicions de velocitat inicial (2 minuts). La component concentrativa (CNTs) es va determinar com la diferència entre el transport en medi amb sodi i medi sense sodi. La contribució de l'activitat equilibrativa es va mesurar utilitzant 1 μ M de NBTI per discriminar entre la component sensible a NBTI (ENT1) i la component insensible (ENT2). L'anàlisi dels sistemes concentratius implicats es va realitzar mitjançant inhibicions creuades del transport. La captació sodi-dependent de guanosina 1 μ M es va inhibir mitjançant citidina 100 μ M (**B**) i la de citidina 1 μ M amb guanosina 100 μ M (**D**). Els resultats són la mitjana \pm SE de tres a sis experiments independents mesurats per triplicat.

A l'igual que succeeix amb el transport d'uridina, obtenim una component sodi-dependent d'ambdós substrats, guanosina i citidina. Degut que, tal com s'indica en el capítol 1, les cèl.lules JVM-2 no expressen hCNT1, el transport de citidina dependent de sodi únicament pot ser mitjançat per hCNT3, el que es confirma pel fet que la guanosina inhibeix totalment la seva captació. D'altra banda, la citidina inhibeix parcialment el transport concentratiu de guanosina. En conseqüència, existeix una coexpressió funcional de les isoformes hCNT2 i hCNT3, en concordança, amb els resultats de PCR a temps real mostrats anteriorment (Figura 1). Finalment, la caracterització del transport independent de sodi indica que aquest és mitjançat pels dos transportadors equilibratius, hENT1 i hENT2.

Un cop caracteritzats els transportadors responsables de la captació de nucleòsids en les cèl.lules JVM-2, el següent objectiu va ser determinar quin o quins d'aquests transportadors estaven implicats en la internalització de la fludarabina a l'interior de les cèl.lules. Similarment al transport amb uridina, es va realitzar un experiment de captació de fludarabina en funció del temps per tal de determinar les condicions de velocitat inicial (**Figura 9A**). Sorprenentment, les cèl.lules mostren una major capacitat d'acumular fludarabina que els nucleòsids naturals. De fet, el procés de transport és extremadament ràpid i les condicions de velocitat inicial es perden abans del primer minut d'incubació. Per aquest motiu es va utilitzar un temps d'incubació realment curt (5 segons) per a fer els estudis d'inhibició (**Figura 9B**). La ràpida pèrdua de la linealitat del transport de fludarabina podria ser deguda, en part, al metabolisme intracel.lular, ja que la fludarabina no és un bon substrat de l'enzim responsable de la seva fosforilació, la desoxicitidina quinasa. De fet, mentre la K_m per la dCK de la majoria d'anàlegs es troba entre 5 i 25 μM , la de la fludarabina és de 213 μM (Tseng et al., 1982).

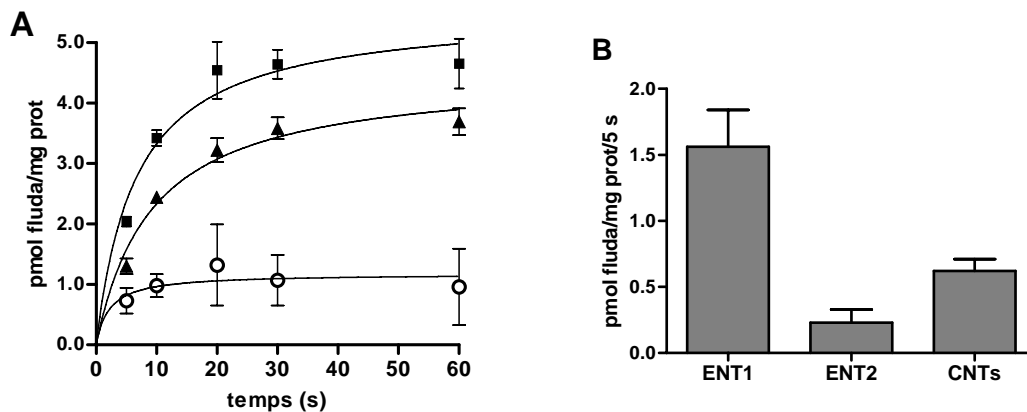


Figura 9. Transport de fludarabina en les cèl.lules JVM-2. (A) Les cèl.lules es van incubar diferents temps amb fludarabina 1 μM amb medi en presència (■) o absència (▲) de sodi. El transport sodi-dependència (○) es va calcular com la diferència de transport en els dos medis. (B) Les cèl.lules es van incubar amb fludarabina 1 μM durant 5 segons. El transport dependent de sodi (CNTs) es va calcular com la diferència entre el transport amb medi amb i sense sodi, mentre que les components equilibratives (ENT1 i ENT2) es van discriminar mitjançant NBTI 1 μM . Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per triplicat.

El transport de fludarabina és mitjançat majoritàriament pels transportadors equilibratius, en concret per hENT1, malgrat que també existeix una component concentrativa que suposa aproximadament el 25% de la captació total. En aquest cas no s'ha utilitzat l'estratègia d'inhibicions creuades per a determinar les isoformes implicades en el transport concentratiu de fludarabina, ja que eren difícils de dur a terme en temps tant curts d'incubació. Tanmateix, paral.lelament a la realització d'aquests experiments, Lang i col.laboradors (2001) van determinar que, malgrat tractar-se d'un anàleg de purina, la fludarabina no era substrat de hCNT2. Per contra, en el treball del clonatge de hCNT3 els autors demostren que aquest és capaç de transportar gran varietat d'anàlegs de nucleòsids utilitzats en quimioteràpia, entre ells la fludarabina (Ritzel et al., 2001b). Així doncs, totes les evidències semblen indicar que, en el cas de la línia JVM-2, hCNT3 seria el transportador concentratiu responsable de la captació de fludarabina.

Un cop finalitzada la caracterització cinètica de la línia cel.lular JVM-2, es va procedir a analitzar els transportadors presents en les cèl.lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica amb l'objectiu de determinar si aquests podien jugar algun paper en la sensibilitat a fludarabina. Per a l'estudi es van escollir 22 pacients de LLC que no havien estat prèviament tractats amb fludarabina. En primer lloc, es va analitzar mitjançant PCR a temps real l'expressió dels cinc transportadors de nucleòsids en les cèl.lules dels 22 pacients de LLC. En tots els gens amplificats l'expressió de la línia cel.lular JVM-2 es va utilitzar com a calibrador per a normalitzar els valors obtinguts (**Figura 10**).

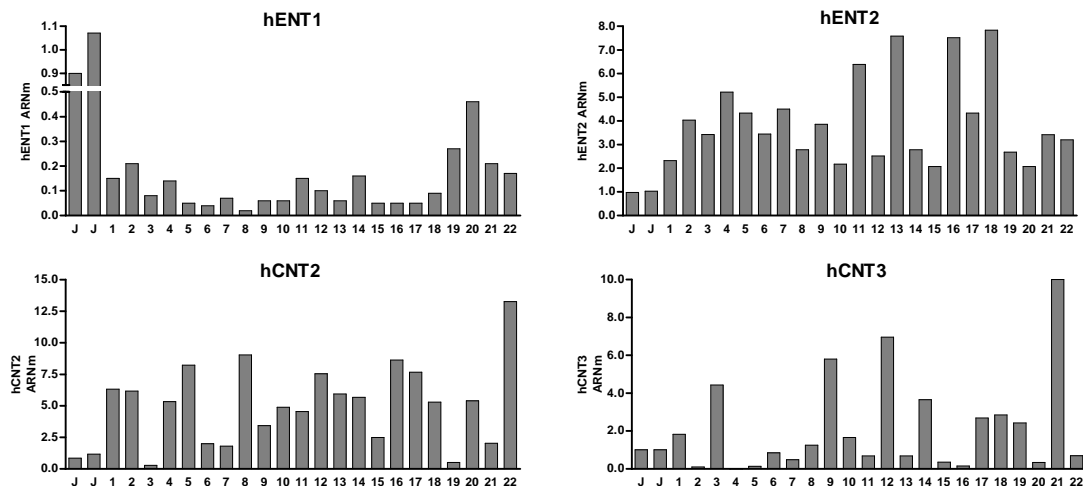


Figura 10. Nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids en les cèl.lules de LLC. Els valors de C_T obtinguts per a cada transportador han estat normalitzats respecte al control endogen (β -glucuronidasa). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant la mitjana dels valors de la línia JVM-2 (J) com a control de referència.

Anàlogament als resultats mostrats anteriorment per a les cèl.lules del sistema immunitari, les cèl.lules de LLC expressen hENT1, hENT2, hCNT2 i hCNT3 però en cap cas es detecta expressió de hCNT1, tot i que el nombre de cicles d'amplificació es va pujar fins a 50. Els resultats mostren a més una heterogeneïtat significativa en els nivells d'expressió entre pacients, essent hCNT3 el que major variabilitat presenta i hENT2 el de menor. Alhora, i en concordança amb les dades obtingudes en les línies cel.lulars de limfòcits B, observem que en alguns casos es perd l'expressió del transportador hCNT3, mentre en totes les cèl.lules es detecta l'ARNm de la isoforma hCNT2. Cal remarcar també, que en comparació amb la línia cel.lular JVM-2, totes les cèl.lules de LLC analitzades tenen uns nivells menors d'hENT1 i majors d'hENT2. Amb l'objectiu de determinar si hi havia algun tipus de relació entre els nivells d'ARNm dels diferents gens, es van realitzar anàlisis de correlacions i, fins i tot, de *clusters* però els resultats van ser negatius.

A continuació, i aprofitant l'avantatge de treballar amb malalties limfoproliferatives, ens vam proposar realitzar mesures directes de captació de nucleòsids en les cèl.lules de pacients de LLC. L'elevada heterogeneïtat entre pacients faria necessària una caracterització de les condicions de velocitat inicial de cadascun. Tanmateix, les cèl.lules de LLC són molt petites, fet que complica les mesures de transport mitjançant el mètode de centrifugació ja que cal un nombre elevat de cèl.lules. Degut a que la quantitat de

cèl.lules de què es disposa és limitat, vam decidir realitzar les mesures de transport a 10 segons, que era els temps que millors resultats havia donat en les proves prèvies. Els estudis s'han realitzat tant amb cèl.lules fresques com amb criopreservades, per tant, un cop es van posar a punt les condicions de transport en aquest tipus cel.lular vam comprovar que no hi havia diferències en funció de l'origen de les cèl.lules.

Així doncs, un cop posat a punt el mètode es va procedir a realitzar mesures de captació de 10 segons d'un nucleòsid natural i de fludarabina en les cèl.lules dels 22 pacients de LLC. El nucleòsid natural escollit pels transports va ser la guanosina ja que és substrat de hCNT2 i de hCNT3, transportadors concentratius que s'expressen en les cèl.lules de LLC (**Figura 11**).

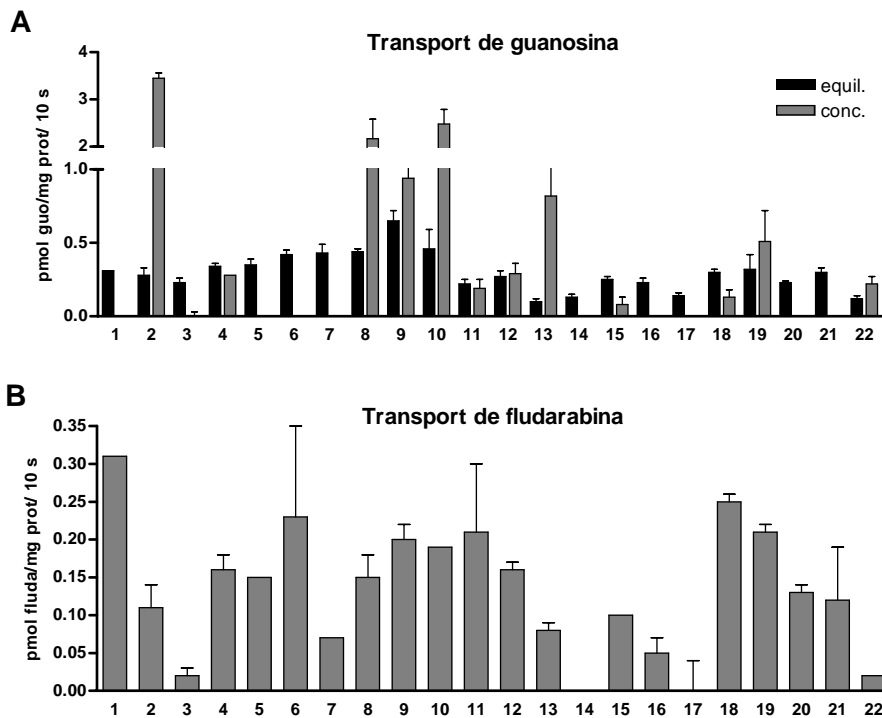


Figura 11. Transport de guanosina i fludarabina en les cèl.lules de pacients de LLC. Les cèl.lules es van incubar durant 10 segons amb guanosina (A) o fludarabina (B) 1 μ M en medi en presència o absència de sodi. (A) El transport sodi dependent es va calcular com la diferència de transport en els dos medis, mentre que la component equilibrativa correspon al transport amb medi sense sodi. (B) En cap cas es va detectar un transport concentratiu de fludarabina, pel que es representa únicament el transport independent de sodi. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments mesurats per triplicat.

Els resultats del transport de guanosina mostren que, malgrat totes les cèl.lules expressen transportadors concentratius, només 12 dels pacients analitzats presenten activitat dependent de sodi i d'aquests únicament 5 tenen uns nivells d'activitat elevats. Per contra, quan s'analitza la captació de fludarabina, cap dels pacients analitzats mostra un transport dependent de sodi, ni tant sols ens aquelles cèl.lules que presenten una activitat concentrativa de guanosina, tot i que no es pot descartar que existeixi una acumulació dependent de sodi de fludarabina a temps més llargs. A més, dos dels pacients analitzats presenten una captació de fludarabina pràcticament nul.la. La manca de transport concentratiu de fludarabina en aquells pacients que en tenen de guanosina es podria

explicar analitzant la selectivitat dels substrats. De fet, la guanosina és substrat de hCNT2 i de hCNT3 mentre que la fludarabina és únicament reconeguda per hCNT3, per tant, dins aquest context sembla raonable pensar que l'activitat concentrativa que s'observa és deguda al transportador hCNT2. Aquesta hipòtesi ve recolzada per un treball recent de Mackey i col.laboradors (2005) on analitzen, mitjançant anticossos monoclonals, la localització de hCNT3 en cèl.lules de LLC i troben un marcatge clarament citoplasmàtic. Alhora, els autors també realitzen mesures de captació d'uridina i no detecten transport dependent de sodi, tot i que únicament analitzen tres mostres.

Finalment, amb l'objectiu de correlacionar les dades obtingudes d'expressió i d'activitat dels transportadors de nucleòsids amb la sensibilitat a fludarabina, vam tractar les cèl.lules de LLC amb diferents dosis de fludarabina i vam mesurar la seva viabilitat a les 48 hores (**Figura 12**).

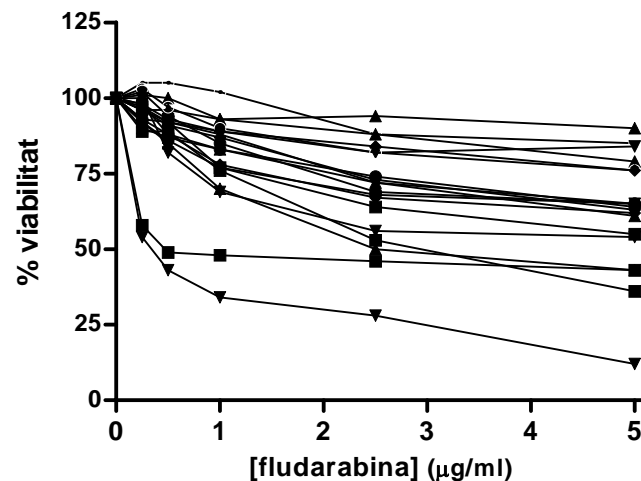


Figura 12. Citotoxicitat de fludarabina en les cèl.lules de pacients de LLC. Les cèl.lules es van incubar durant 48 hores amb diferents dosis de fludarabina. La viabilitat es va mesurar mitjançant un assaig de MTT i es presenta com a percentatge, comparant les cèl.lules tractades amb el cultiu que no ha estat exposat al fàrmac.

La gràfica resultant de les citotoxicitats realitzades evidencia la variabilitat en la resposta entre els pacients analitzats, amb pacients que presenten una elevada resistència i d'altres clarament sensibles. Tanmateix, el fet que hi hagi cèl.lules resistents ha fet impossible calcular les IC_{50} de la resposta a fludarabina per a cada pacient.

Un cop mesurats els diferents paràmetres dels 22 pacients de LLC, es va procedir a analitzar si existia alguna correlació entre les dades obtingudes. Els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids, obtinguts per PCR a temps real, no mostren cap correlació significativa amb la sensibilitat a fludarabina. De fet, tampoc guarden cap relació ni amb el transport de guanosina ni amb el de fludarabina. No obstant, si que existeix una correlació significativa entre el transport de fludarabina i la sensibilitat a fludarabina a les tres concentracions mesurades 3 µM, 7.5 µM i 15 µM (1, 2.5 i 5 µg/ml, respectivament) (**Figura 13**).

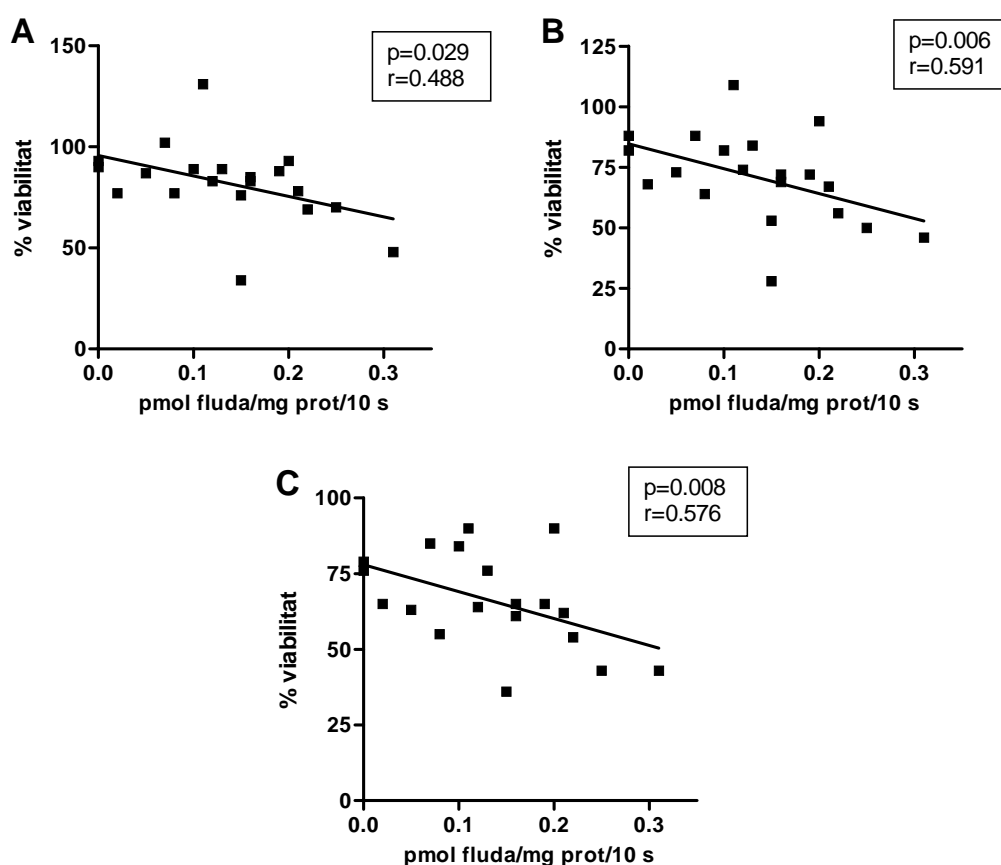


Figura 13. Correlació entre la captació de fludarabina i la sensibilitat *ex vivo* a fludarabina 3 μM (A), 7.5 μM (B) i 15 μM (C). En les gràfiques es mostren els coeficients de correlació i els valors de p.

Aquestes dades suggereixen una relació entre el transport de fludarabina via els transportadors equilibratius i la sensibilitat *ex vivo* a la fludarabina. El més sorprenent d'aquest resultat és que mesures d'acumulació del fàrmac realitzades amb 10 segons d'incubació es correlacionen clarament amb els resultats de citotoxicitat en què les cèl.lules són incubades durant 48 hores amb el fàrmac. Per tant, assumint que en temps llargs d'incubació poden existir fenòmens de difusió passiva no facilitada, en aquest cas es demostra que els processos mitjançats per transportadors determinen la resposta al fàrmac. Això podria ser degut, en part, a un direccionament metabòlic dels substrats a dianes intracel.lulars específiques del fàrmac, una situació que no s'aconseguiria mitjançant la difusió passiva a través de la membrana plasmàtica.

Aquests resultats suggereixen que l'activitat biològica del transportador pot predir millor la resposta a fludarabina en pacients de LLC que l'anàlisi quantitatiu dels ARNm dels transportadors de nucleòsids. Tanmateix, aquesta no és una regla general ja que en altres tipus de càncer com la LMA s'ha descrit una correlació entre els nivells d'ARNm d'hENT1 i la sensibilitat a citarabina (Galmarini et al., 2002c). No obstant, la complexitat dels experiments de transport fa que no puguin utilitzar-se com a eina per a predir resposta, ja que requereixen la utilització de substrats radioactius i d'un gran nombre de cèl.lules. Per tant, el paràmetre més proper a les taxes de transport és la determinació de les quantitats

de proteïna del transportador. En el nostre laboratori s'han generat anticossos policlonals dirigits contra pèptids sintètics d'hENT1 i d'hENT2 que han estat caracteritzats dins del marc de la tesi doctoral d'Elena Guillén (Farre et al., 2004). Per tant, els següents objectius plantejats van ser en primer lloc analitzar si els nivells de proteïna estaven associats amb la captació del substrat i amb la citotoxicitat i en segon lloc determinar quina de les dues isoformes, en cas d'un resultat positiu, podia predir la resposta al tractament.

El primer pas va ser comprovar que els anticossos contra hENT1 i hENT2 ens permetien realitzar un estudi quantitatiu dels nivells d'expressió de les proteïnes corresponents. En aquest sentit, vam realitzar assajos de western blot utilitzant diferents quantitats de proteïna. Els resultats obtinguts van demostrar que les senyals densitomètriques corresponents eren lineals fins a 70 µg de proteïna (**Figura 14**).

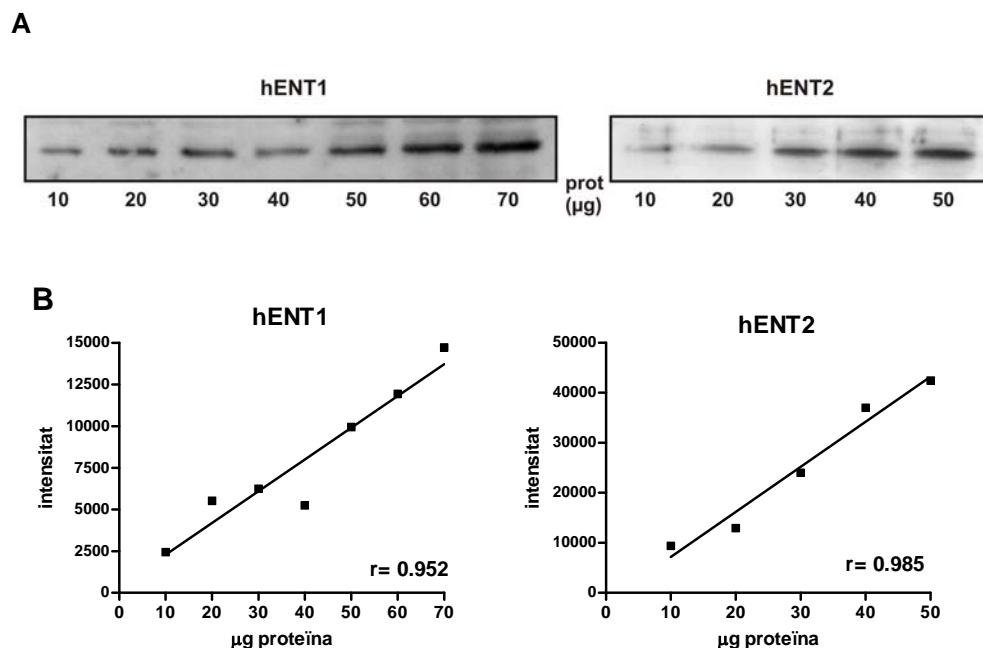


Figura 14. Linealitat dels nivells d'expressió de proteïna d'hENT1 i d'hENT2. (A) Western blots d'hENT1 i d'hENT2 en els que es van carregar quantitats creixents d'extractes proteics de les línies cel.lulars Granta i U937, respectivament. **(B)** Representació del senyal densitomètric obtingut respecte la quantitat de proteïna carregada. En la figura es mostren els coeficients de regressió.

En analitzar l'expressió dels nivells de proteïna d'hENT1 en les mostres de LLC vam observar que, a diferència de les línies cel.lulars, aquest es detectava amb dificultat, possiblement degut als baixos nivells d'expressió, el que va fer necessari la utilització d'un protocol d'extracció de proteïna de membrana per a realitzar els assajos de western blot amb l'anticòs d'hENT1. Un cop posada a punt la tècnica per a les mostres de LLC, vam analitzar l'expressió d'hENT1 i hENT2 en els extractes proteics dels 22 pacients de LLC. Alhora, les mateixes membranes es van tornar a incubar a l'anticòs anti- α -tubulina per tal de corregir les diferències en la càrrega (**Figura 15**).

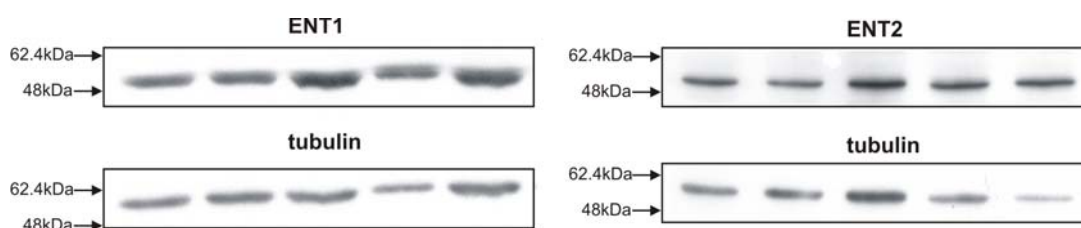


Figura 15. Westerns blots d'hENT1 i d'hENT2. Western blots representatius d'hENT1 i d'hENT2 i els seus corresponents controls de tubulina de cinc mostres independents de LLC. Els anticossos d'hENT1 i d'hENT2 reconeixen de manera específica una banda de 50-55 KDa en els extractes proteics de LLC.

Un cop analitzades totes les mostres es van obtenir els senyals densitomètrics de les imatges obtingudes. Les anàlisis semi-quantitatives de l'expressió d'hENT1 i d'hENT2 es van realitzar calculant els ratios entre el senyal del transportador i el de la α -tubulina. L'expressió d'hENT1 i d'hENT2 en un pacient de LLC es va utilitzar com a calibrador i se li va assignar el valor d'1 com a unitat arbitrària (**Figura 16**).

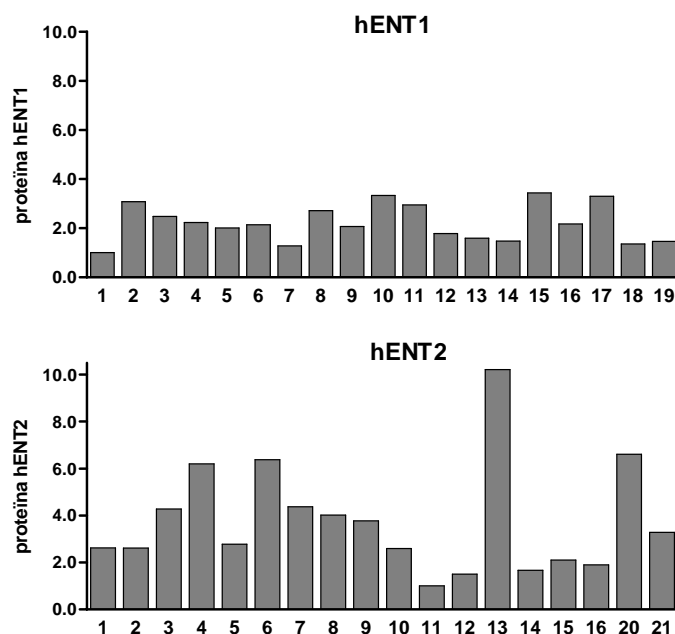


Figura 16. Nivells d'expressió d'hENT1 i d'hENT2 en les cèl·lules de LLC. Les quantitats de proteïna es van calcular com la relació entre el senyal densitomètric del transportador i el de α -tubulina. Els valors es donen com unitats arbitràries utilitzant una mostra de LLC com a referència.

Els resultats mostren una elevada variació dels nivells d'expressió d'hENT2 i en canvi una baixa variabilitat d'hENT1. De fet, la variació d'hENT2 entre les mostres extremes és d'11 vegades, mentre que la d'hENT1 és de 3. Aquests resultats són oposats als obtinguts per l'ARNm (Figura 10), en els que els nivells d'expressió d'hENT1 entre pacients eren molt majors que els d'hENT2.

L'intent de trobar alguna relació entre els nivells d'expressió de proteïna d'hENT1 i els paràmetres determinats anteriorment va donar resultats negatius. De fet, ni tan sols existeix una correlació entre els nivells d'ARNm i els de proteïna. En contrast, malgrat els nivells de proteïna d'hENT2 no correlacionen amb els d'ARNm, si que ho fan amb l'activitat de transport tant del nucleòsid natural guanosina com de l'anàleg fludarabina. Addicionalment, aquesta relació entre proteïna i funció s'estén també a la citotoxicitat, tal i com es mostra en la **figura 17**. Així, la sensibilitat *ex vivo* a la fludarabina, a concentracions 3, 7.5 i 15 μM , correlaciona directament amb la quantitat de proteïna d'hENT2.

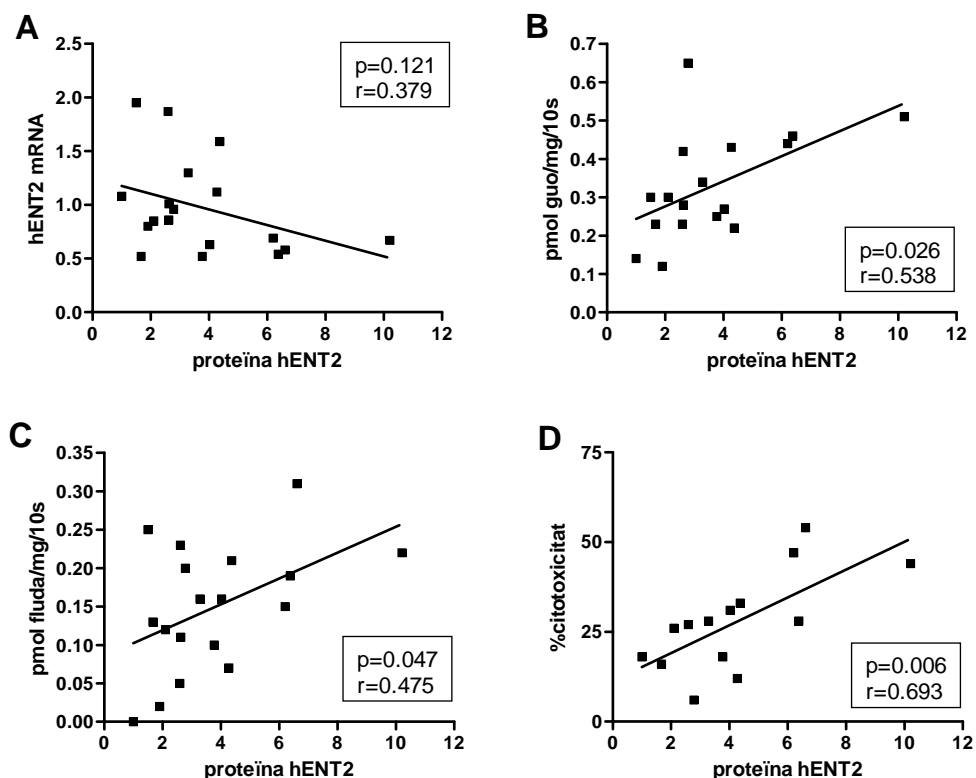


Figura 17. Correlació entre la proteïna hENT2 i l'ARNm, l'activitat de transport de nucleòsids i la sensibilitat a fludarabina. Els nivells d'expressió de la proteïna hENT2 en les cèl.lules de LLC es representen respecte (A) els nivells d'ARNm d'hENT2, (B) el transport de guanosina (10 s, 1 μM), (C) la captació de fludarabina (10 s, 1 μM) i (D) la sensibilitat *ex vivo* a la fludarabina, expressada com a percentatge de cèl.lules no viables després d'un tractament de 48 hores amb fludarabina 7.5 μM . Addicionalment, s'indiquen els coeficients de correlació i els valors de p.

Així doncs, malgrat diferents estudis han demostrat una correlació clínica entre els nivells, tant de proteïna com d'ARNm, d'hENT1 i la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids, en la LLC és l'expressió de la proteïna hENT2 la que podria jugar un paper predictiu en la sensibilitat a fludarabina. Addicionalment, la proteïna també correlaciona amb l'activitat de transport de nucleòsids, tant de guanosina com de fludarabina. El fet que aquests nucleòsids siguin substrat dels dos transportadors equilibratius i, d'altra banda, la dificultat que hem trobat a l'hora de detectar la proteïna hENT1 per western blot fan suposar que els nivells d'hENT1 en les cèl.lules de LLC són força baixos, el que concorda amb els resultats

obtinguts per PCR a temps real, on les cèl·lules de LLC tenen uns nivells d'expressió d'hENT1 molt menors que els de la línia cel·lular JVM-2. En aquest sentit, Wiley i col·laboradors (1989) van mesurar els llocs d'unió de NBTI en cèl·lules de pacients de diferents tipus de leucèmies i limfomes. Els resultats van indicar que les cèl·lules de LLC eren les que presentaven uns nivells menors d'hENT1 en la membrana plasmàtica. Recentment, s'ha realitzat un estudi similar utilitzant un anticòs monoclonal contra hENT1. En aquest cas, malgrat els autors analitzen 10 casos de LLC/LLP, no en troben cap hENT1-positiu, si bé el *cutoff* arbitrari escollit va ser del 50% (Chow et al., 2005).

Els resultats obtinguts mostren una manca de correlació entre els nivells d'expressió de l'ARNm i els de proteïna dels transportadors equilibratius. Anàlogament, la utilització d'anticossos policlonals contra les isoformes de rata de CNT1 i CNT2 tampoc va donar cap tipus de correlació en fetge de rata (Felipe et al., 1998). D'altra banda, la comparació entre la línia limfoid H9 parental i una resistent a citarabina va permetre determinar que, malgrat la línia resistent presentava uns nivells molt inferiors de la proteïna hENT1, la quantitat d'ARNm era similar (Sarkar et al., 2005). Per contra, el tractament de cèl·lules endotelials amb glucosa produeix una disminució de l'ARNm d'hENT2 que no es tradueix en una reducció de la proteïna (Aguayo et al., 2005). Aquestes dades indicarien que en alguns casos poden haver-hi diferències en la estabilitat de l'ARNm o en la traducció que es traduirien en una manca de correlació entre la quantitat d'ARNm i de proteïna.

Tot i que el paper d'hENT2 en la sensibilitat a la fludarabina en la LLC podria ser degut a la baixa expressió del transportador hENT1 en aquestes cèl·lules, una altra possibilitat que caldria considerar és la diferent afinitat de la fludarabina pels transportadors equilibratius. En la línia cel·lular JVM-2, el transport de fludarabina era majoritàriament mitjançat per hENT1, no obstant, malgrat les cèl·lules expressen els dos transportadors equilibratius el transport independent de sodi en aquesta línia cel·lular és degut principalment a l'activitat d'hENT1. Per aquest motiu, ens vam proposar utilitzar una altra línia que presentés activitat dels dos transportadors equilibratius per analitzar, mitjançant estudis d'inhibicions, l'afinitat de la fludarabina per hENT1 i hENT2. Sorprenentment, la majoria de les línies cel·lulars d'origen limfoid testades tenien una baixa activitat d'hENT2, pel que finalment vam decidir utilitzar la línia derivada de tumor de mama MCF7, la caracterització cinètica de la qual es detalla en el capítol 3 d'aquesta memòria. Així doncs, la interacció de la fludarabina amb els transportadors equilibratius es va determinar mesurant la inhibició del transport d'uridina 1 μ M mitjançant concentracions creixents de fludarabina, en presència o absència de NBTI. Les corbes d'inhibició obtingudes es mostren en la **figura 18**.

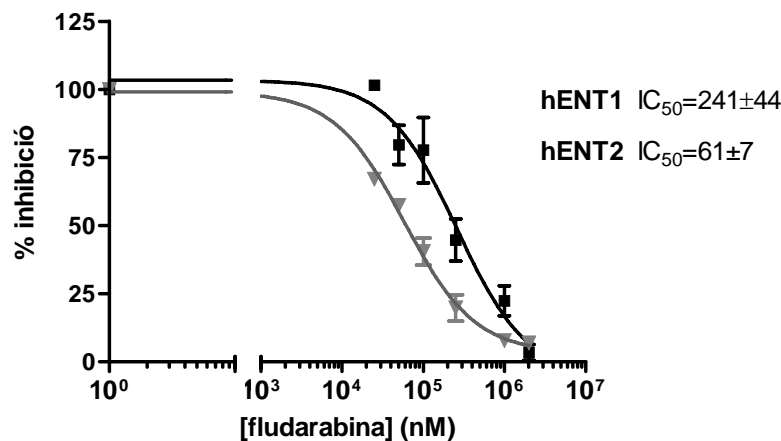


Figura 18. Inhibició dels transportadors hENT1 i hENT2 amb fludarabina. Les cèl.lules MCF7 es van incubar en medi sense sodi durant 1 minut amb uridina 1 μ M, amb o sense NBTI 1 μ M, en presència de concentracions creixents de fludarabina. La component mitjançada per hENT1 (■) es va determinar com la diferència entre el transport amb i sense NBTI, mentre que hENT2 (▼) correspon al transport d'uridina en presència de NBTI al que se li ha restat la captació corresponent a la difusió i les unions inespecífiques. Els resultats es mostren com a percentatge respecte a les cèl.lules que no s'han incubat amb fludarabina i corresponen a la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per quadruplicat.

Els valors d' IC_{50} obtinguts (241 ± 44 μ M per hENT1 i 61 ± 7 μ M per hENT2) ens demostren que la fludarabina té una major afinitat pel transportador hENT2 que per hENT1, el que corroboraria el principal paper de la proteïna hENT2 en la sensibilitat a fludarabina. Es tracta d'una situació poc freqüent ja que malgrat tots dos transportadors equilibratius presenten una àmplia especificitat de substrat, generalment, hENT1 té una major afinitat pels substrats que hENT2. De fet, els derivats halogenats en la posició 2 de l'adenosina, 2-cloroadenosina i 2-fluoroadenosina, són dos dels pocs compostos pels que s'ha descrit una major afinitat pel transportador hENT2 que per hENT1 (Kong et al., 2004). En concordança amb aquests resultats, la fludarabina (9- β -D-arabinosil-2-fluoroadenina) presenta la mateixa modificació que aquestes molècules.

D'altra banda, tal com s'ha comentat prèviament, la majoria de línies limfoides que es van analitzar presentaven una activitat baixa del transportador hENT2. Per tant, per comprovar si les cèl.lules de LLC tenien una major activitat insensible a NBTI vam decidir realitzar mesures de captació de fludarabina en presència o absència de NBTI, per tal de discriminar entre les dues components independents de sodi (**Figura 19**).

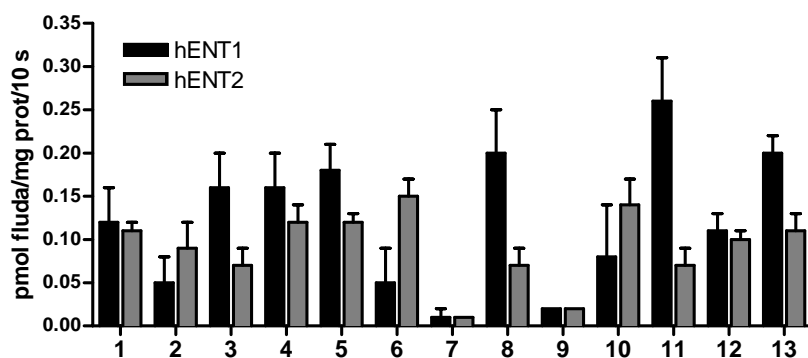


Figura 19. Transport de fludarabina en les cèl.lules de pacients de LLC. Les cèl.lules es van incubar durant 10 segons amb fludarabina 1 μ M en medi sense sodi en presència o absència de NBTI 1 μ M. El transport mitjançat per hENT1 es va calcular com la diferència de transport amb i sense NBTI, mentre que hENT2 correspon al transport amb medi sense NBTI. Els resultats corresponen als valors d'un experiment mesurat per sixtuplicat.

El resultat obtingut demostra que la proporció del transport mitjançat per hENT2 és molt major que la obtinguda en les cèl.lules JVM-2, tot i que la captació de fludarabina no és mitjançada únicament pel transportador insensible a NBTI sinó que el paper dels dos transportadors equilibratius és similar. Així doncs, malgrat la baixa expressió d'hENT1 en les cèl.lules de LLC i la major afinitat de la fludarabina pel transportador hENT2, aquesta és transportada per les dues isoformes equilibratives. Estudis realitzats en macròfags han demostrat que els nucleòsids captats pel transportador ENT1 s'incorporen majoritàriament a l'ADN, principalment durant la proliferació (Soler et al., 2001a). D'altra banda, les cèl.lules de LLC es caracteritzen per una població majoritària en fase G₀ del cicle cel.lular, presentant per tant una baixa proliferació. Finalment, la fludarabina pot actuar en cèl.lules no proliferatives mitjançant la inhibició de la reparació de l'ADN o incorporant-se a l'ARN. Tenint en compte aquestes dades, sembla raonable pensar que podria haver-hi una direccionalitat dels nucleòsids en funció del transportador implicat en la seva captació. En les cèl.lules de LLC la fludarabina no actua inhibint la proliferació, com la majoria de fàrmacs, sinó que actuaria principalment sobre l'ARN o la reparació de l'ADN, per tant, en aquest cas, el transportador implicat en la sensibilitat no seria hENT1, que juga un paper important en proliferació, sinó hENT2.

2.1. LIMFOMA DE CÈL.LULES DE MANTELL

El limfoma de cèl.lules de mantell (LCM) és una malaltia limfoproliferativa que, a diferència de la LLC, es caracteritza per una elevada proliferació, conseqüència d'una sobre-expressió de la ciclina D1. A més, estudis recents de Ferrer i col.laboradors han demostrat que són necessàries dosis molt més altes de fludarabina que les que s'utilitzen en el tractament de la LLC per aconseguir un efecte citotòxic mínim (Ferrer et al., 2004). Aquestes diferències amb la LLC ens van portar a analitzar els nivells d'expressió dels transportadors equilibratius en cèl.lules de LCM. Aquests estudis, de manera similar als

realitzats en la LLC, s'han realitzat en col.laboració amb la Dra. Dolors Colomer del Servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic.

En tractar-se d'un limfoma, la majoria de cèl.lules tumorals es troben en els nòduls limfàtics, per tant, no és tan senzill obtenir mostres tumorals, de fet, se les considera un bé molt preuat. Tanmateix, i a diferència de la LLC, existeixen diverses línies cel.lulars que es poden utilitzar com a model del LCM. Les línies cel.lulars utilitzades per a l'estudi, Jeko-1, REC-1, Granta-519 i NCEB-1, es caracteritzen per presentar la translocació t(11;14)(q13;q32) característica del LCM. Addicionalment, Jeko-1 té mutacions en el gen p53, Granta-519 té alteracions en 11q que afecten l'ATM i NCEB-1 presenta els dos tipus d'alteracions. En l'anàlisi es va incloure també la línia derivada de leucèmia pro-limfocítica JVM-2, ja que també mostra la translocació t(11;14)(q13;q32).

En primer lloc es va analitzar mitjançant PCR a temps real l'expressió dels dos transportadors equilibratius en les cinc línies cel.lulars. La línia cel.lular JVM-2 es va utilitzar com a calibrador i per tant es va assignar el valor arbitrari d'1 als seus nivells d'expressió (**Figura 20**).

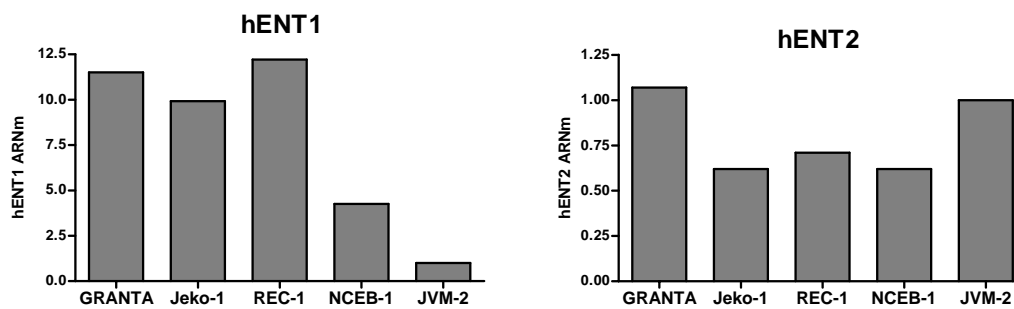


Figura 20. Nivells d'expressió dels transportadors equilibratius en les cèl.lules de LCM. Els valors de C_T obtinguts per a cada transportador han estat normalitzats respecte al control endogen (β -glucuronidasa). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant la línia JVM-2 com a control de referència.

Els resultats, en concordança amb els obtinguts en la LLC, mostren una elevada variabilitat en els nivells d'expressió d'hENT1. De fet, la línia REC-1 té uns nivells d'ARNm d'hENT1 12 cops majors que els de JVM-2, característica que no deixa de ser sorprenent si tenim en compte que les cèl.lules JVM-2 mostren una expressió molt més elevada d'hENT1 que les cèl.lules de LLC. D'altra banda, l'expressió d'hENT2 pràcticament no varia entre les línies cel.lulars.

Seguidament, es van mesurar mitjançant western blot els nivells d'expressió de les proteïnes hENT1 i hENT2. La major expressió d'hENT1 respecte les cèl.lules de LLC es posa en evidència pel fet que en aquest cas no va ser necessari un protocol d'extracció de proteïna de membrana, sinó que els extractes de proteïna total van ser suficients per a detectar hENT1. De manera equivalent als experiments anteriors, l'expressió de la α -tubulina es va utilitzar per a corregir les diferències de càrrega. Així doncs, els valors d'expressió es van determinar, mitjançant anàlisis densitomètriques, com la relació entre el transportador i la α -tubulina (**Figura 21**).

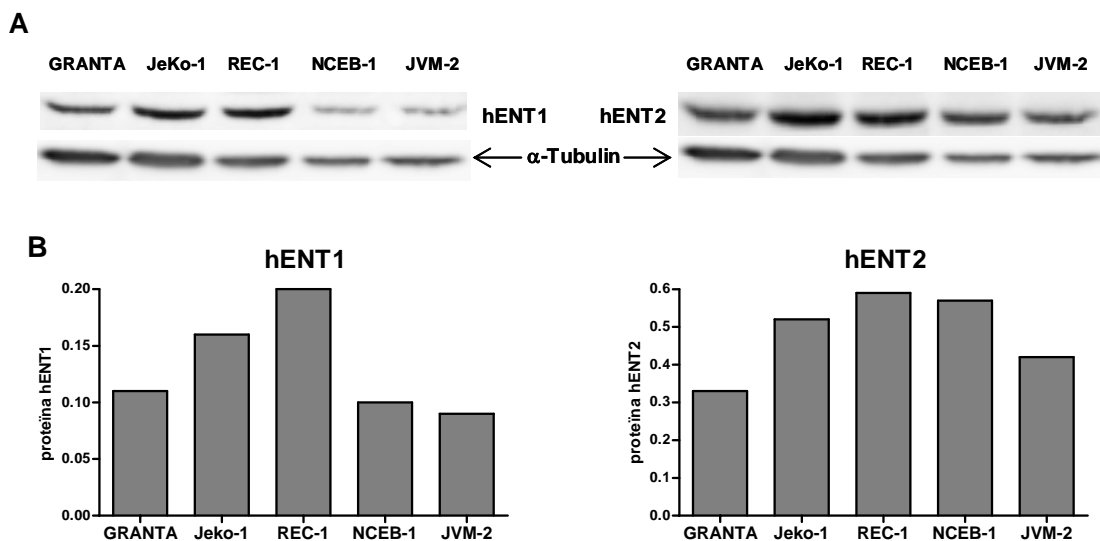


Figura 21. Western blots i nivells d'expressió d'hENT1 i d'hENT2 en les cèl.lules de LCM. (A) Western blots d'hENT1 d'hENT2 i els seus corresponents controls de α -tubulina. **(B)** Nivells d'expressió d'hENT1 i d'hENT2. Les quantitats de proteïna es van calcular com la relació entre el senyal densitomètric del transportador i el de α -tubulina.

En aquest cas, malgrat la variabilitat dels nivells d'expressió de la proteïna hENT1 continua essent major que la d'hENT2, aquesta és molt menor que l'observada al mesurar els nivells d'ARNm. De fet, els nivells de la proteïna hENT1 en REC-1 són dos vegades majors que els de JVM-2, mentre que la diferència en els nivells d'ARNm era de 12 cops. Al representar els nivells de proteïna respecte els d'ARNm dels transportadors obtenim dos resultats totalment oposats (**Figura 22**).

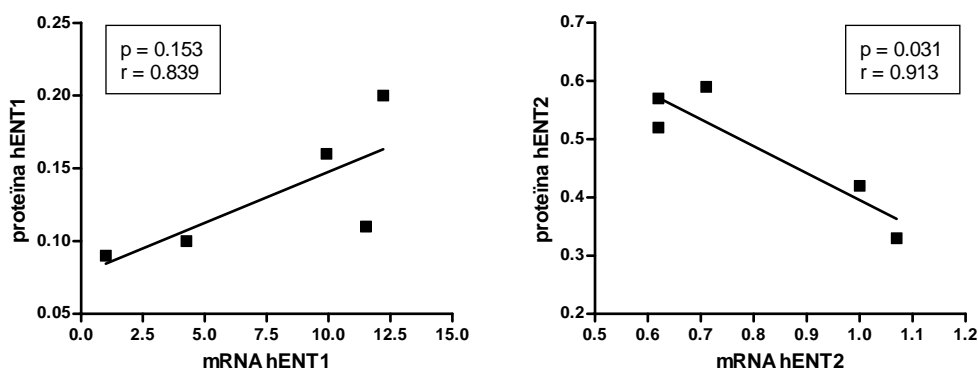


Figura 22. Correlació entre la proteïna i l'ARNm d'hENT1 (A) i d'hENT2 (B) en cèl.lules de LCM. En les gràfiques es mostren els coeficients de correlació i els valors de p.

Sorprenentment, la correlació entre els nivells d'expressió de proteïna i d'ARNm d'hENT2 és negativa. De fet, més que una correlació lineal es poden distingir dos grups que es podrien diferenciar per una major estabilitat de l'ARNm, en aquelles línies que presenten uns nivells baixos, o bé per una menor taxa de traducció, en les línies amb uns valors de missatger superiors. D'altra banda, tot i que la relació no és estadísticament

significativa, possiblement degut al baix nombre de punts, existeix una tendència a una correlació positiva entre els nivells de proteïna i d'ARNm d'hENT1. En concordança amb aquests resultats, i a diferència dels obtinguts en la LLC, en una anàlisi de 22 pacients de LCM realitzat dins el marc de la tesi doctoral de Sílvia Marcé en el Servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic es va observar que també existia una correlació positiva entre els nivells d'expressió de proteïna i d'ARNm d'hENT1, mentre que en aquest cas hENT2 no presentava cap tipus de correlació. Tanmateix, cal tenir en compte que en les cèl.lules de LLC per a detectar hENT1 es va utilitzar un protocol d'extracció de proteïna de membrana, pel que no es pot descartar que hi hagués una correlació entre la proteïna total i l'ARNm.

La comparació dels valors de missatge dels pacients de LLC amb els de LCM va permetre observar que les cèl.lules de LCM tenien nivells significativament majors d'hENT1 que les de LLC (0.88 ± 0.78 i 0.13 ± 0.10 , respectivament) ($p < 0.001$), mentre que en el cas d'hENT2 els resultats s'invertien (0.90 ± 0.50 per LCM i 4.04 ± 1.83 per LLC) ($p < 0.001$). Com ja s'ha comentat prèviament, les cèl.lules de LCM es caracteritzen per una elevada proliferació (Campo, 2003), mentre que la LLC presenta una acumulació de cèl.lules B en fase G_0 del cicle cel.lular (Chiorazzy et al., 2005). Els resultats obtinguts concorden amb estudis previs que suggereixen un paper d'hENT1 en la proliferació cel.lular (Cass et al., 1979; Pressacco et al., 1995b). Aquesta observació havia estat mostrada prèviament en un cas aïllat de LCM quan els nivells d'hENT1 es van comparar amb un grup de mostres de LLC (Reiman et al., 2002b). Addicionalment, l'anàlisi de l'expressió d'hENT1 mitjançant immunohistoquímica en diferents tipus de limfoma no-Hodgkin's suggereix que l'expressió d'hENT1 està lligada a proliferació (Chow et al., 2005).

Els resultats obtinguts fins al moment posaven en evidència diferències en l'expressió dels transportadors de nucleòsids equilibratius entre les cèl.lules de LCM i les de LLC, principalment amb hENT1. De fet, la línia derivada de leucèmia pro-limfocítica JVM-2 és la que menor expressió d'hENT1 presenta. Aquesta característica conjuntament amb el fet que les cèl.lules de MCL tenen una elevada taxa de proliferació, ens van fer pensar que possiblement altres anàlegs de nucleòsids amb major eficàcia en tumors altament proliferatius podrien tenir major efecte citotòxic en aquesta malaltia ja que, com s'ha comentat prèviament, la seva resposta a fludarabina és molt baixa.

En base a la bibliografia consultada sobre els assajos clínics de LCM, vam optar per la gemcitabina. Malgrat es tracta d'un fàrmac que s'utilitza majoritàriament en el tractament de tumors sòlids, diferents estudis han demostrat la seva eficàcia en malalties limfoproliferatives. De fet, el seu mecanisme d'acció produeix una major resposta citotòxica en comparació amb l'altre anàleg de citidina, la citarabina, el que fa que sigui actiu contra tumors sòlids, mentre la citarabina no ho és. Tanmateix, les similituds amb la citarabina, que s'utilitza àmpliament en el tractament de les malalties limfoproliferatives, fan pensar que la gemcitabina també podria ser activa en aquests tipus de tumors. L'efecte de la gemcitabina en la teràpia de leucèmies i limfomes s'ha començat a analitzar en els darrers anys (Nabhan et al., 2001). En els cas concret del LCM, diversos estudis han demostrat que la gemcitabina té un efecte citotòxic tant en teràpia única com combinada (Dumontet et al., 2001; Sampol et al., 2004).

Amb l'objectiu de comprovar si la gemcitabina podia ser un bon fàrmac pel tractament del LCM, vam analitzar la sensibilitat de les línies cel.lulars de LCM a aquest anàleg de citidina. Alhora, i amb finalitats comparatives, vam realitzar també els experiments de dosi-resposta amb fludarabina. En la **taula 3** s'indiquen els valors d'IC₅₀ obtinguts.

	IC ₅₀ gemc. (µg/ml)	IC ₅₀ fluda. (µg/ml)
REC-1	0.02	12.41
Jeko-1	0.28	6.65
Granta-519	2.75	8.55
JVM-2	6.1 · 10 ¹³	28.31
NCEB-1	NR	NR

Taula 3. IC₅₀ per a la gemcitabina i la fludarabina en línies cel.lulars de LCM. Les cèl.lules es van incubar durant 24 hores amb dosis creixents de fàrmac i la viabilitat es va determinar mitjançant marcatge amb Anexina-V. NR: no respon.

Els resultats mostren que les línies REC-1, Jeko-1 i Granta-519 necessiten dosis menors de gemcitabina que de fludarabina per aconseguir el mateix efecte citotòxic. De fet, les dosis de fludarabina requerides són molt més altes que les utilitzades en el tractament de la LLC, que es troben al voltant d'1 µg/ml. La darrera línia de LCM, NCEB-1, no respon a cap dels dos fàrmacs. Aquesta manca de resposta és deguda segurament a les alteracions en la maquinària apoptòtica, ja que, tal com s'ha comentat prèviament, aquesta línia presenta mutacions en el gen p53 i en l'ATM. La línia cel.lular JVM-2 tampoc respon a la gemcitabina, tanmateix, tot i tractar-se d'una línia derivada de leucèmia pro-limfocítica, l'efecte citotòxic de la fludarabina també és molt baix. Tenint en compte els resultats obtinguts en la LLC, aquesta baixa resposta a la fludarabina podria ser deguda a una menor captació de l'anàleg mitjançada per hENT2. De fet, les cèl.lules JVM-2 són molt menys sensibles a fludarabina, en comparació amb altres línies derivades de LLC com les WSU (Biswal et al., 2000).

Per tal de completar la caracterització de les línies cel.lulars de LCM ens vam proposar l'anàlisi cinètic de la captació, tant de nucleòsids naturals com d'anàlegs. El nucleòsid natural escollit per a fer les mesures de transport va ser la uridina, ja que té unes afinitats similars per hENT1 i hENT2. En tractar-se d'un nucleòsid poc metabolitzable, el transport és lineal durant minuts, per tant, el temps escollit per a les mesures de captació va ser de 2 minuts. El transport dels anàlegs fludarabina i gemcitabina també es va realitzar discriminant entre les dues components equilibratives, per tal de determinar quina de les dues podia tenir un paper important en la sensibilitat i alhora, si hi havia diferències entre els dos anàlegs. En aquests cas els transports es van fer utilitzant temps curts d'incubació (10 segons) (**Figura 23**).

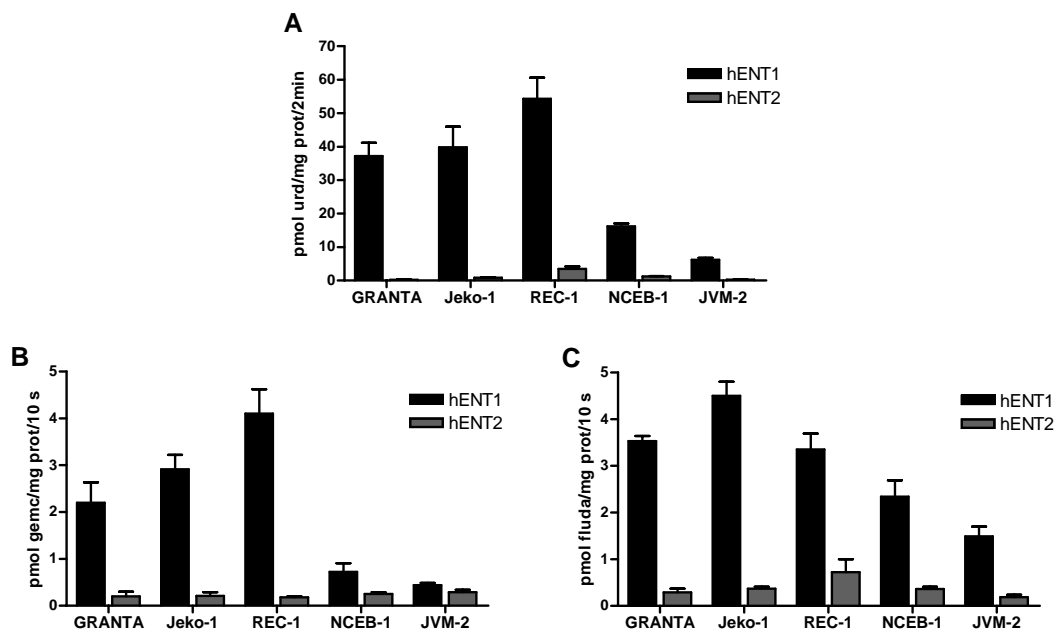


Figura 23. Caracterització del transport equilibratiu de nucleòsids en les cèl.lules de LCM. Les cèl.lules es van incubar amb uridina **(A)**, gemcitabina **(B)** i fludarabina **(C)** a una concentració 1 μ M. El temps d'incubació va ser de 2 minuts per la uridina i de 10 segons en el cas dels anàlegs de nucleòsid. La contribució dels transportadors equilibratius es va mesurar utilitzant 1 μ M de NBTI per discriminar entre la component sensible a NBTI (hENT1) i la component insensible (hENT2). Els resultats són la mitjana \pm SE de tres a cinc experiments independents mesurats per triplicat.

Els resultats obtinguts mostren que malgrat totes les línies cel.lulars expressen hENT2 la seva activitat és pràcticament negligible, el que podria ser degut, en part, a una localització intracel.lular d'hENT2, en concordança amb resultats descrits en cèl.lules endotelials (Aguayo et al., 2005). No obstant, aquesta característica també es troba amb les isoformes concentratives, ja que tal com s'ha comentat prèviament diversos tipus cel.lulars expressen l'ARNm tot i que no es detecta activitat dependent de sodi (Garcia-Manteiga et al., 2003; Mackey et al., 2005). D'altra banda, analitzant el transport dels anàlegs podem observar que les taxes de transport de fludarabina són lleugerament superiors a les de gemcitabina. En tots els substrats, però, s'observa una elevada variabilitat entre les línies cel.lulars analitzades. Per tant, vam decidir comprovar si hi havia algun tipus de correlació entre el transport i els nivells d'expressió de proteïna i d'ARNm, principalment d'hENT1, que és la isoforma responsable de la captació dels nucleòsids **(Figura 24)**.

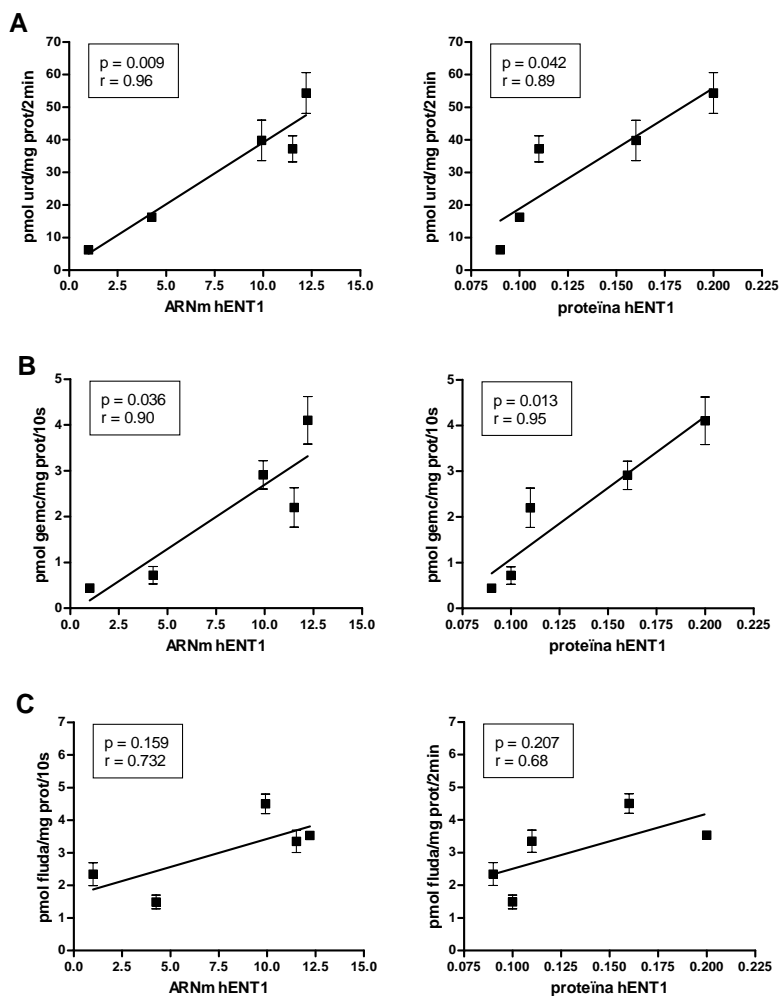


Figura 24. Correlació entre el transport d'uridina (A), de gemcitabina (B) i de fludarabina (C) i els nivells d'expressió d'ARNm i de proteïna d'hENT1. En les gràfiques s'indiquen els coeficients de correlació i els valors de p.

El transport d'uridina i el de gemcitabina correlacionen de manera significativa tant amb els nivells de proteïna com amb els d'ARNm del transportador hENT1. Per contra, el transport de fludarabina no presenta cap tipus de correlació amb aquests valors. Aquests resultats suggeririen un paper diferencial dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs. No obstant, en cap dels substrats analitzats el transport mitjançat per la isoforma hENT2 correlaciona amb l'ARNm o amb la proteïna del transportador. De fet, com ja hem comentat prèviament, les taxes de transport són moltes baixes i en alguns casos pràcticament negligibles.

El paper diferencial dels transportadors en la sensibilitat a anàlegs es demostra al correlacionar l'efecte citotòxic d'aquests fàrmacs amb els diferents paràmetres analitzats dels transportadors equilibratius, ARNm, proteïna i activitat. Així doncs, mentre la sensibilitat a gemcitabina en les cèl.lules de LCM correlaciona amb els nivells d'ARNm i de proteïna d'hENT1 i, sobretot, amb el transport de gemcitabina mitjançat pel transportador hENT1 (**Figura 25**), la sensibilitat a fludarabina no correlaciona amb cap d'aquestes dades, com tampoc ho fa amb els paràmetres del transportador hENT2.

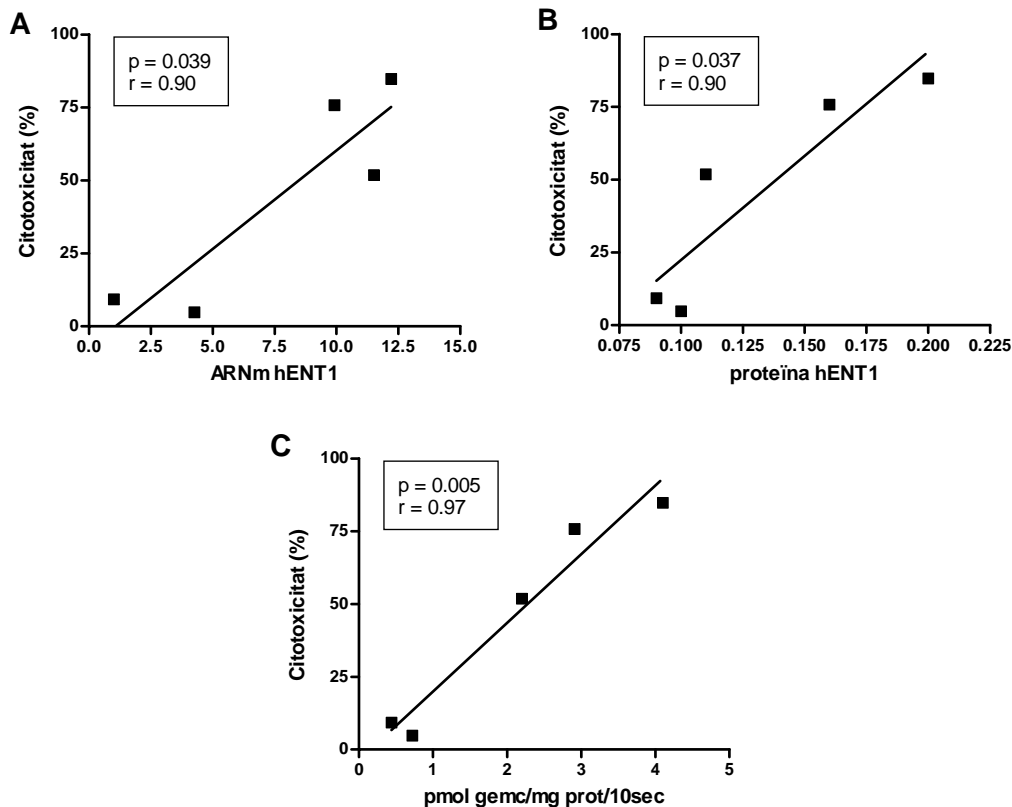


Figura 25. Correlació entre la sensibilitat a gemcitabina i l'ARNm, la proteïna i l'activitat d'hENT1. La sensibilitat a gemcitabina (5 µg/µl), expressada com el percentatge de cèl.lules apoptòtiques després de 24 hores de tractament, es va representar respecte als nivells d'ARNm d'hENT1 (A), l'expressió de la proteïna hENT1 (B) i el transport de gemcitabina en les cèl.lules de LCM (C). En les gràfiques s'indiquen els coeficients de correlació i els valors de p.

Aquests resultats demostren que el transportador hENT1 té un paper important en la sensibilitat a gemcitabina en cèl.lules de LCM, mentre que aquesta relació no es troba quan el fàrmac és la fludarabina. Estudis previs han suggerit que els nivells d'hENT1 són determinants en l'acció citotòxica d'alguns anàlegs de nucleòsids. Així, Mackey i col.laboradors van demostrar que el transportador hENT1 era necessari en el tractament amb gemcitabina en línies cel.lulars limfoides (Mackey et al., 1998). Més recentment, s'ha demostrat que l'expressió del transportador hENT1 correlacionava amb una major supervivència després del tractament amb gemcitabina en tumor de pàncreas (Spratling et al., 2004). En aquest cas, i a diferència dels resultats obtinguts amb hENT2 en LLC, la correlació es troba tant amb els nivells d'ARNm com de proteïna. Fins i tot, i de manera similar a la LLC, el transport mesurat amb 10 segons d'incubació correlaciona amb la sensibilitat mesurada a les 24 hores.

En concordança amb aquests resultats, i dins del marc de la tesi doctoral de Sílvia Marcé, es va fer una anàlisi similar en mostres de 22 pacients de LCM. En aquest cas també es va trobar una correlació significativa entre els nivells d'ARNm d'hENT1 i la sensibilitat a gemcitabina. Tanmateix, la correlació amb l'expressió de proteïna no va ser significativa, possiblement degut al baix nombre de mostres, ja que en l'anàlisi només es van tenir en compte aquelles cèl.lules que eren sensibles al tractament amb gemcitabina.

Així doncs, malgrat tractar-se d'una malaltia que no respon de manera eficient a les diferents teràpies, les cèl·lules de LCM responen millor a gemcitabina que a fludarabina, i en aquelles cèl·lules sensibles al tractament amb gemcitabina el transportador hENT1 sembla tenir un paper important.

No deixa de ser sorprenent, però, que malgrat el transport de fludarabina en les línies cel·lulars de LCM també és mitjançat majoritàriament per la isoforma hENT1, no existeix cap tipus de correlació amb la sensibilitat. En concordança, un anàlisi realitzat en leucèmia limfoblàstica aguda va demostrar que l'expressió del transportador hENT1 correlacionava amb la sensibilitat a citarabina però no a cladribina (Wright et al., 2002). Aquests resultats reafirmarien la hipòtesi plantejada anteriorment de què podria haver-hi una direccionalitat dels nucleòsids en funció del transportador implicat en la seva captació i per tant, la fludarabina captada a través d'hENT2 seria més eficaç que aquella que és internalitzada mitjançant hENT1. Així doncs, l'anàlisi del paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat no només s'ha de centrar en la caracterització de les isoformes presents en cada tipus de càncer, sinó també en el tipus d'anàleg de nucleòsids administrat.

3. ANÀLISI FARMACOGENÒMIC DEL PAPER DEL TRANSPORTADOR hENT1 EN LA SENSIBILITAT A FLUOROPIRIMIDINES

Entendre els mecanismes pels quals els fàrmacs utilitzats en quimioteràpia produeixen la mort de la cèl.lula i, alhora, per què els tumors poden esdevenir resistents a aquests fàrmacs és un pas essencial cap a la millora terapèutica i la predicció de la resistència. Recentment, la utilització de tècniques que faciliten l'avaluació de centenars o milers de gens alhora ha permès avançar en aquest camp del coneixement. Alguns d'aquests estudis es centren en la utilització de la tècnica de microarrays d'ADN per analitzar els canvis transcripcionals produïts pel tractament amb un agent quimioterapèutic. Així, Rosenwald i col.laboradors (2004) van determinar 27 gens expressats de manera diferencial després del tractament amb fludarabina en cèl.lules de pacients de LLC. No obstant, en el moment d'inici d'aquest treball pràcticament no hi havia estudis on s'avalués l'efecte dels anàlegs de nucleòsids mitjançant una aproximació farmacogenòmica. Per aquest motiu ens vam plantejar com a objectiu utilitzar la tècnica de microarrays d'ADN per analitzar la resposta transcriptòmica produïda pel tractament amb fàrmacs derivats de nucleòsids.

D'altra banda, tal com s'ha anat comentant al llarg d'aquesta memòria, perquè els anàlegs de nucleòsids exerceixin el seu efecte citotòxic és necessari, en primer lloc, el transport mitjançant a través de la membrana plasmàtica. De fet, els resultats presentats en el capítol anterior demostren que els transportadors de nucleòsids tenen un paper important en la sensibilitat a anàlegs. A més, les dades semblen indicar que el transportador implicat podria variar en funció del tipus cel.lular i del fàrmac utilitzat. Una hipòtesi que explicaria aquesta resposta diferencial podria ser la direccionalitat dels nucleòsids i dels seus anàlegs en funció del transportador responsable de la seva captació. En el nostre grup de recerca estudis realitzats en macròfags suggereixen que durant la proliferació, el transportador ENT1 aporta nucleòsids a l'ADN, mentre que les isoformes concentratives ho fan a l'ARN (Soler et al., 2001a). En base a aquestes evidències, la següent qüestió que ens vam plantejar va ser si un transportador de nucleòsids podia contribuir a la resposta transcripcional associada a la teràpia amb anàlegs de nucleòsids. A l'hora de plantejar-nos el disseny experimental diversos motius van fer que escollíssim hENT1 com el transportador d'estudi. D'una banda, la majoria de treballs presents en la bibliografia apunten cap a hENT1 com la isoforma que té un major paper en la sensibilitat a anàlegs. D'altra banda, el seu paper en proliferació, principal diana dels anàlegs de nucleòsids, sembla demostrat. Finalment, hENT1 presenta l'avantatge, respecte els altres transportadors, de poder ser inhibible farmacològicament amb NBTI.

Com a model vam escollir la línia derivada de tumor de mama MCF7 tractada amb l'anàleg de nucleòsid 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR). La 5'-DFUR és un intermediari del fàrmac capecitabina, que s'utilitza àmpliament en el tractament de tumors sòlids. L'avantatge d'utilitzar aquest model és que la 5'-DFUR és el precursor directe de l'agent citotòxic 5-fluorouracil (5-FU), la resposta transcriptòmica del qual ja ha estat analitzada en

diversos estudis (Mariadason et al., 2003; Maxwell-PJ, Longley et al., 2003; Park et al., 2004). De fet, en el moment de la realització d'aquest treball, en el grup de recerca del Dr. José Palacios en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) s'estaven realitzant experiments de microarrays d'ADN en el mateix model utilitzant com a fàrmac 5-FU. Per tant, la utilització de 5'-DFUR en els nostres experiments ens proporcionava una informació addicional, al poder comparar els nostres resultats amb els obtinguts amb el 5-FU, que no és substrat dels transportadors de nucleòsids.

Els transportadors de nucleòsids presents en la línia cel.lular MCF7 no s'havien descrit fins aleshores; en conseqüència, el primer objectiu que ens vam plantejar va ser la caracterització cinètica de la línia. El transport en funció del temps de diferents nucleòsids naturals ens va permetre determinar si la línia tenia activitat concentrativa i, en el cas d'un resultat positiu, saber de quina o quines isoformes es tractava (**Figura 26**).

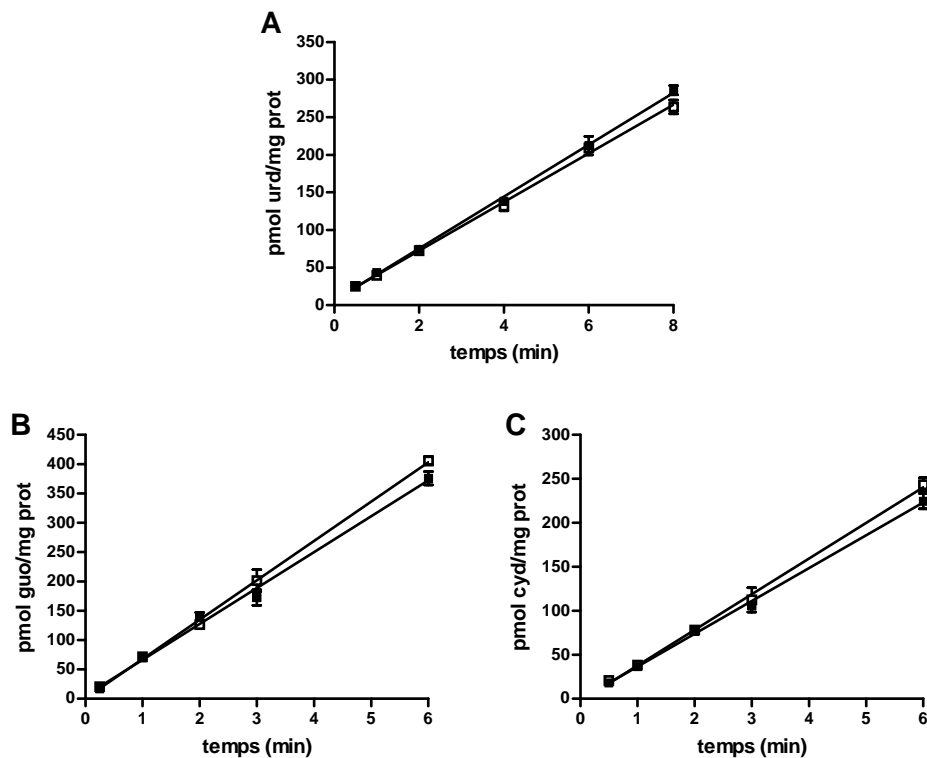


Figura 26. Transport d'uridina (A), guanosina (B) i citidina (C) en funció del temps en les cèl.lules MCF7. Les cèl.lules es van incubar amb el nucleòsid 1 μ M amb medi en presència (■) o absència (□) de sodi. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments independents mesurats per quadruplicat.

Els resultats demostren que el transport és lineal durant uns quants minuts i, alhora, que aquest és mitjançat exclusivament per transportadors equilibratius, ja que en cap dels tres nucleòsids avaluats es va detectar una activitat dependent de sodi. Per comprovar si, tot i no haver-hi activitat, hi havia expressió de les isoformes concentratives vam utilitzar la PCR a temps real. Aquesta es va realitzar 24, 48 i 72 hores després de sembrar 20,000 cèl.lules/cm², per tal d'analitzar si les diferències en densitat cel.lular afectaven els nivells d'expressió d'alguna de les isoformes (**Figura 27**). En cap d'aquestes condicions les cèl.lules presentaven activitat dependent de sodi (dades no mostrades).

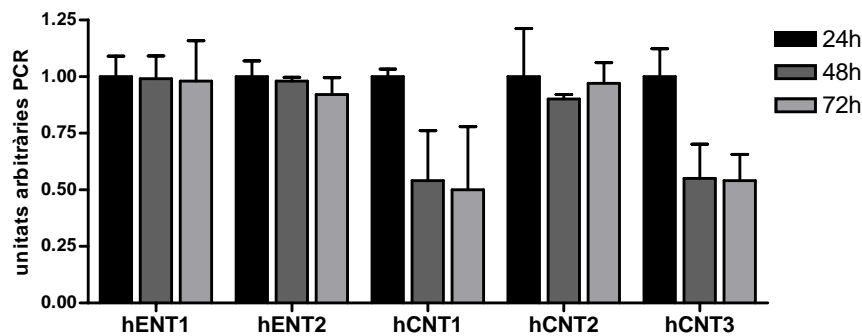


Figura 27. Patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en la línia MCF7. Les cèl.lules es van sembrar a una densitat de 20,000 cèl.lules/cm² i els nivells d'expressió dels 5 transportadors de nucleòsids es van analitzar a les 24, 48 i 72 hores. Els valors de C_T obtinguts per a cada transportador han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant el punt de 24 hores com a control de referència. Els resultats són la mitjana ± SE de tres experiments independents.

Sorprenentment, malgrat les cèl.lules MCF7 no presenten activitat dependent de sodi, expressen l'ARNm de les tres isoformes concentratives. Addicionalment, la densitat cel.lular afecta els nivells d'expressió de hCNT1 i hCNT3, produint una disminució de la quantitat d'ARNm. En concordança amb aquests resultats, en altres tipus cel.lulars també s'ha descrit que l'expressió de l'ARNm de les components concentratives no sempre va lligada a la presència de l'activitat corresponent (Garcia-Manteiga et al., 2003). Un exemple mostrat anteriorment són les cèl.lules de LLC en les que es detecta l'expressió del transportador hCNT3, però no la seva activitat. En aquest sentit, dins del marc de la tesi doctoral d'Ivette Aymerich, la caracterització de la línia de colon Caco-2 va mostrar l'expressió de les isoformes concentratives, si bé no es detectava activitat dependent de sodi.

Amb la finalitat de determinar els principals transportadors responsables de la captació de 5'-DFUR, vam realitzar en primer lloc un transport d'aquest anàleg d'uridina en funció del temps (**Figura 28A**). Els resultats van mostrar que la linealitat del transport es perdia abans del minut de captació, possiblement degut al metabolisme de l'anàleg i que, tal com era d'esperar, el transport era mitjançat per les isoformes equilibratives. Per tal de discriminar entre les components equilibratives, vam realitzar un experiment de transport d'uridina i de 5'-DFUR en presència de NBTI. El temps d'incubació utilitzat va ser de 15 segons, per tal de mantenir les condicions de velocitat inicial de la captació de 5'-DFUR. Similarment, la captació d'uridina també es va mesurar als 15 segons, ja que això ens permetia comparar les diferents taxes de transport (**Figura 28B**).

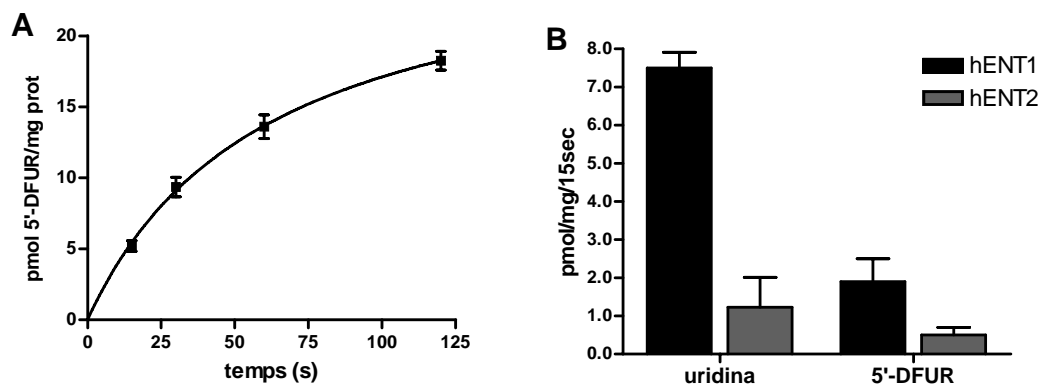


Figura 28. Transport de 5'-DFUR en les cèl.lules MCF7. (A) Les cèl.lules es van incubar diferents temps amb 5'-DFUR 1 μ M amb medi en presència o absència de sodi. En no detectar-se transport dependent de sodi es mostra únicament el transport equilibratiu. **(B)** Les cèl.lules es van incubar amb uridina i 5'-DFUR 1 μ M durant 15 segons. Les components equilibratives es van discriminar mitjançant NBTI 100 nM. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per quadruplicat.

Els resultats indiquen que el transport del nucleòsid natural és unes quatre vegades major que el de 5'-DFUR. D'altra banda, en ambdós substrats el transport és mitjançat majoritàriament per la component sensible a NBTI hENT1, mentre que la captació deguda a la isoforma hENT2 suposa aproximadament un 20 % de la captació total.

Estudis anteriors realitzats en el nostre grup de recerca havien demostrat que 5'-DFUR era substrat del transportador d'alta afinitat hCNT1 amb una K_m de 209 μ M (Mata et al., 2001), si bé, l'afinitat d'aquest anàleg per les isoformes equilibratives no ha estat determinada. Per aquest motiu, ens vam plantejar avaluar l'afinitat de 5'-DFUR pels transportadors hENT1 i hENT2 mitjançant estudis d'inhibició del transport (**Figura 29**). El transport d'hENT1 es va determinar mesurant la captació d'uridina 1 μ M en presència i absència de NBTI, mentre per a hENT2 es va utilitzar un substrat específic d'aquest transportador, la nucleobase hipoxantina, en presència i absència de dipiridamol.

El fet d'haver utilitzat dos substrats diferents per als estudis d'inhibició fa que no puguem comparar directament els valors d' IC_{50} obtinguts. Per tant, per a comparar les afinitats dels transportadors hENT1 i hENT2 per 5'-DFUR es van calcular els valors de K_i utilitzant l'equació de Cheng-Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973),

$$K_i = IC_{50}/(1+[S]/K_{0.5}^S)$$

on $K_{0.5}^S$ és la constant d'afinitat per a la uridina i la hipoxantina i [S] és la concentració de substrat utilitzada en les mesures de transport. En aquest model la K_m per a la uridina és de 208 μ M, mentre que la de la hipoxantina és de 308 μ M. A partir d'aquestes dades, els valors de K_i obtinguts són 486 μ M per a hENT1 i 1020 μ M per a hENT2, el que indica que el transportador hENT1 reconeix 5'-DFUR amb major afinitat que hENT2.

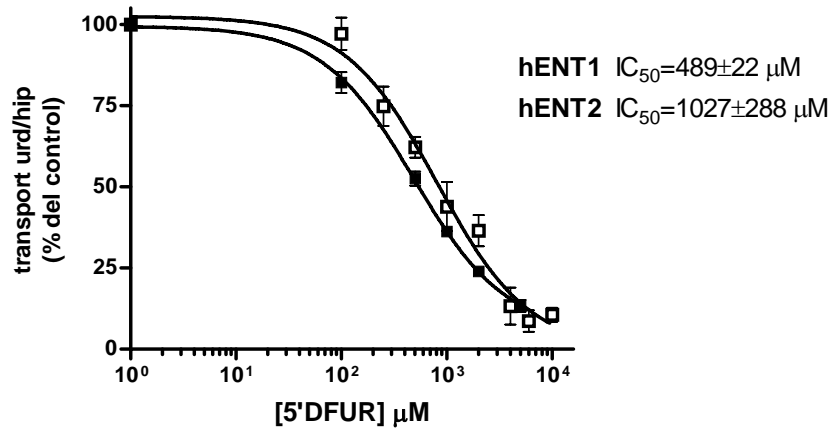


Figura 29. Inhibició dels transportadors hENT1 i hENT2 amb 5'-DFUR. Les cèl.lules MCF7 es van incubar durant 1 minut en medi sense sodi amb uridina o hipoxantina 1 µM en presència de concentracions creixents de 5'-DFUR. La component mitjançada per hENT1 (■) es va determinar com la diferència entre el transport d'uridina en presència o absència de NBTI 100 nM. Mentre que hENT2 (□) correspon a la diferència entre el transport d'hipoxantina amb o sense dipiridamol 10 µM. Els resultats es mostren com a percentatge respecte a les cèl.lules que no s'han incubat amb 5'-DFUR. Els resultats són la mitjana ± SE de cinc experiments independents mesurats per quadruplicat.

Una vegada caracteritzada cinèticament la línia cel.lular MCF7, així com el transport de 5'-DFUR, el següent objectiu va ser determinar la sensibilitat de les cèl.lules a l'anàleg mitjançant experiments de citotoxicitat. A diferència de la majoria de treballs de la bibliografia, en els que les cèl.lules estan en contacte amb el fàrmac durant 24 ó 48 hores, vam decidir utilitzar un temps curt de tractament (90 minuts) per dos motius. D'una banda aquests tractaments són més propers als que es poden trobar *in vivo*. De fet, el pic de concentració de 5'-DFUR en plasma es dona una hora després de l'administració oral de capecitabina (825 mg/m²), mentre que a les tres hores aquest pràcticament no es detecta (Reigner et al., 2003). D'altra banda, en minimitzar els possibles fenòmens de difusió passiva que poden existir en temps llargs d'incubació, aquestes condicions permeten avaluar millor el paper que els transportadors de nucleòsids poden jugar en la sensibilitat als fàrmacs.

La citotoxicitat de la 5'-DFUR es va mesurar per recompte cel.lular 48 hores després d'un tractament de 90 minuts amb concentracions creixents del fàrmac (**Figura 30A**). Per tal de determinar el paper del transportador hENT1, la seva activitat es va inhibir mitjançant NBTI. Addicionalment, i amb l'objectiu d'avaluar si hi havia una resposta similar entre la utilització de temps de tractament curts i els que hi ha majoritàriament en la bibliografia vam realitzar un experiment equivalent incubant les cèl.lules amb el fàrmac durant 24 hores (**Figura 30B**).

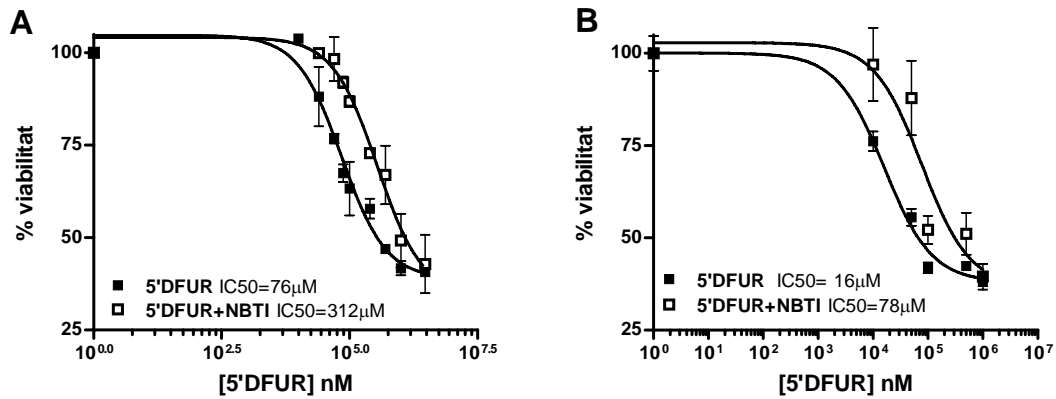


Figura 30. Citotoxicitat de la 5'-DFUR en les cèl.lules MCF7. Les cèl.lules es van sembrar a una densitat de 20,000 cèl.lules/cm² i 24 hores després es van tractar amb concentracions creixents de 5'-DFUR en absència (■) o presència (□) de NBTI 100 nM durant 90 minuts (A) ó 24 hores (B). En cas que fos necessari, les cèl.lules es van pre-incubar amb NBTI abans de l'addició del fàrmac. La viabilitat cel.lular es va mesurar per recompte cel.lular 48 hores després de l'inici del tractament. Els resultats es mostren com a percentatge de cèl.lules viables respecte a les cèl.lules que no s'han incubat amb 5'-DFUR. Els resultats són la mitjana ± SE de dos a tres experiments independents mesurats per quadruplicat.

Els resultats demostren que la inhibició del transportador hENT1 produeix un increment de quatre cops de la IC₅₀ (76±1 μM i 312±12 μM, respectivament). La NBTI també protegeix de l'acció citotòxica de la 5'-DFUR en les cèl.lules MDA-MB-435s i de la gemcitabina en diverses línies cel.lulars (Mackey et al., 1998; 2002). D'altra banda, quan el tractament es realitza durant 24 hores la resposta és similar, el que demostra la importància del transport mitjançat del fàrmac en la seva citotoxicitat. Tanmateix, el fet que les cèl.lules estiguin molt més temps en contacte amb el fàrmac produeix una baixada de la IC₅₀.

Diferents estudis han demostrat que l'addició d'inhibidors de les isoformes equilibratives pot modificar la sensibilitat als anàlegs de nucleòsids, evitant la sortida del fàrmac a través d'aquests transportadors bidireccionals o bé modificant les concentracions intracel.lulars de nucleòsids naturals (Dagnino et al., 1990; Crawford et al., 1990). Malgrat que en el nostre model experimental la NBTI només està en contacte amb les cèl.lules durant 90 minuts vam decidir confirmar que les diferències de sensibilitat eren degudes a la inhibició del transport de 5'-DFUR i no a alteracions dels nivells de nucleòsids. Com s'ha comentat prèviament, la 5'-DFUR és el precursor immediat de l'agent citotòxic 5-FU que, en tractar-se d'una nucleobase, no és substrat dels transportadors de nucleòsids. Així doncs, per tal de demostrar el paper del transport en la sensibilitat vam realitzar un experiment equivalent a l'anterior utilitzant com a fàrmac 5-FU (Figura 31). En aquest cas la inhibició del transportador hENT1 no disminueix la sensibilitat al 5-FU, el que reafirma que és el bloqueig de l'activitat equilibrativa el que produeix una baixada de la IC₅₀ en el tractament amb 5'-DFUR.

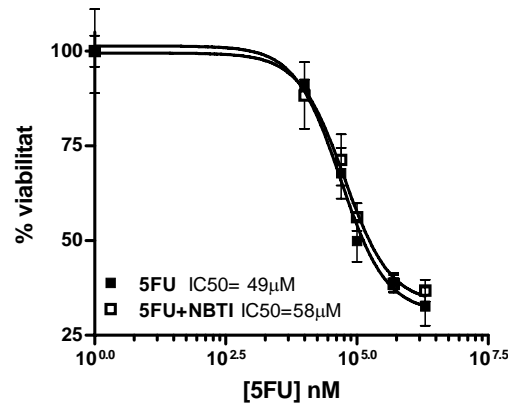


Figura 31. Citotoxicitat del 5-FU en les cèl·lules MCF7. Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents de 5-FU en absència (■) o presència (□) de NBTI 100 nM durant 90 minuts i la viabilitat cel·lular es va mesurar per recompte cel·lular a les 48 hores. Els resultats es mostren com a percentatge de cèl·lules viables, respecte a les cèl·lules que no s'han incubat amb 5-FU. Els resultats són la mitjana ± SE de dos experiments independents mesurats per quadruplicat.

En base als resultats obtinguts vam decidir utilitzar aquest model per a l'anàlisi transcryptòmic del paper d'hENT1 en la sensibilitat a 5'-DFUR. Les condicions escollides van ser 90 minuts de tractament amb 5'-DFUR 250 μM en absència o presència de NBTI. Es va decidir utilitzar una concentració de fàrmac que correspon aproximadament a la IC₇₅ en considerar que en la condició amb NBTI els efectes produïts per una concentració de 75 μM (valor d'IC₅₀ sense NBTI) podrien ser molt baixos. D'aquesta manera la concentració escollida de 250 μM correspon aproximadament a la IC₅₀ del tractament amb NBTI. L'efecte del fàrmac es va analitzar a temps curts, 4 hores, i temps llargs, 24 hores.

Per tal de caracteritzar amb més detall els efectes produïts pel 5'-DFUR, en el mateix moment de l'extracció de l'ARN pels experiments de microarrays, es van analitzar els canvis produïts en el cicle cel·lular (**Figura 32**).

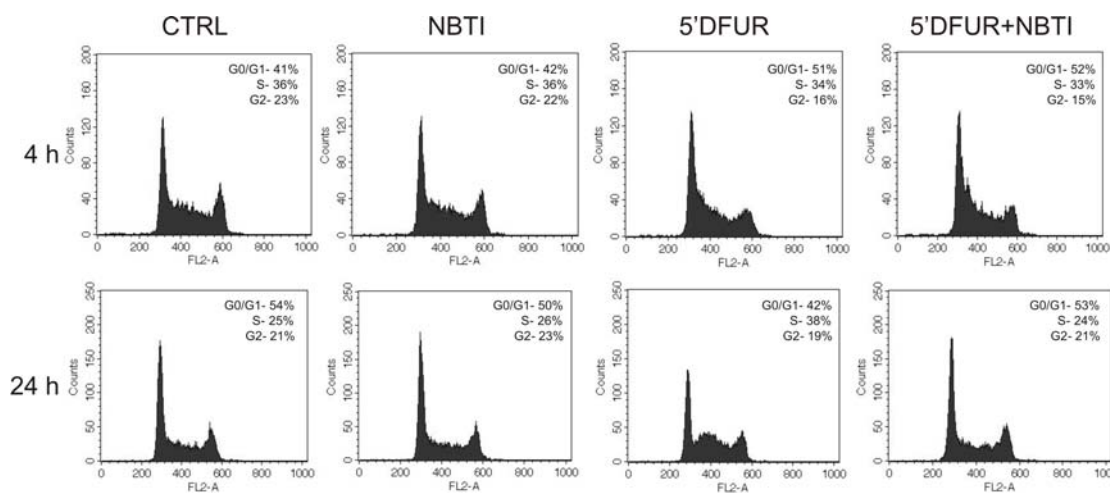


Figura 32. Efecte de la 5'-DFUR en el cicle cel·lular. Les cèl·lules es van sembrar a una densitat de 20,000 cèl·lules/cm² i 24 hores després es van tractar amb 5'-DFUR 250 μM en absència o presència de NBTI 100 nM durant 90 minuts. A les 4 i 24 hores des del començament del tractament les cèl·lules es van fixar amb etanol 70%. El contingut d'ADN es va mesurar utilitzant marcatge amb iodur de propidi i el posterior anàlisi en un citòmetre de flux. Es mostra un experiment representatiu.

A les 4 hores de l'inici del tractament s'observa que la 5'-DFUR produeix un lleuger augment de les cèl.lules en fase G₁ del cicle (del 41 al 51%), que no es bloqueja per l'addició de NBTI. D'altra banda, a les 24 hores es detecta una clara acumulació de cèl.lules en fase S (del 25 al 38%), en concordança amb resultats descrits prèviament per al 5-FU (Backus et al., 2000). Per contra, quan s'inhibeix el transportador hENT1, els valors són similars als obtinguts en el control (24%).

Paral·lelament, vam decidir avaluar els efectes del tractament en la inducció de l'apoptosi, mitjançant el marcatge amb annexina V. Els resultats obtinguts a les 24 hores van mostrar que el tractament amb 5'-DFUR no produïa mort cel.lular, sinó únicament una parada en el creixement. En la recerca bibliogràfica realitzada no vam trobar estudis que analitzessin la inducció de l'apoptosi mitjançada per 5'-DFUR, però sí per 5-FU, si bé la majoria la mesuraven passades les 48 hores. En conseqüència, vam decidir comprovar que passava en aquest temps en el nostre model. D'altra banda, donat que l'efecte dels tractaments curts no havia estat descrit, vam analitzar en paral·lel la inducció d'apoptosi produïda per un tractament de 48 hores amb la 5'-DFUR (**Figura 33**).

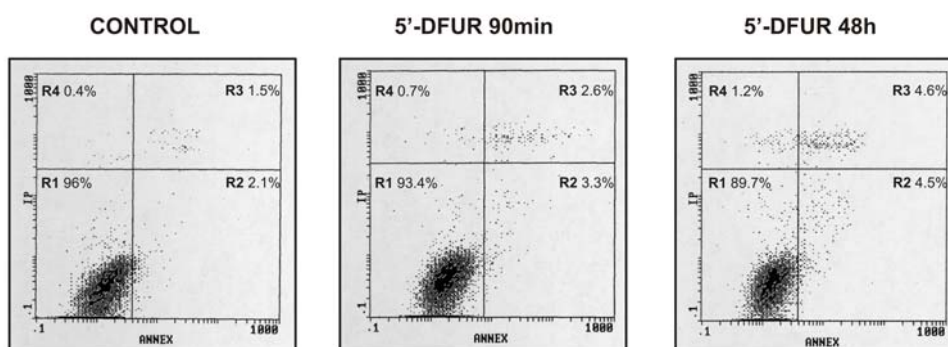


Figura 33. Anàlisi de les cèl.lules apoptòtiques a les 48 hores. Les cèl.lules es van sembrar a una densitat de 20,000 cèl.lules/cm² i 24 hores després es van tractar amb 5'-DFUR 250 µM en absència o presència de NBTI 100 nM durant 90 minuts o 48 hores. A les 48 hores es va analitzar la inducció de l'apoptosi per doble marcatge amb annexina V (eix X) i iodur de propidi (eix Y). R1 (anexina -, IP -), cèl.lules viables; R2 (anexina +, IP -), cèl.lules apoptòtiques; R3 (anexina +, IP +), cèl.lules mortes. Els valors de percentatge que es mostren corresponen a la mitjana de dos experiments independents.

Els resultats obtinguts a les 48 hores mostren que, similarment a les 24 hores, no hi ha una clara inducció de l'apoptosi. No obstant, si considerem les cèl.lules marcades amb annexina V (R2 + R3) podem comprovar que la diferència entre el tractament de 90 minuts i el de 48 hores no és molt gran (5.9% i 9.1%, respectivament), el que indicaria que la manca d'apoptosi en el nostre model no és deguda a que el temps de tractament és massa curt. Tot i que no es mostra en la figura, les cèl.lules tractades amb 5'-DFUR+NBTI van donar uns valors de viabilitat similars al control. Anàlogament, Kugawa i col.laboradors (2004) van analitzar la mort cel.lular produïda per diferents fàrmacs en les cèl.lules MCF7. Les dades van mostrar que el tractament continuat amb 5-FU (200 µM) no produeix una apoptosi clara fins als 4 dies, mentre que l'efecte d'altres agents citotòxics és més ràpid. Malgrat que les cèl.lules MCF7 es caracteritzen per la presència de mutacions en la caspasa 3 (Kurokawa et al., 1999), s'ha demostrat la mort per apoptosi a través de les

caspases 9, 7 i 6 (Liang et al., 2001). A més, la línia cel.lular MCF7 s'ha utilitzat àmpliament com a model de tumor de mama en l'estudi de l'apoptosi (Simstein et al., 2003).

Com s'ha comentat prèviament l'objectiu principal d'aquest capítol és la utilització de la tecnologia de microarrays d'ADN per a determinar els canvis transcripcionals produïts pel tractament amb 5'-DFUR i alhora avaluar el paper del transportador hENT1 mitjançant la inhibició de la seva activitat. Per tant, un cop caracteritzat el model i definit el disseny experimental ja es podia procedir a la realització de l'experiment de microarrays. En el nostre cas les cèl.lules MCF7 es van tractar amb 5'-DFUR 250 μ M en presència o absència de NBTI i els ARN corresponents es van extreure 4 i 24 hores després de l'inici del tractament, el que fan un total de 8 punts experimentals (**Figura 34A**). L'ARN es va extreure de dos experiments independents i, tal com es detalla en l'apartat de Materials i Mètodes, amb cada ARN es van hibridar dos arrays, utilitzant un marcatge recíproc (**Figura 34B**). Així doncs, per a cada condició experimental es van hibridar 4 microarrays.

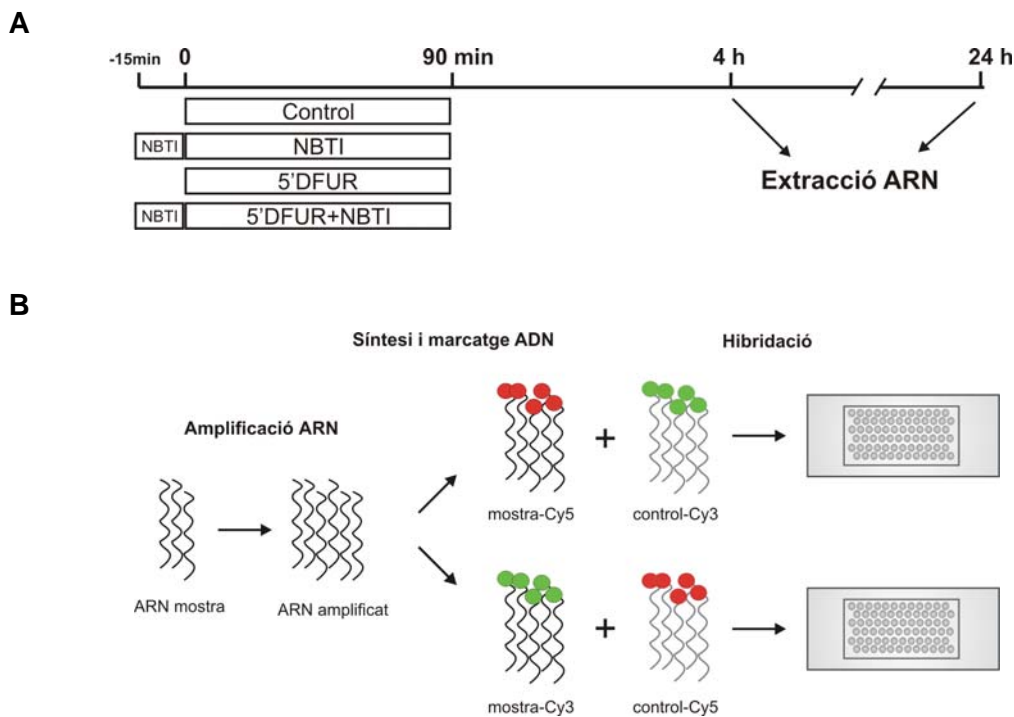


Figura 34. Disseny experimental dels microarrays d'ADN en les cèl.lules MCF7. (A) Protocol de tractament de les cèl.lules. Es van realitzar tractaments de 90 minuts amb 5'-DFUR 250 μ M en presència o absència de NBTI 100 nM. Els ARN de dos experiments independents es van extreure a les 4 i 24 hores. **(B)** Els ARN obtinguts es van amplificar i amb cadascun es van hibridar dos microarrays, un amb marcatge Cy3 i l'altre Cy5.

L'array utilitzat, l'OncoChip™ del CNIO, està format per 9,300 gens relacionats amb càncer, col.locats en un total de 27,648 sondes. Les característiques principals de l'array, així com els protocols de marcatge, hibridació i normalització es detallen en l'apartat de Materials i Mètodes. En la **figura 35** es mostra la imatge d'un dels arrays hibridats.

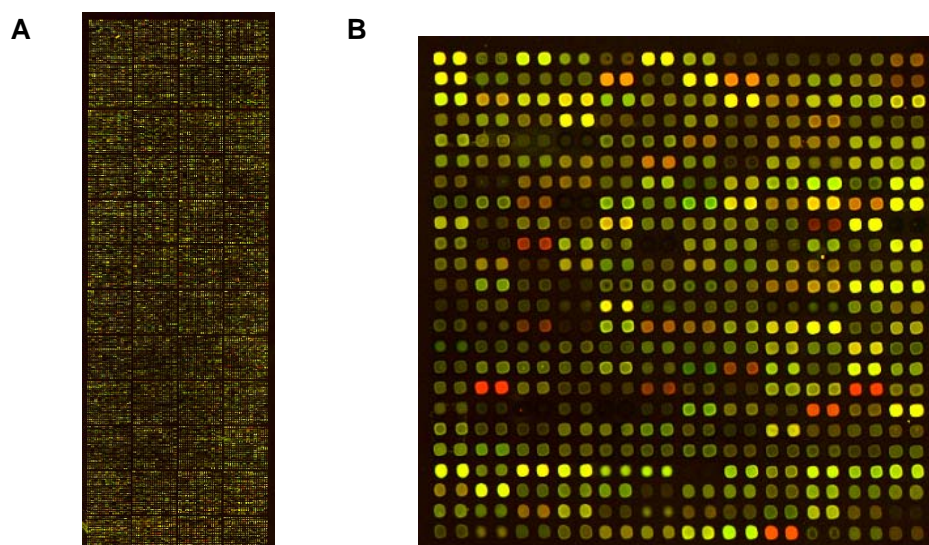


Figura 35. Imatge d'un microarray (A) i ampliació d'un dels blocs (B). La mostra es va marcar amb el fluorocrom Cy5 (vermell) i el control universal amb Cy3 (verd).

Un cop normalitzats els valors i abans del processat de les dades era necessari fer les mitjanes dels duplicats dels arrays i referir-les als seus respectius controls, 4 i 24 hores. En el nostre cas, els valors de cada condició es van referir a la mitjana dels controls del seu experiment i a continuació es va fer la mitjana dels quatre arrays de cada condició experimental. Finalment, es van eliminar aquells punts que tenien un error estàndard major del 15%. Tenint en compte els punts perduts per problemes en la hibridació o perquè no donaven senyal i els eliminats després de realitzar les mitjanes, ens van quedar aproximadament el 90% dels punts inicials. La llista de gens obtinguda és la que es va utilitzar en el processat de les dades.

L'exploració inicial de les dades utilitzant l'eina de processat, que es detalla en els Materials i Mètodes, va revelar que la 5'-DFUR no alterava l'expressió de la majoria de gens de l'Oncochip. De fet, l'anàlisi indicava que hi havia 40 gens que incrementaven els seus nivells d'expressió en un 75% i 28 que els disminuïen. L'anàlisi de cluster jeràrquic no supervisat es va realitzar utilitzant el servidor Sotarray. El cluster obtingut té dos branques principals, una que conté tots els punts de 4 hores i l'altre els de 24 hores. Addicionalment, en cada branca les condicions 5'-DFUR i 5'-DFUR+NBTI estan agrupades (**Figura 36A**). L'anàlisi amb detall dels gens modificats indica que la majoria de canvis en l'expressió gènica s'obtenen per acció de la 5'-DFUR a les 24 hores. Tanmateix, les alteracions produïdes a les 4 hores es troben principalment en el control amb NBTI, si bé podria tractar-se de falsos positius, ja que per problemes en les hibridacions només hi ha els valors de dos arrays de la condició NBTI 4h. En la **figura 36B** es resumeix el nombre de gens transcripcionalment regulats en cada condició experimental.

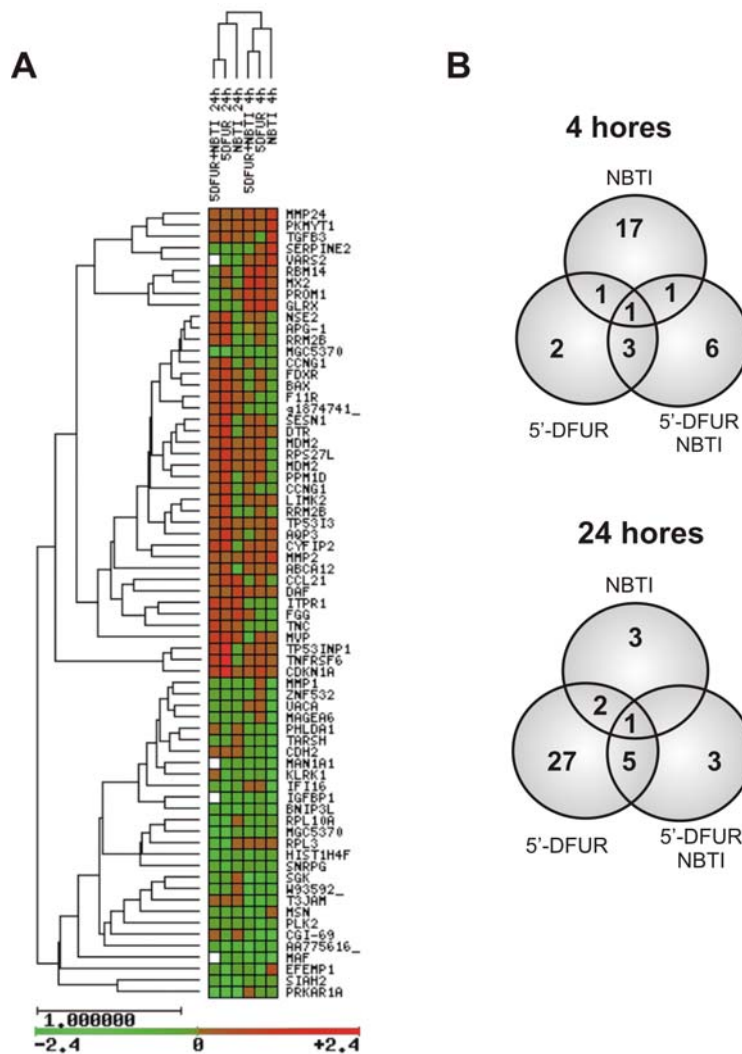


Figura 36. (A) Anàlisi de cluster dels patrons d'expressió gènica. Cluster jeràrquic no supervisat de 68 gens, l'expressió dels quals difereix com a mínim en un 75% (0.8 cops) respecte al seu control, 4 ó 24 hores. El símbol de cada gen s'indica a la dreta. **(B) Diagrama del nombre de gens regulats a les 4 i 24 hores** després d'un tractament de 90 minuts amb 5'-DFUR 250 μ M, en presència o absència de NBTI 100nM.

Així doncs, els experiments de microarrays van permetre identificar 68 gens, dels 9300 analitzats, com gens transcripcionalment regulats per l'acció de la 5'-DFUR. Malgrat el nombre de gens pugui semblar reduït en comparació amb altres experiments realitzats en línies cel.lulars, els resultats obtinguts són consistents amb estudis previs en els que s'han utilitzat altres fàrmacs derivats de nucleòsids. Rosenwald i col.laboradors (2004) van analitzar cèl.lules de pacients de LLC abans i després del tractament amb fludarabina, obtenint 27 gens transcripcionalment modificats. Similarment, només 23 gens presentaven els seus nivells d'expressió alterats després del tractament amb 5-FU en tumors de mama (Troester et al., 2004). Els mateixos autors van obtenir uns 1000 gens induïts després d'un tractament llarg amb 5-FU 300 μ M en la línia cel.lular MCF7. Per tant, el fet que el nombre de gens obtinguts en els nostres experiments s'aproximi més als determinats en estudis realitzats *in vivo* demostra que el protocol de tractament amb temps curts s'aproxima més al que s'utilitza *in vivo*.

Degut a que el nostre interès es centra en els efectes de la 5'-DFUR, no es van tenir en compte aquells gens que es troben alterats per l'acció de la NBTI. En conseqüència, podem observar que la majoria de canvis en l'expressió gènica es van obtenir a les 24 hores, mentre que poques variacions són evidents a les 4 hores. Resultats similars es mostraven en l'anàlisi dels efectes de la fludarabina en les cèl.lules de LLC, on els autors no van detectar canvis evidents en l'expressió gènica a les 3 i 6 hores del tractament (Rosenwald et al., 2004). Anàlogament, el 5-FU (300 µM) va produir poques variacions transcripcionals en les cèl.lules MCF7 a les 3 hores (Troester et al., 2004). En la **taula 4** es mostren els principals gens que presenten una alteració en els seus nivells d'expressió a les 24 hores.

Símbol gènic	NBTI	5'DFUR	5'DFUR +NBTI	Gen
EFEMP1	-0.06	-1.09	-0.04	EGF-cont fibulin-like extracel matrix prot 1
RPL3	0.03	-1.02	-0.70	proteïna ribosomal L3
RPL10A	0.10	-0.82	-0.75	proteïna ribosomal L10a
SNRPG	-0.10	-0.81	-0.25	ribonucleoproteïna petita nuclear polipèptid G
HIST1H4F	-0.06	-0.45	-0.81	histona 1, H4f
TP53I3	0.02	0.80	0.23	proteïna induïble per p53 3
APG-1	-0.08	0.80	0.36	proteïna <i>heat shock</i> (família hsp110)
BAX	0.18	0.83	0.49	proteïna X associada a BCL-2
RRM2B	-0.21	0.87	0.16	ribonucleòtid reductasa M2 B (induïble per p53)
FDXR	0.03	0.90	0.53	ferredoxina reductasa
PPM1D	-0.31	0.92	0.28	proteïna fosfatasa 1D dependent de magnesi
G1874741	0.28	0.96	0.38	seqüència transcrita
F11R	0.27	0.97	0.49	receptor F11
LIMK2	-0.01	1.03	0.07	quinasa 2 del domini LIM
CYFIP2	-0.09	1.08	0.84	proteïna d'interacció citoplàsmica 2 FMR1
CCNG1	-0.12	1.15	0.39	ciclina G1
MDM2	0.04	1.18	0.30	Mdm2, proteïna d'unió a p53
AQP3^a	0.04	1.23	0.29	aquaporina 3
RPS27L	0.25	1.26	0.50	proteïna ribosomal S27-like
DTR	-0.06	1.29	0.58	receptor de la tòxina diftèrica
SESN1	-0.03	1.29	0.42	sestrina 1
TNFRSF6	-0.04	2.28	0.83	receptor de la família del TNF, membre 6 (FAS)
CDKN1A	0.07	2.54	0.69	inhibidor de la ciclina quinasa-dependent 1A (p21, Cip1)
TP53INP1	-0.29	2.56	0.77	proteïna nuclear 1 induïble per p53

Taula 4. Principals gens induïts o reprimits en les cèl.lules MCF7 a les 24 hores. Els resultats es mostren en logaritme en base 2 referits al control de 24 hores. Els gens relacionats amb p53 s'han escrit en negreta. ^a No s'ha demostrat la relació d'AQP3 amb p53, però sí amb p73.

Els resultats mostren que l'activació de l'expressió gènica sembla ser la resposta més comú a l'acció de la 5'-DFUR. Dins d'aquests, 13 gens han estat identificats prèviament com dianes de p53 involucrades en l'apoptosi (TP53I3/PIG3, TNFRSF6/FAS, TP53INP1), l'arrest del cycle cel.lular (CDKN1A/p21) i el metabolisme de xenobiòtics (FDXR) (Polyak et al., 1997; el-Deiry, 1998; Zhao et al., 2000; Okamura et al., 2001; Liu and Chen, 2002). Similarment, en la línia cel.lular derivada de colon HCR116, el tractament amb 5-FU 375 µM modifica l'expressió d'un gran nombre de gens, 41 dels quals són

regulats per p53. A més, 11 d'aquests gens també han estat identificats com dianes de la 5'-DFUR en els nostres experiments de microarrays, incloent-hi alguns amb una relació desconeguda amb el 5-FU, com CYF1P2 (Kho et al., 2004)

Alhora els resultats obtinguts indiquen que la majoria dels increments produïts per l'acció de la 5'-DFUR són parcial o totalment bloquejats quan l'activitat d'hENT1 s'inhibeix. El resultat no deixa de ser sorprenent si tenim en compte que, tot i que en menor grau, la 5'-DFUR també és captada a l'interior cel·lular mitjançant el transportador hENT2 i que la dosi utilitzada en els experiments correspon aproximadament al valor d'IC₅₀ quan el transportador hENT1 es troba bloquejat.

El darrer pas dels experiments de microarrays és la validació dels resultats obtinguts mitjançant altres tècniques semi-quantitatives o quantitatives. El primer objectiu va ser demostrar l'activació de p53, ja que la majoria de gens són diana d'aquesta proteïna. De fet, els nivells de p53 són regulats post-transcripcionalment, per tant, l'acumulació de p53 com a conseqüència del dany en l'ADN és majoritàriament deguda a un augment de l'estabilitat de la proteïna (Mosner et al., 1995), pel que vam decidir avaluar els canvis en la quantitat de proteïna mitjançant western blot. Addicionalment, vam utilitzar la mateixa tècnica per comprovar si l'increment observat en l'ARNm de Bax es correlacionava amb un augment en els nivells de la corresponent proteïna pro-apoptòtica. Paral·lelament, com a control vam avaluar els canvis en la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2, que no presentava uns nivells d'ARNm modificats (**Figura 37**).

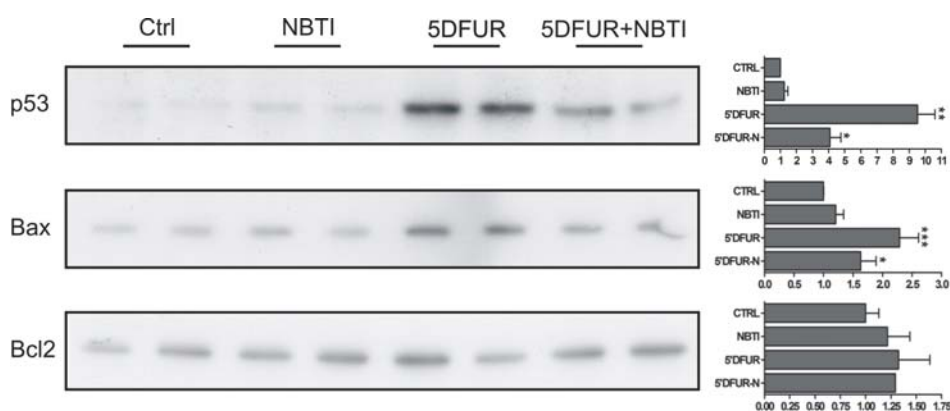


Figura 37. Anàlisi de western blot de p53, Bax i Bcl2, 24 hores després d'un tractament de 90 minuts amb 5'-DFUR 250 μ M. La inducció produïda pel tractament es va quantificar densitomètricament. Els resultats (mitjana \pm SE de tres a cinc experiments independents) es mostren com unitats arbitràries normalitzades a la α -tubulina i al control (cèl·lules no tractades). La seva significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. Es mostra un western blot representatiu.

Els resultats mostren un clar augment de la proteïna de p53, així com de Bax, mentre que no hi ha variació en l'expressió de Bcl-2. A més, la inhibició de l'activitat d'hENT1 produeix un clar bloqueig en l'increment de les proteïnes, tot i que aquests no assolixen els valors del control. Addicionalment i en concordança amb altres treballs realitzats amb 5-FU que demostren que p53 i p21 són dianes primerenques de l'acció

d'aquest fàrmac (Osaki et al., 1997), en el nostre model els increments de la proteïna p53 es detecten ja a les 4 hores (**Figura 38**).

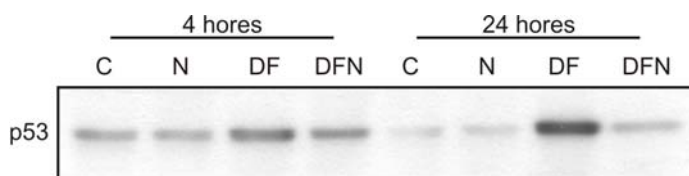


Figura 38. Anàlisi de western blot de p53 4 i 24 hores després d'un tractament de 90 minuts amb 5'-DFUR 250 µM. C, control; N, NBTI 100 nM; DF, 5'-DFUR 250 µM; DFN, 5'-DFUR 250 µM + NBTI 100 nM.

Mdm2 (*murine double minute gene*) és una de les proteïnes mes importants en la regulació de p53 en bloquejar la seva activitat transcripcional i promoure la degradació de la proteïna p53 a través de la via del proteasoma (Kubbutat et al., 1997). De fet, es tracta d'un mecanisme d'autoregulació, ja que s'ha descrit que p53 incrementa l'expressió del gen MDM2 (Barak et al., 1993), el que concorda amb els resultats obtinguts en els microarrays d'ADN. La comprovació de què l'augment en els nivells d'expressió de l'ARNm observat per l'acció de la 5'-DFUR corresponia amb un increment de la proteïna es va realitzar mitjançant immunocitoquímica, ja que la proteïna presenta una localització nuclear (**Figura 39**).

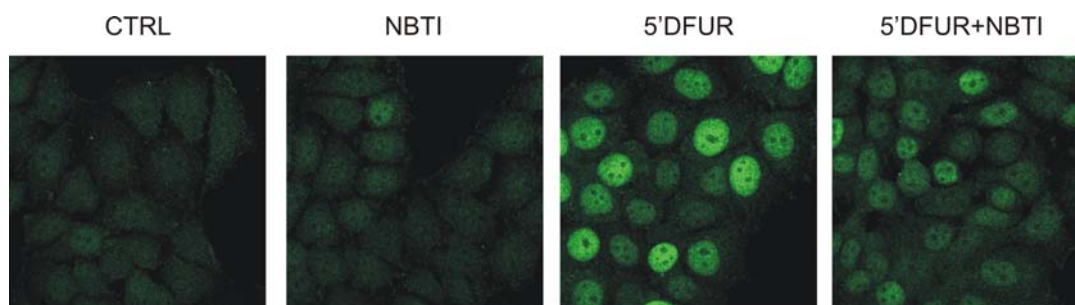


Figura 39. Immunocitoquímica de Mdm2 en les cèl.lules MCF7. Les cèl.lules es van tractar 90 minuts amb 5'-DFUR 250 µM en presència o absència de NBTI 100 nM. A les 24 hores l'expressió i localització de Mdm2 es va analitzar tal com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes.

Els resultats obtinguts demostren que l'increment en els nivells d'expressió de MDM2 es correlaciona amb un clar augment en la quantitat proteïna, que es localitza principalment en el nucli. Addicionalment, i en concordança amb els resultats obtinguts en els estudis de microarrays, l'addició de NBTI bloqueja de manera considerable l'augment dels nivells de proteïna.

A continuació vam validar mitjançant PCR a temps real la inducció de l'expressió dels gens de CDKN1A/p21, TNFRSF6/FAS i AQP3, tant a les 4 com a les 24 hores (**Figura 40**).

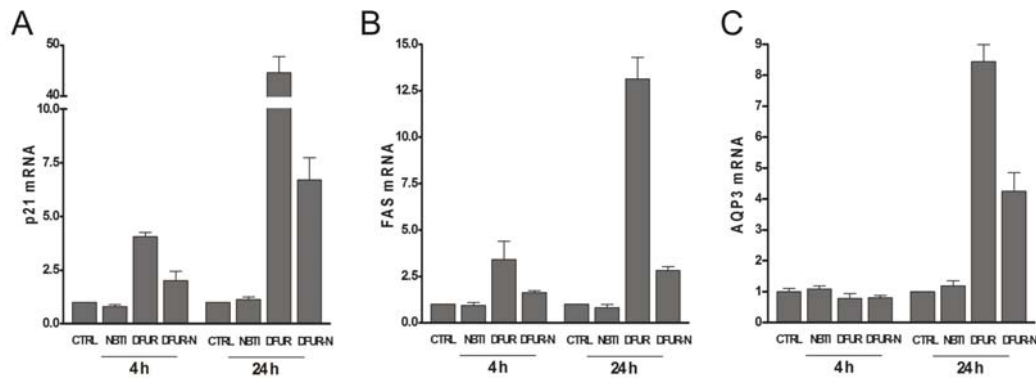


Figura 40. Anàlisi de l'expressió de p21 (A), FAS (B) i AQP3 (C) per PCR a temps real. Els valors de C_T de cada gen s'han normalitzat respecte al control endògen (GAPDH). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant els controls de 4 i 24 hores com referència. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments independents.

La inducció de l'expressió de p21 deguda a l'acció d'agents citotòxics i la conseqüent parada del cycle cel.lular ha estat descrita per a un elevat nombre de fàrmacs, inclòs el 5-FU (Osaki et al., 1997; Kho et al., 2004). A més, tal com s'ha comentat prèviament, es tracta d'una resposta primerenca, el que concorda amb l'increment d'ARNm que observem a les 4 hores. De manera similar, el paper del receptor de la mort FAS també ha estat demostrat tant en l'acció del 5-FU com de la capecitabina, pro-fàrmac precursor de la 5'-DFUR (Ciccolini et al., 2002; Longley et al., 2004). De fet, diferents estudis apunten cap a la via mitocondrial com a la principal en l'apoptosi induïda per fàrmacs amb l'excepció del 5-FU. En aquest cas, la mort cel.lular com a conseqüència de la depleció de timidina es produeix a través de la via de senyalització de FAS (Houghton et al., 1997; Simstein et al., 2003). Per contra, el darrer gen validat per PCR a temps real, l'aquaporina 3, no havia estat descrit prèviament com a diana de cap fàrmac, si bé la seva expressió està regulada per p73, membre de la família de p53 (Zheng and Chen, 2001). Malgrat no es coneix la seva relació amb el 5-FU aquest canal d'aigua podria estar involucrat en l'increment de volum que es produeix com a conseqüència del tractament amb 5'-DFUR. D'altra banda, diversos autors s'han centrat en l'anàlisi del paper de les aquaporines en el desenvolupament d'alguns tipus de càncer, com el colorectal (Moon et al., 2003). Dins d'aquest context sembla raonable considerar el gen d'AQP3 com a candidat per a un estudi amb més profunditat del seu paper en la sensibilitat a 5'-DFUR. De fet, els estudis s'han començat a realitzar en el marc de la tesi doctoral de Laia Trigueros.

La validació dels gens TP53I3, RRM2B, PPM1D, FDXR i TP53INP1 es va realitzar mitjançant RT-PCR semi-quantitativa (**Figura 41**). Per tal de minimitzar la variabilitat de la tècnica cada mostra es va avaluar per duplicat.

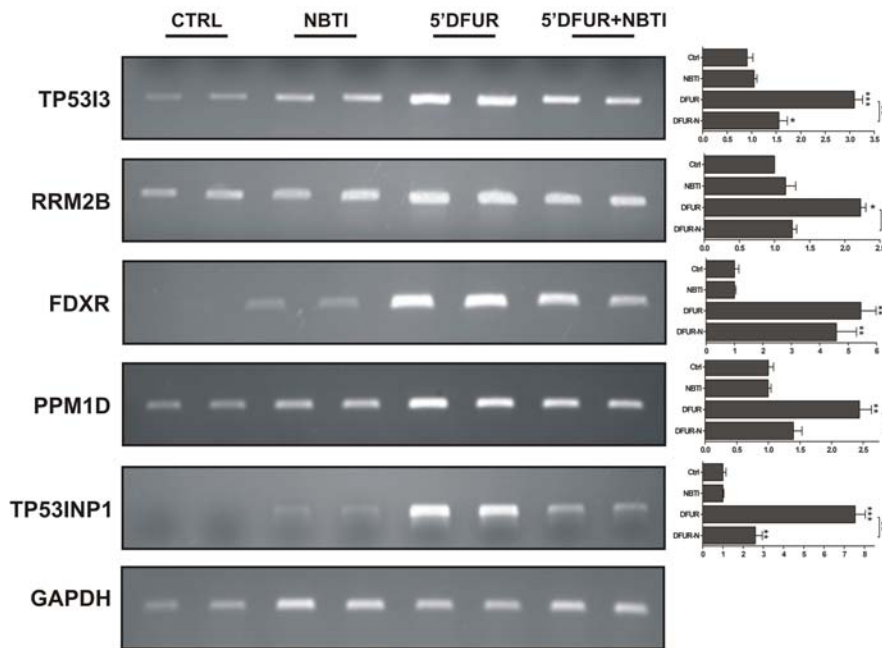


Figura 41. Anàlisi de RT-PCR semi-quantitativa de TP53I3, RRM2B, FDXR, PPM1D i TP53INP1, 24 hores després d'un tractament de 90 minuts amb 5'-DFUR. La inducció produïda pel tractament es va quantificar densitomètricament. Els resultats (mitjana \pm SE de tres a cinc experiments independents) es mostren com unitats arbitràries normalitzades a la GAPDH i al control (cèl.lules no tractades). La seva significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$. Es mostra una RT-PCR representativa.**

Malgrat els gens validats són regulats per p53, presenten funcions diferents. Així, la RRM2B correspon a la subunitat M2 dependent de p53 de la ribonucleòtid reductasa, que està involucrada en la reparació de l'ADN (Guittet et al., 2001). La FDXR participa en el metabolisme de xenobiòtics i codifica per una proteïna mitocondrial que inicia el transport d'electrons cap al citocrom P450 (Liu and Chen, 2002). La PPM1D és una Ser/Thr fosfatasa que actua com a regulador negatiu en resposta a l'estrès cel.lular. Es tracta d'un mecanisme de *feed-back* negatiu, ja que p53 incrementa l'expressió de PPM1D, que regula l'activitat de la MAPK p38, que a la seva vegada redueix la fosforilació de p53 (Bulavin et al., 2002). El gen TP53I3/PIG3 codifica per una oxidoreductasa involucrada en l'apoptosi mitjançada per p53 (Flatt et al., 2000). Similarment, TP53INP1 participa en l'apoptosi, tot i que la seva funció exacta no està definida (Okamura et al., 2001). Les dades mostren que malgrat tres gens s'indueixen en la condició de 5'-DFUR+NBTI, en tots els casos, excepte en la FDXR, el bloqueig de la NBTI en l'activació transcripcional de la 5'-DFUR és estadísticament significatiu.

El gen RPL3, que codifica per la proteïna ribosomal L3, és dels pocs gens obtinguts en els experiments de microarrays que disminueix la seva expressió com a conseqüència del tractament amb 5'-DFUR i, alhora, que no ha estat descrit prèviament com a diana del 5-FU. A més, els resultats semblen indicar que la disminució de la seva expressió, així com la de RPL10A, no es veu bloquejada per l'addició de la NBTI. Per corroborar les dades obtingudes vam decidir utilitzar una tècnica més sensible, la PCR a temps real (**Figura 42**).

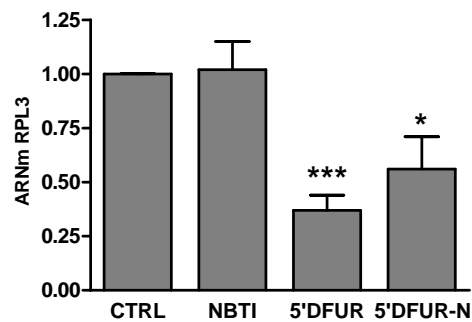


Figura 42. Anàlisi de l'expressió de RPL3 per PCR a temps real, a les 24 hores del tractament amb 5'-DFUR. Els valors de C_T s'han normalitzat respecte al control endògen (GAPDH). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant el control com a referència. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents. La seva significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student.

Els resultats demostren que la 5'-DFUR disminueix l'expressió de la RPL3 i que la NBTI no bloqueja aquesta acció, ja que les diferències entre ambdues condicions no són estadísticament significatives. La 5'-DFUR té dos efectes principals, la inhibició de la timidilat sintasa, amb el conseqüent dany en l'ADN, i la incorporació a l'ARN. Malgrat no s'ha descrit directament una disminució de les proteïnes ribosomals, la incorporació del 5-FU a l'ARN produeix toxicitat a diferents nivells (Kanamaru et al., 1986; Doong and Dolnick, 1988). En concordança, agents de dany de l'ADN poden induir respostes d'estrès genèric que inclouen la repressió de gens que codifiquen per proteïnes ribosomals (Gasch et al., 2000). Tenint en compte que la 5'-DFUR pot actuar via l'ADN o l'ARN, que diversos estudis han demostrat un paper del transportador hENT1 en proliferació (Cass et al., 1979; Pressacco et al., 1995b; Soler et al., 2001a) i que les disminucions en l'expressió de les proteïnes ribosomals són els únics canvis transcripcionals que no són bloquejats per la inhibició d'hENT1, podríem hipotetitzar que l'acció de la 5'-DFUR captada pel transportador hENT2 aniria majoritàriament a través de la incorporació en l'ARN. D'altra banda els resultats obtinguts en les validacions indiquen que la NBTI pràcticament no afecta la inducció de la FDXR, involucrada en el metabolisme de xenobiòtics (Liu and Chen, 2002). Per contra, la inhibició d'hENT1 bloqueja totalment l'increment de la RRM2B, subunitat de la ribonucleòtid reductasa que s'ha descrit que estaria involucrada en la reparació de l'ADN (Guittet et al., 2001). Per tant, aquestes dades reafirmarien la hipòtesi de la direccionalitat dels nucleòsids en funció del transportador responsable de la captació.

Malgrat que en el processat de les dades es va escollir un valor de tall baix (0.8) comparat amb la majoria d'estudis de microarrays, les validacions realitzades utilitzant altres tècniques han confirmat l'augment d'expressió dels gens seleccionats i, de fet, els valors d'increment d'expressió obtinguts han estat generalment superiors als determinats mitjançant l'anàlisi farmacogenòmic. Per aquest motiu vam tornar a analitzar les dades dels microarrays utilitzant valors de tall inferiors, amb l'objectiu de determinar si es trobava alterada l'expressió d'algun gen d'interès. Els resultats van permetre identificar gens descrits prèviament com a diana de l'acció del 5-FU. Així per exemple, BBC3/PUMA, que codifica per una proteïna pro-apoptòtica de la família Bcl-2, i GADD45, implicat en la

regulació del cicle cel.lular, s'indueïen un 66% i un 50% respectivament. Per a confirmar l'increment de l'ARNm de GADD45A vam utilitzar la RT-PCR semiquantitativa (**Figura 43**).

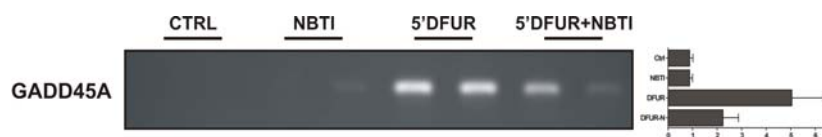


Figura 43. Anàlisi per RT-PCR semi-quantitativa de GADD45A, 24 hores després d'un tractament de 90 minuts amb 5'-DFUR. Les anàlisis i càlculs es van fer de manera equivalent als indicats en la Figura 41. Es mostra una RT-PCR representativa.

Tal com s'ha comentat prèviament i dins el marc de la tesi doctoral d'Héctor Hernández, en el grup del Dr. José Palacios en el CNIO, en el mateix moment que hibridavem els nostres microarrays s'estava realitzat un estudi similar utilitzant com a fàrmac el 5-FU. Malgrat el protocol de tractament era completament diferent (24 hores d'exposició continuada a 5-FU 10 μ M), vam decidir comparar els resultats obtinguts. Sorprenentment, els gens mostrats en la taula 4, amb l'excepció de TP53I3, BAX i F11R, presentaven també alterats els seus nivells d'expressió per l'acció del 5-FU. D'aquests, alguns gens com p21 o FAS presentaven uns nivells d'inducció superiors, mentre d'altres, com la FDXR, eren inferiors. Aquests resultats, conjuntament amb les dades de la bibliografia, ens permeten concloure que els canvis en l'expressió gènica produïts per la 5'-DFUR són similars als provocats pel 5-FU. Cal remarcar que 90 minuts de tractament són capaços d'activar tant p53 com gens dependents d'aquesta proteïna amb funcions diverses, com la parada del cicle cel.lular (p21), receptors de la mort (FAS), proteïnes que produeixen canvis mitocondrials (BAX, BBC3/PUMA) i fins i tot espècies reactives d'oxigen (TP53I3/PIG3), demostrant que l'activació transcripcional de moltes dianes del fàrmac no requereix temps d'exposició llargs.

El segon objectiu plantejat en aquest capítol va ser comprovar si el transportador de nucleòsids hENT1 podia contribuir a la resposta transcripcional associada a la teràpia amb 5'-DFUR. Els resultats obtinguts demostren que la inhibició d'hENT1 bloqueja de manera considerable l'efecte de la 5'-DFUR, de fet, en el cas de p21 i de Fas la inhibició és de més del 80%. A més, malgrat la dosi utilitzada correspon aproximadament a la IC₅₀ quan l'activitat d'hENT1 es troba inhibida, en aquestes condicions no només es troba disminuïda l'activació transcripcional sinó també altres paràmetres com la parada en fase S del cicle cel.lular. Per tant, els resultats suggereixen que hENT1 és necessari per l'acció citotòxica de la 5'-DFUR en les cèl.lules de tumor de mama MCF7.

4. EFECTE DELS ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS SOBRE L'EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS

Estudis del nostre grup d'investigació han posat de manifest la regulació dels transportadors de nucleòsids en funció de l'assequibilitat de substrat. Així, una dieta lliure de nucleòsids produeix un increment dels nivells de CNT1 en jejúnum i una lleugera disminució de l'expressió hepàtica (Valdes et al., 2000). D'altra banda, la Dra. Sonia Fernández va demostrar que la depleció d'adenosina provoca a temps llargs una activació transcripcional de CNT2 en hepatòcits. Per tant, en condicions en què la disponibilitat de nucleòsids es troba disminuïda, seria d'esperar un increment coordinat del catabolisme d'àcids nuclèics, de la biosíntesi de nucleòsids i del respectiu transport a través de la membrana plasmàtica amb l'objectiu de facilitar la supervivència cel.lular. Tenint en compte que un dels principals mecanismes d'acció dels anàlegs de nucleòsids és l'alteració dels nivells de nucleòtids intracel.lulars, seria raonable pensar que aquests fàrmacs també poden regular l'expressió dels transportadors responsables de la seva captació. De fet, són pocs els estudis que han realitzat aquest tipus d'anàlisis, obtenint en la seva majoria un increment de l'expressió del transportador equilibratiu hENT1 com a conseqüència del tractament (Pressacco et al., 1995b; Petersen et al., 1996).

D'altra banda, com s'ha comentat prèviament, l'acció dels anàlegs de nucleòsids pot tenir diferents efectes, com la parada de cycle cel.lular o la inducció de l'apoptosi (Galmarini et al., 2001b). Dades obtingudes en el nostre grup de recerca apunten cap a una regulació dels transportadors de nucleòsids mitjançada per aquests mecanismes. L'expressió de CNT1 s'adapta al cycle cel.lular i respon a l'estat del metabolisme nucleòtidic, incrementant els seus nivells de proteïna en la transició G₁-S (Valdes et al., 2002). Similarment, en macròfags de medul.la òssia l'agent pro-apoptòtic LPS incrementa tant l'activitat com l'expressió dels transportadors concentratius CNT1 i CNT2 (Soler et al., 2001a).

En base a aquest antecedents, ens vam plantejar com a objectiu d'aquest capítol estudiar l'efecte del tractament amb anàlegs de nucleòsids sobre l'expressió dels transportadors de nucleòsids. Com a model vam escollir la línia cel.lular derivada de tumor de mama, prèviament caracteritzada, MCF7. L'avantatge d'utilitzar aquesta línia és que, malgrat només presentar activitat equilibrativa, expressa l'ARNm dels tres transportadors concentratius, hCNT1, hCNT2 i hCNT3. Per tant, els anàlegs de nucleòsids podrien ser capaços de modular la inserció en la membrana plasmàtica d'alguna d'aquestes isoformes. Els fàrmacs escollits van ser la 5'-DFUR i la gemcitabina, ja que presenten mecanismes d'acció diferents i els seus efectes en aquesta línia cel.lular havien estat prèviament estudiats en el nostre grup de recerca.

Degut a que la nostra hipòtesi suggereix que els anàlegs de nucleòsids podrien regular l'expressió i/o activitat dels transportadors com a conseqüència d'efectes a llarg termini, com la modificació dels *pools* de nucleòtids, la parada de cicle cel.lular o la inducció de l'apoptosi, vam optar per analitzar l'efecte d'aquests fàrmacs sobre l'activitat de transport a les 24 hores. L'elecció de les concentracions de fàrmac es va basar en dades prèvies obtingudes en el nostre grup de recerca. Així, per a la 5'-DFUR es va utilitzar una dosi de 75 μ M, que correspon al valor d'IC₅₀ mesurat a les 48 hores després d'un tractament de 90 minuts (tal com es mostra en la figura 30 del capítol anterior). En el cas de la gemcitabina la dosi equivalent és de 75 nM, valor obtingut dins el marc de la tesi doctoral de Laia Trigueros. Un cop escollides les condicions, les cèl.lules MCF7 es van incubar durant 24 hores amb els anàlegs de nucleòsids i seguidament es van avaluar les variacions en el transport d'uridina (**Figura 44**).

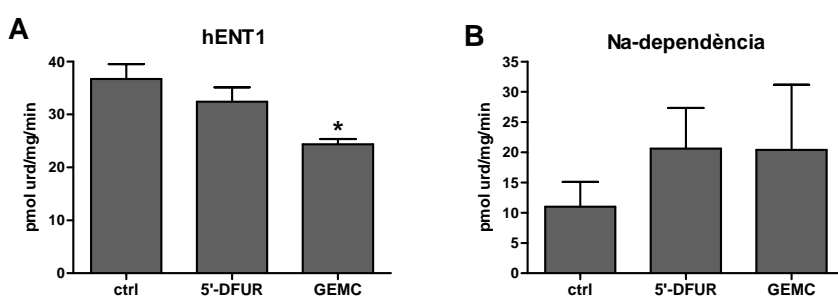


Figura 44. Efecte de la 5'-DFUR i la gemcitabina sobre el transport d'uridina en la línia cel.lular MCF7 a les 24 hores. Les cèl.lules es van incubar durant 24 hores en presència de 5'-DFUR 75 μ M o gemcitabina 75 nM. A continuació es va mesurar el transport d'uridina 1 μ M en medi en presència o absència de sodi durant 1 minut. **(A)** La component mitjançada per hENT1 es va determinar com la diferència entre el transport d'uridina en medi sense sodi en presència o absència de NBTI 1 μ M **(B)** El transport dependent de sodi es va calcular com la diferència entre el transport en medi amb i sense sodi. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per triplicat i la seva significativitat estadística ha estat valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$.

Els resultats mostren que el tractament amb gemcitabina produeix una disminució de l'activitat d'hENT1 que no s'observa quan el fàrmac utilitzat és la 5'-DFUR. Per contra, malgrat les dades no són estadísticament significatives, ambdós anàlegs provoquen un increment en la captació d'uridina dependent de sodi. Per comprovar si aquest efecte augmentava amb el temps vam decidir mesurar el transport d'uridina a les 48 hores. Tanmateix, vam optar per continuar utilitzant un temps d'incubació del fàrmac de 24 hores, evitant així tractaments molt llargs (**Figura 45**). Tal com s'ha tractat en el capítol anterior, en entrar a la cèl.lula la 5'-DFUR es converteix en 5-FU i és aquest el que exerceix la major part de l'acció citotòxica. Per tant, l'anàlisi en paral.lel dels efectes del 5-FU ens permetria avaluar si les variacions d'activitat observades amb la incubació amb la 5'-DFUR eren conseqüència de la seva acció citotòxica o del fet d'administrar un anàleg de nucleòsid.

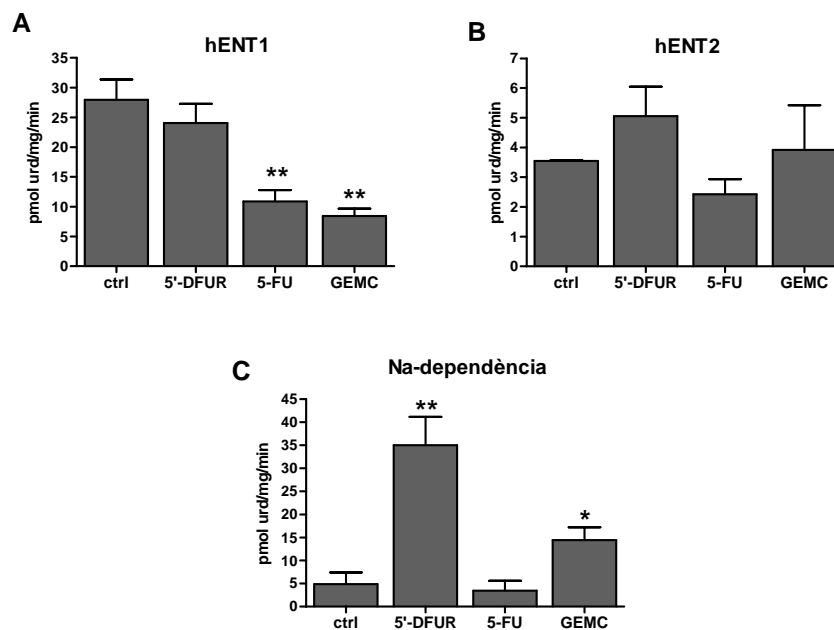


Figura 45. Efecte de la 5'-DFUR, el 5-FU i la gemcitabina sobre el transport d'uridina en la línia cel.lular MCF7 a les 48 hores. Les cèl.lules es van incubar en presència de 5'-DFUR 75 μ M, 5-FU 75 μ M o gemcitabina 75 nM durant 24 hores. A continuació, es va realitzar un canvi de medi i 24 hores després es va mesurar el transport d'uridina 1 μ M durant 1 minut. La contribució de l'activitat equilibrativa es va avaluar utilitzant 1 μ M de NBTI per discriminar entre la component sensible a NBTI (hENT1) (A) i la component insensible (hENT2) (B). El transport dependent de sodi es va calcular com la diferència entre el transport amb medi amb i sense sodi (C). Els resultats són la mitjana \pm SE de tres a cinc experiments independents mesurats per quadruplicat. La seva significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$.

Comprovem que la disminució de l'activitat del transportador hENT1 com a conseqüència de l'acció de la gemcitabina és major a les 48 hores, mentre que la 5'-DFUR no afecta a aquesta isoforma. Sorprenentment, el 5-FU produeix un efecte similar a la gemcitabina. Les dades del tractament amb gemcitabina concorden amb resultats obtinguts dins el marc de la tesi doctoral del Dr. José García Manteiga, on s'observava que el tractament amb aquest anàleg de nucleòsid disminuïa tant l'activitat com els nivells de proteïna del transportador hENT1 en una línia cel.lular derivada de tumor de pàncrees. Addicionalment, i de manera equivalent a les nostres dades no s'obtenien variacions en la isoforma hENT2.

La mesura del transport dependent de sodi ha permès confirmar els resultats obtinguts a les 24 hores. De fet, tant la 5'-DFUR com la gemcitabina produeixen un increment de la captació concentrativa d'uridina, tot i que aquesta és molt major en el cas de la 5'-DFUR. Per contra, l'estudi de les cèl.lules derivades de tumor de pàncrees realitzat pel Dr. José García Manteiga no va revelar cap increment de l'activitat concentrativa com a conseqüència del tractament amb gemcitabina. Similarment als resultats mostrats per hENT1, l'efecte del 5-FU és oposat a l'obtingut amb la 5'-DFUR, ja que aquest no produeix variacions en el transport dependent de sodi. Aquests resultats suggerien que l'acció del 5'-DFUR sobre els transportadors és deguda majoritàriament al

fet de que es tracta d'un anàleg de nucleòsid, tot i que no es pot descartar que el 5-FU i la 5'-DFUR presentin mecanismes d'acció diferents que produeixin la resposta diferencial dels transportadors.

Amb l'objectiu de confirmar que la manca d'acció de la 5'-DFUR sobre la isoforma equilibrativa o el menor increment de l'activitat dependent de sodi mitjançat per gemcitabina no eren conseqüència de les dosis utilitzades vam analitzar l'efecte dels fàrmacs a diferents dosis de tractament (**Figura 46**). Per tal de simplificar l'estudi, i tenint en compte que no observem variacions en l'activitat del transportador hENT2, vam decidir centrar les nostres anàlisis en el transport equilibratiu sensible a NBTI i en la captació dependent de sodi.

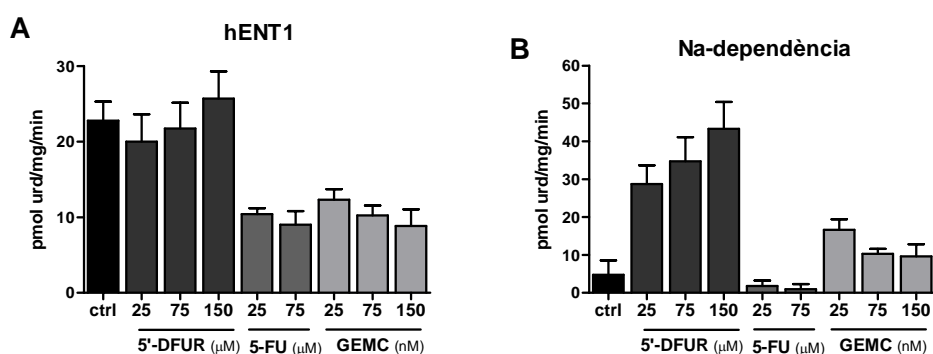


Figura 46. Dosi-resposta de l'efecte de la 5'-DFUR, el 5-FU i la gemcitabina sobre el transport d'uridina en la línia cel.lular MCF7 a les 48 hores. Les cèl.lules es van incubar en presència de diferents dosis de 5'-DFUR, 5-FU o gemcitabina durant 24 hores. A les 48 hores es va analitzar el transport mitjançat per hENT1 (**A**) i el dependent de sodi (**B**) a través de la incubació d'uridina 1 μ M durant 1 minut. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments independents mesurats per quadruplicat.

Les mesures de transport equilibratiu demostren que la 5'-DFUR no afecta l'activitat d'hENT1. D'altra banda, les dosis més baixes de 5-FU i de gemcitabina analitzades inhibeixen ja en un 50% la captació sensible a NBTI i aquest efecte no s'incrementa en augmentar la concentració de fàrmac, el que apuntaria a què en cap cas s'aconsegueix una reducció total del transport mitjançat per hENT1. Per contra, l'increment de l'activitat concentrativa com a conseqüència de l'acció de la 5'-DFUR sí que és dependent de la dosi, mentre que el de la gemcitabina no ho és o té una IC_{50} menor de 25 nM. Aquests resultats suggeririen que l'efecte de la gemcitabina sobre el transport concentratiu és molt menor que el de la 5'-DFUR, si bé no es pot descartar que l'acció de la gemcitabina es trobi ja en un moment de davallada, i que dosis o temps menors produeixin un major increment de l'activitat. Tanmateix, les diferències en els efectes es podrien explicar per la participació de diferents isoformes concentratives, ja que encara no hem avaluat quin o quins transportadors estan regulats, anàlisi que es detallarà posteriorment.

A continuació, vam decidir comprovar si els tractaments curts de 90 minuts, com els utilitzats en el capítol anterior, eren capaços de produir respostes similars als de 24 hores, si bé les mesures de transport es van continuar realitzant a les 48 hores (**Figura 47**).

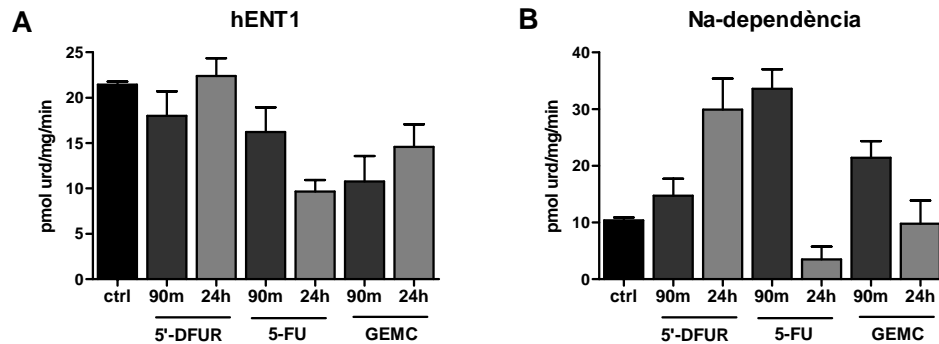


Figura 47. Efecte de la 5'-DFUR, el 5-FU i la gemcitabina sobre el transport d'uridina en la línia cel.lular MCF7 a les 48 hores. Les cèl.lules es van incubar durant 90 minuts o 24 hores en presència de 5'-DFUR 75 μ M, 5-FU 75 μ M o gemcitabina 75 nM. A les 48 hores de l'inici del tractament es va mesurar la captació d'uridina 1 μ M durant 1 minut per avaluar el transport mitjançat per hENT1 (**A**) i el dependent de sodi (**B**). Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments independents mesurats per quadruplicat.

Sorprenentment, el tractament de 90 minuts amb 5-FU i amb gemcitabina produeixen un clar increment del transport concentratiu, que en el cas de la nucleobase és similar al que s'obté amb 24 hores d'incubació amb 5'-DFUR. Per contra, les diferències observades en l'activitat del transportador d'hENT1 són mínimes. Per tal d'analitzar amb més detall aquesta resposta vam optar per avaluar l'efecte de diferents temps de tractament en el transport d'uridina mesurat a les 48 hores de l'inici de la incubació (**Figura 48**).

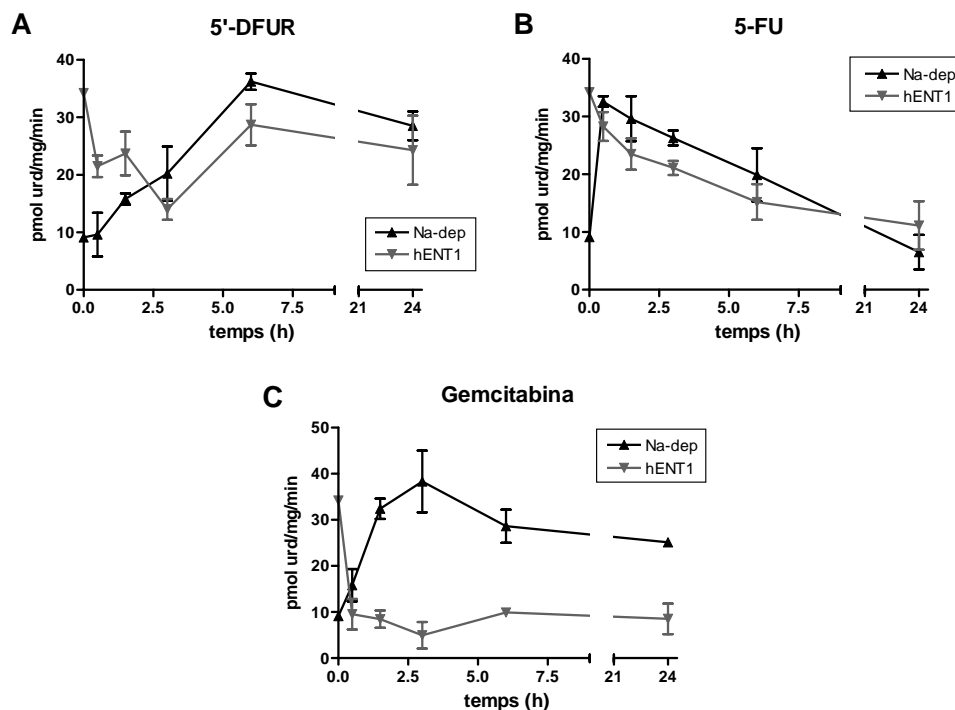


Figura 48. Efecte sobre el transport d'uridina del temps de tractament amb 5'-DFUR, 5-FU i gemcitabina en la línia cel.lular MCF7. Les cèl.lules es van incubar durant diferents temps en presència de 5'-DFUR 75 μ M (**A**), 5-FU 75 μ M (**B**) o gemcitabina 75 nM (**C**). A les 48 hores de l'inici del tractament es va avaluar el transport mitjançat per hENT1 i el dependent de sodi a través de la incubació d'uridina 1 μ M durant 1 minut. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos experiments independents mesurats per quadruplicat.

A simple vista els resultats mostren una elevada variabilitat en la resposta dels tres fàrmacs analitzats. El tractament de 30 minuts amb gemcitabina és suficient per a produir la disminució de l'activitat d'hENT1 i aquesta es manté amb temps d'incubació majors. En canvi, l'efecte del 5-FU va augmentant a mesura que s'incrementa el temps, arribant a un màxim a les 24 hores de tractament. El comportament de la 5'-DFUR és el més peculiar ja que la disminució màxima de l'activitat es produeix a les 3 hores, i a partir d'aquest temps l'activitat d'hENT1 va augmentat fins aconseguir uns valors similars als basals, el que concorda amb les dades prèviament mostrades. Les diferències en el transport concentratiu són menors. Tant la 5'-DFUR com la gemcitabina presenten un increment de l'activitat dependent de sodi a mesura que augmenta el temps de tractament, amb un pic de 6 hores per a la 5'-DFUR i de 3 per a la gemcitabina, i a partir d'aquest moment es produeix una lleugera davallada de l'efecte. El 5-FU no segueix el mateix patró, ja que als 30 minuts de tractament ja ha assolit el màxim d'activitat dependent de sodi i en augmentar el temps d'incubació va disminuint gradualment l'efecte fins a arribar als valors basals.

Les diferències entre la 5'-DFUR i el 5-FU podrien ser degudes a diferents motius. D'una banda podria tractar-se d'un efecte de dosi. En ambdós compostos la dosi utilitzada ha estat de 75 μ M, tanmateix la resposta citotòxica del 5-FU és major, amb més quantitat de cèl.lules mortes que la 5'-DFUR (dades no mostrades). Un cop a l'interior cel.lular la 5'-DFUR es converteix en 5-FU mitjançant l'acció de l'enzim timidina fosforilasa, pel que és lògic considerar que el 5-FU pot produir un efecte major si s'utilitza la mateixa dosi d'ambdós fàrmacs. D'altra banda, diversos autors han suggerit que la dosi de 5-FU pot determinar la via principal d'acció del fàrmac, la incorporació a l'ARN o la inhibició de la TS (Longley et al., 2003; Yoshikawa et al., 2001), pel que no es pot descartar que les variacions entre els dos fàrmacs siguin degudes a diferències en els mecanismes de l'acció citotòxica. Per contra, els resultats obtinguts ens permeten obviar la hipòtesi de què l'increment del transport concentratiu per la 5'-DFUR és degut al fet de tractar amb un anàleg de nucleòsid, ja que amb temps menors d'incubació el 5-FU produeix la mateixa resposta.

A continuació, vam decidir analitzar amb més detall la davallada de l'activitat d'hENT1, amb l'objectiu de determinar el tipus de regulació responsable. En primer lloc, vam mesurar mitjançant PCR a temps real els nivells d'ARNm d'hENT1 a les 6, 24 i 48 hores (**Figura 49**).

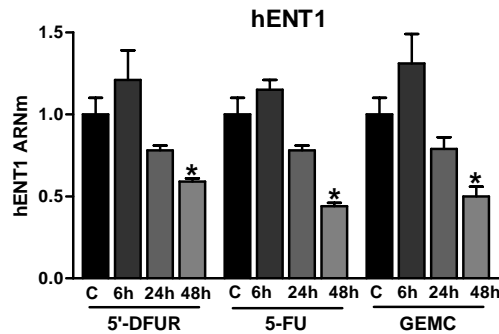


Figura 49. Nivells d'expressió del transportador hENT1 en les cèl.lules MCF7 després del tractament amb 5'-DFUR, 5-FU i gemcitabina. Les cèl.lules es van incubar amb 5'-DFUR 75 μ M, 5-FU 75 μ M i gemcitabina 75 nM. L'ARN corresponent es va obtenir a les 6, 24 i 48 hores, tot i que en el darrer punt el fàrmac només es va incubar durant 24 hores. Els valors de C_T obtinguts han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió de l'ARNm es donen com unitats arbitràries, utilitzant el control de cada temps com a control de referència. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents

Els resultats demostren que la disminució de l'activitat del transportador equilibratiu hENT1 es correspon amb una baixada dels nivells del seu ARNm. L'efecte és estadísticament significatiu a les 48 hores, malgrat que a les 24h ja s'aprecia un descens en la quantitat de missatger. Sorprenentment, la 5'-DFUR mostra una resposta similar als altres dos fàrmacs, si bé no detectem canvis en l'activat independent de sodi. Posteriorment, vam comprovar si aquesta davallada en l'expressió es correlacionava amb els nivells de proteïna (**Figura 50**). En aquest cas, el tractament va ser equivalent al realitzat per a la figura 46, és a dir, les cèl.lules MCF7 es van tractar durant 24 hores amb diferents dosis de fàrmac i els nivells de proteïna es van avaluar a les 48 hores.

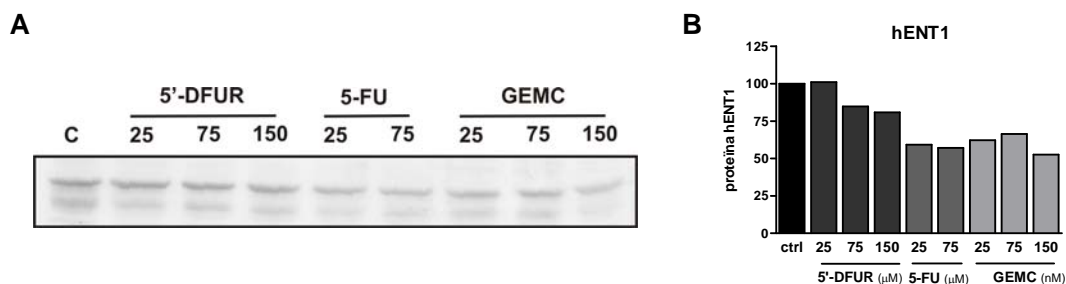


Figura 50. Anàlisi de western blot d'hENT1 en les cèl.lules MCF7 després del tractament amb 5'-DFUR, 5-FU i gemcitabina. Les cèl.lules es van incubar en presència de diferents dosis de 5'-DFUR, 5-FU o gemcitabina durant 24 hores. A les 48 es va extreure la proteïna total i es va analitzar l'expressió d'hENT1 mitjançant western blot (**A**). Els canvis produïts pel tractament es van quantificar densitomètricament (**B**). Es mostra un western blot representatiu.

Les dades obtingudes permeten concloure que el tractament amb 5-FU i gemcitabina produeixen una disminució en els nivells d'ARNm d'hENT1 amb la conseqüent davallada de la quantitat de proteïna total i de l'activitat del transportador. Addicionalment, els valors dels diferents paràmetres mesurats es correlacionen, ja que en tots els casos la disminució és aproximadament del 50%. Per contra, malgrat l'anàleg d'uridina 5'-DFUR també produeix un descens en els nivells d'ARNm del transportador equilibratiu no passa el mateix amb la quantitat de proteïna total, el que podria ser degut, en part, a un increment de l'estabilitat de l'ARNm. Tanmateix, calen més estudis per a explicar l'efecte diferencial entre els fàrmacs.

Els resultats obtinguts fins al moment són oposats als descrits en la literatura, tot i que, com s'ha comentat prèviament, el nombre de treballs és reduït. Pressacco i col.laboradors (1995b) van determinar que inhibidors de la síntesi *de novo* de precursors de l'ADN com el 5-FU i la hidroxiurea produïen un increment en el nombre de transportadors hENT1 en la membrana plasmàtica, mentre que altres fàrmacs com la citarabina no tenien cap efecte. Els autors postulen que és la disminució dels *pools* de dTTP el desencadenant de l'efecte, ja que inhibidors de la TS provoquen una resposta similar (Pressacco et al., 1995a). Similarment, la fludarabina i la cladribina també incrementen l'expressió d'hENT1 en cèl.lules de LLC i la resposta és dependent de la dosi de fàrmac administrada (Petersen et al., 1996). No obstant, en aquests treballs els autors analitzen únicament el nombre de transportadors en la membrana mitjançant la unió de SAENTA, però en cap cas determinen canvis en l'activitat. D'altra banda, com ja s'ha apuntat, el tractament amb gemcitabina en línies cel.lulars derivades de tumor de pàncrees produeix una disminució en l'activitat d'hENT1. Les diferències en les respostes podrien ser degudes, en part, a variacions en els mecanismes d'acció dels fàrmacs o fins i tot a una regulació diferent en funció del tipus cel.lular analitzat. Així, per exemple, una dieta lliure de nucleòsids produeix un increment en els nivells de proteïna de rCNT1 en el jejúnum i una lleugera disminució en el fetge (Valdes et al., 2000). Una altra possibilitat seria que mentre en el nostre model l'increment del transport concentratiu és el que regula les variacions en els nivells de dNTPs, en aquells tipus cel.lulars que no tenen la capacitat de produir aquest increment, és el transportador hENT1 el que exerceix aquesta acció.

A continuació, ens vam proposar avaluar quina o quines eren les isoformes responsables de l'augment del transport concentratiu i, de manera similar als efectes sobre hENT1, determinar si existien canvis de proteïna o d'ARNm. Així, en primer lloc vam mesurar els nivells d'ARNm per PCR a temps real dels tres transportadors de la família SLC28 (**Figura 51**). Amb l'objectiu de facilitar l'estudi vam optar per analitzar únicament els efectes de la 5'-DFUR i la gemcitabina, ja que el 5-FU l'havíem afegit tant sols per veure si provocava la mateixa resposta que la 5'-DFUR.

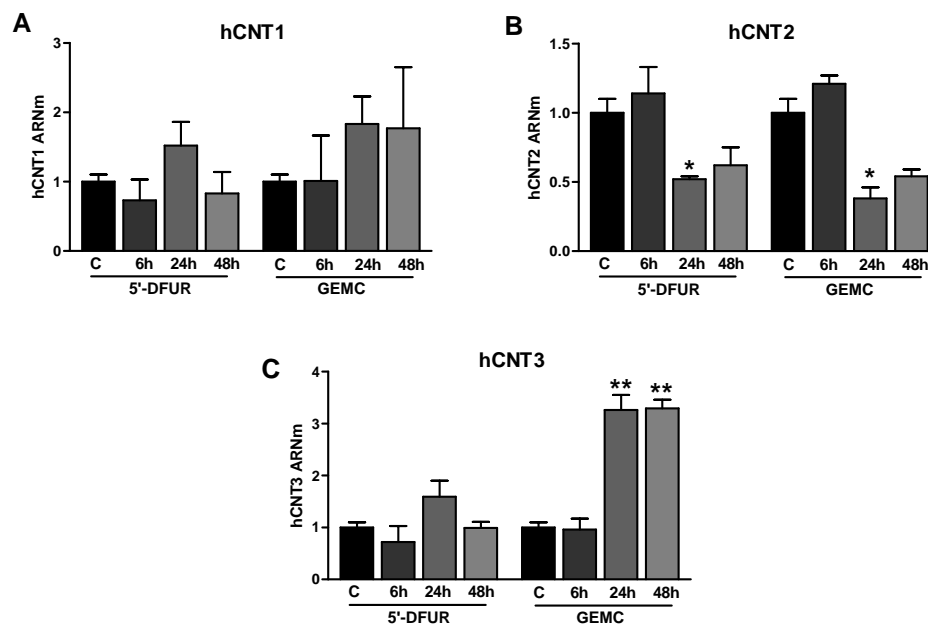


Figura 51. Nivells d'expressió dels transportadors hCNT1 (A), hCNT2 (B) i hCNT3 (C) en les cèl·lules MCF7 després del tractament amb 5'-DFUR i gemcitabina. El tractament i l'anàlisi de les dades es va fer de manera equivalent al descrit en la figura 49. Els resultats són la mitjana \pm SE de dos a tres experiments independents. La significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$.

Els resultats mostren un clar increment, a partir de les 24 hores, de l'ARNm de hCNT3 com a conseqüència del tractament amb gemcitabina. Per contra, en el cas de la 5'-DFUR no s'aprecia una inducció evident de cap de les isoformes concentratives. En canvi, en tots dos fàrmacs es detecta ja a les 24 hores una disminució de l'expressió de hCNT2. Per tant, els resultats obtinguts fins al moment suggeririen que la gemcitabina produeix un increment de l'expressió i en conseqüència de l'activitat de hCNT3.

En el nostre laboratori s'han generat anticossos policlonals dirigits contra les tres isoformes concentratives dels transportadors de nucleòsids, tanmateix només l'anticòs de hCNT1 ha estat caracteritzat, dins el marc de la tesi doctoral d'Elena Guillén. Així doncs, vam avaluar si el tractament amb 5'-DFUR o gemcitabina produïa una variació en els nivells de proteïna de hCNT1, utilitzant un tractament equivalent al de la mesura de proteïna d'hENT1 (**Figura 52**). Tanmateix, degut a les característiques de l'anticòs, en aquest cas no es va poder utilitzar un protocol d'aïllament de proteïna total, sinó que va ser necessària l'extracció d'homogenats crus de membrana, tal i com es detalla en els Materials i Mètodes.

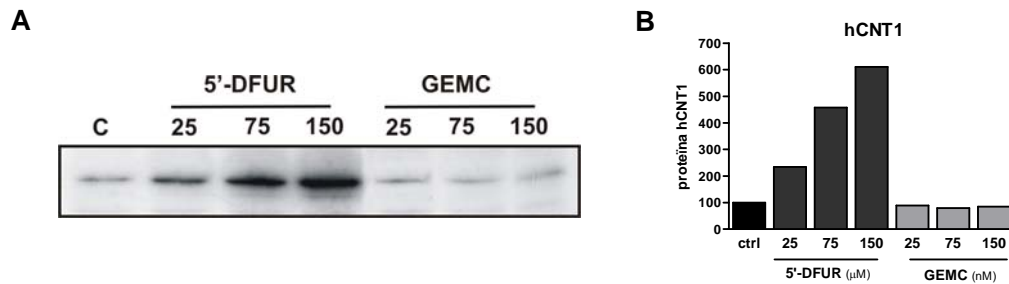


Figura 52. Anàlisi de western blot de hCNT1 en les cèl.lules MCF7 després del tractament amb 5'-DFUR i gemcitabina. Les cèl.lules es van incubar en presència de diferents dosis de 5'-DFUR o gemcitabina durant 24 hores. A les 48 hores es van extreure homogenats crus de membrana i es va analitzar l'expressió d'hCNT1 mitjançant western blot (A). Els canvis produïts pel tractament es van quantificar densitomètricament (B). Es mostra un western blot representatiu.

Els resultats demostren un clar increment dels nivells de proteïna de hCNT1 com a conseqüència del tractament amb 5'-DFUR. A més, en concordança amb les dades de transport, es tracta d'un augment dependent de la dosi. Per contra, la gemcitabina no varia la quantitat de proteïna de hCNT1, més aviat els resultats semblarien indicar que hi ha un lleuger descens. Les dades obtingudes per western blot concorden amb l'anàlisi immunocitoquímic de hCNT1 (Figura 53).

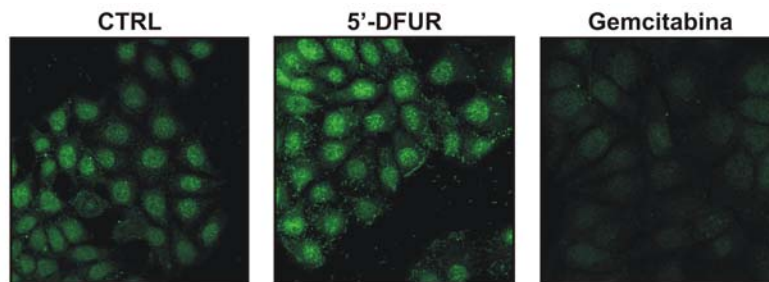


Figura 53. Immunocitoquímica de hCNT1 en les cèl.lules MCF7. Les cèl.lules es van incubar 24 hores amb 5'-DFUR 75 μM o gemcitabina 75 nM. A les 48 hores l'expressió i localització de hCNT1 es va analitzar tal com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes.

Les dades suggereixen que la 5'-DFUR produeix un increment en els nivells de proteïna i d'activitat de hCNT1, mentre que amb la gemcitabina l'augment de transport concentratiu és degut a una major quantitat d'ARNm de hCNT3. L'elevada inducció de la proteïna hCNT1, com a conseqüència de l'acció del 5'-DFUR, podria ser deguda a un increment de la proteïna en la membrana, ja que el protocol d'extracció utilitzat era per obtenir extractes de membrana. Tanmateix, l'anàlisi immunocitoquímic demostra que també hi ha un increment de la proteïna total, el que podria ser com a conseqüència d'una major estabilitat de l'ARNm del transportador, ja que no es detecta un clar augment de la transcripció. De fet, els nivells d'ARNm d'aquesta isoforma són difícils de detectar. Així, l'anàlisi per western blot del patró d'expressió de rCNT1 va demostrar que aquest es trobava en molts més teixits dels que s'havien determinat inicialment per estudis de Northern blot (Felipe et al. 1998).

Per tal de completar la caracterització dels transportadors concentratius regulats per l'acció dels anàlegs de nucleòsids, vam realitzar mesures de captació de citidina i guanosina (**Figura 54**). En aquest cas es van efectuar tractaments de 6 hores, ja que l'increment de transport dependent de sodi és major.

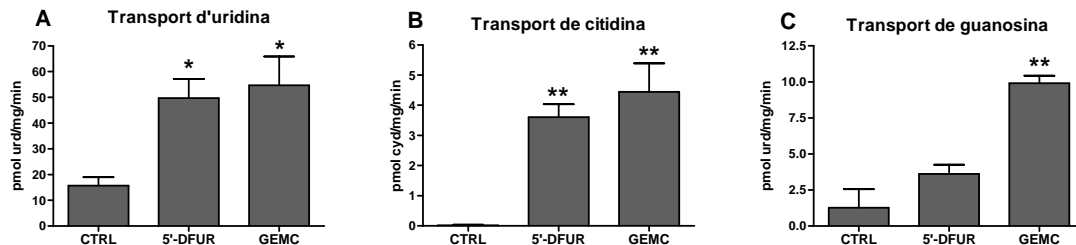


Figura 54. Efecte de la 5'-DFUR, el 5-FU i la gemcitabina sobre el transport de nucleòsids en la línia cel.lular MCF7 a les 48 hores. Les cèl.lules es van incubar durant 6 hores en presència de 5'-DFUR 75 μ M o gemcitabina 75 nM. A les 48 hores es va mesurar el transport dependent de sodi d'uridina (**A**), citidina (**B**) i guanosina (**C**) 1 μ M durant 1 minut. Els resultats són la mitjana \pm SE de tres experiments independents mesurats per quadruplicat. La significativitat estadística està valorada pel mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$.

El transport d'uridina demostra que amb 6 hores de tractament l'increment de la sodi-dependència és similar per a tots dos anàlegs, tanmateix no ens permet determinar les isoformes implicades ja que la uridina és substrat de les tres. Per aquest motiu és necessari avaluar la captació de citidina (hCNT1 i hCNT3) i de guanosina (hCNT2 i hCNT3). La 5'-DFUR produeix únicament un increment en el transport concentratiu de citidina, el que concorda amb els resultats anteriors que indiquen que la isoforma implicada és hCNT1. D'altra banda, el tractament amb gemcitabina augmenta tant la captació dependent de sodi de guanosina com de citidina. Tenint en compte que no detectem un increment en els nivells de proteïna de hCNT1 i que l'ARNm de hCNT2 disminueix, aquestes dades confirmarien que l'augment d'activitat observat correspon a la isoforma hCNT3.

En resum, els resultats obtinguts demostren que el tractament amb anàlegs de nucleòsids modula l'expressió i l'activitat dels transportadors responsables de la seva captació. Tot i les diferències entre els fàrmacs, les respostes generals obtingudes en la línia cel.lular MCF7 mostren una disminució de l'activitat equilibrativa i un increment de la concentrativa. Tal com s'ha comentat prèviament, la davallada del transport independent de sodi no concorda amb dades prèvies de la bibliografia (Pressacco et al., 1995b; Petersen et al., 1996), tot i que els models cel.lulars utilitzats eren diferents. Tanmateix, els resultats mostrats concordarien amb el fet que el transportador hENT1 juga un paper important en proliferació (Cass et al., 1979, Soler et al., 2001a), ja que el bloqueig de la replicació com a conseqüència de l'acció dels anàlegs de nucleòsids disminueix la seva activitat. Alhora, aquestes dades suggereixen que hENT1 no seria el transportador encarregat de captar els nucleòsids necessaris per a la reparació de l'ADN, sinó que els transportadors responsables d'aquesta acció serien els concentratius, que són els que augmenten la seva activitat com a conseqüència de l'acció dels fàrmacs. No obstant, la 5'-DFUR no disminueix l'activitat d'hENT1, el que podria ser degut a què el seu efecte

citotòxic és menor i que a les dosis i temps analitzats només produeixen una davallada de l'ARNm que no es tradueix amb una disminució de la proteïna.

D'altra banda no deixa de ser sorprenent el fet que tant la 5'-DFUR com la gemcitabina incrementin l'activitat de transport concentratiu, però que les isoformes implicades siguin diferents en funció del fàrmac. L'anàlisi del mecanisme d'acció d'aquests anàlegs ens podria aportar una possible explicació. La 5'-DFUR inhibeix l'activitat de la timidilat sintasa, produint per tant una disminució del dTTP i en conseqüència pertorbacions en els nivells dels altres dNTPs, principalment un increment de dATP (Houghton et al., 1995). hCNT1 és un transportador preferent per pirimidines, per tant la seva activació potenciaria la captació de la timidina. De fet, s'ha demostrat que l'addició de timidina pot revertir els efectes de la inhibició de la TS a través de la timidina quinasa (Grem and Fisher, 1989). D'altra banda, els efectes de la 5'-DFUR sobre l'ARN, l'altre mecanisme d'acció, es poden revertir amb l'administració d'uridina, que també és substrat de hCNT1 (Longley et al., 2002). Per tant, com a resposta al tractament de la 5'-DFUR la cèl.lula incrementaria el transportador responsable de la captació dels nucleòsids capaços de revertir l'efecte citotòxic.

Un dels principals efectes de la gemcitabina és la inhibició de la ribonucleòtid reductasa, bloquejant d'aquesta manera la síntesi *de novo* de dNTPs (Galmarini et al., 2001b). Per tant, a diferència de la 5'-DFUR, la gemcitabina produeix una depleció tant de purines com de pirimidines, el que concordaria amb l'increment de l'activitat del transportador hCNT3, que presenta una àmplia especificitat de substrat. Per contra, Pressacco i col.laboradors (1995b) van determinar que la inhibició de la ribonucleòtid reductasa amb hidroxiurea produeix un increment del transportador hENT1 en membrana, mentre que en una línia d'hepatoma de rata augmenta els nivells de proteïna d'hCNT1 (Valdes et al., 2002). Per tant, el transportador activat com a conseqüència de la inhibició de la ribonucleòtid reductasa podria dependre del tipus cel.lular. D'altra banda, la línia limfoid H9 resistent a citarabina presenta una disminució dels nivells d'hENT1 i un increment dels de hCNT3 (Sarkar et al., 2005). Tenint en compte que la citarabina i la gemcitabina tenen un mecanisme d'acció similar, aquests resultats concordarien amb les nostres dades.

Diversos estudis apunten cap a una inducció dels transportadors concentratius en el procés d'apoptosi. El tractament de macròfags de medul.la òssia de ratolí amb el reconegut agent apoptòtic LPS produeix un increment de l'expressió de rCNT1 i rCNT2 (Soler et al., 2001b). D'altra banda, dades obtingudes en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Sonia Fernández demostren que el TGF β 1 produeix un increment de l'activitat i l'expressió de rCNT2, associada a una disminució dels nivells proteics de rCNT1, en hepatòcits. El TGF β 1 en fetge actua bàsicament com a pro-apoptòtic, el que podria suggerir un paper d'aquests transportadors en l'apoptosi. De manera similar, dades preliminars han demostrat que la fludarabina i la gemcitabina incrementen els nivells d'ARNm de hCNT2 en la línia cel.lular derivada de limfoma de mantell Granta-519 (**Figura 55**).

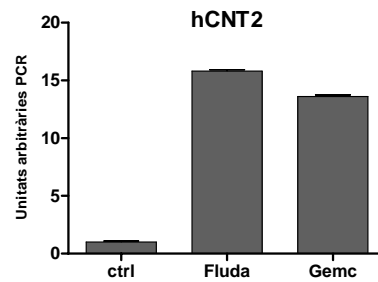


Figura 55. Efecte del tractament amb fludarabina i gemcitabina sobre l'expressió de hCNT2 en la línia cel.lular Granta-519. Les cèl.lules es van incubar durant 3 hores amb fludarabina (8.5 µg/ml) o gemcitabina (2.75 µg/ml). A les 24 hores es va analitzar per PCR a temps real els nivells d'expressió del transportador hCNT2. Els nivells d'expressió de l'ARNm, normalitzats respecte el control endogen (β -glucuronidasa), es donen com unitats arbitràries, on el valor de 1 correspon al control.

El fet que, a diferència de la línia MCF7, les cèl.lules Granta-519 presentin una clara inducció de l'apoptosi, tal i com es descriu en els capítols 2 i 3, conjuntament amb els antecedents indicats, permetrien hipotetitzar que és el transportador hCNT2 el que s'indueix en cas d'apoptosi, si bé no es pot descartar un efecte diferencial en funció del tipus cel.lular. Tanmateix, s'ha descrit que mentre la 5'-DFUR actua preferentment mitjançant el receptor FAS, la gemcitabina ho fa a través de la via mitocondrial (Simstein et al., 2003). Per tant, els increments en l'activitat concentrativa com a resposta de l'acció dels anàlegs de nucleòsids podrien ser deguts a la seva acció citotòxica o a la resposta de la cèl.lula als canvis en els *pools* intracel.lulars de nucleòsids i nucleòtids.

Tanmateix, a part de la importància en la comprensió del paper fisiològic dels transportadors de nucleòsids, aquests resultats també poden tenir implicacions terapèutiques. Estudis recents en el nostre grup de recerca han demostrat que l'expressió heteròloga del transportador hCNT1 incrementa la sensibilitat a 5'-DFUR i a gemcitabina (Mata et al., 2001; Garcia-Manteiga et al., 2003). Per tant, l'administració d'una segona dosi de fàrmac en el moment que la primera ha induït l'activitat concentrativa podria incrementar la captació de l'anàleg i com a conseqüència la seva acció citotòxica. A més, la davallada de l'activitat d'hENT1, en el cas de la gemcitabina, disminuiria la possible sortida del fàrmac per aquest transportador. De fet, s'ha demostrat que la inhibició del transport equilibratiu pot augmentar la sensibilitat als fàrmacs (Dagnino et al., 1990). En concordança, el tractament amb fludarabina incrementa la captació de citarabina, pel que els autors suggereixen que l'administració inicial de fludarabina abans de la infusió amb citarabina podria incrementar l'acumulació d'ara-CTP en cèl.lules leucèmiques (Gandhi et al., 1989). De manera similar, el tractament amb àcid retinòic incrementa l'expressió d'hENT1 i en conseqüència la sensibilitat a la citarabina, per tant en una teràpia combinada els temps d'administració s'haurien de determinar tenint en compte aquests efectes (Flanagan et al., 2003).