

Tesi doctoral presentada per En/Na

Elena GUILLÉN GÓMEZ

amb el títol

"Distribución tisular de transportadores de fármacos en tejidos normales y transformados. Papel en el sistema nervioso central"

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 17 de gener de 2006.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	1
1. <u>NUCLEÓSIDOS Y TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS</u>	3
1.1 CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS	
1.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	
1.2.1 Transportadores concentrativos	
1.2.2 Transportadores equilibrativos	
1.3 REGULACIÓN	
2. <u>DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS</u>	17
2.1 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	
2.1.1 Introducción	
2.1.2 Receptores de adenosina en cerebro	
2.1.3 Papel de la adenosina en el Sistema Nervioso Central	
2.1.4 Transportadores de nucleósidos en cerebro	
3. <u>QUIMIOTERAPIA DE LOS TUMORES GINECOLÓGICOS Y DE MAMA</u>	30
3.1 DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN TEJIDOS TUMORALES	
3.2 CÁNCER DE MAMA: Tipos de tumores y clasificación	
3.2.1 Tratamiento del cáncer de mama	
3.3 TUMORES GINECOLÓGICOS	
3.3.1 Ovario	
3.3.2 Útero	
3.3.3 Cuello del útero (cérvix)	
3.3.4 Tratamiento de los tumores ginecológicos	
4. <u>MECANISMO DE ACCIÓN DE DERIVADOS DE NUCLEÓSIDOS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER.</u>	38
4.1 PRINCIPALES FÁRMACOS EN LA TERAPIA ANTICANCERÍGENA Y ANTIVIRAL.	
4.2 METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS	
4.3 RESISTENCIA A FÁRMACOS	
4.3.1 Implicación del transporte en la resistencia al tratamiento con análogos.	
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. <u>CULTIVOS CELULARES</u>	65
1.1 TÉCNICA DE TRABAJO <i>IN VITRO</i>	
1.2 CULTIVO PRIMARIO	
1.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS NEURONALES	
1.1.1 Aislamiento y cultivo	
1.4 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	
1.4.1 Congelación y descongelación de células	
1.4.2 Subcultivo celular	
1.4.3 Cultivos polarizados	

1.4.4	Líneas celulares con las que se ha trabajado	
1.5	TRATAMIENTOS EN CULTIVOS CELULARES	
1.5.1	Tratamiento de células con fármacos	
1.5.2	Agentes quimioterapéuticos	
1.5.3	Curvas dosis-respuesta	
1.5.4	Reducción de sales de tetrazolium: MTT	
1.5.5	Transfecciones celulares	
2.	<u>EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES</u>	75
2.1	Animales	
2.2	Privación de sueño	
2.3	Ritmo circadiano	
3.	<u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS</u>	76
3.1	OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES	
3.1.1	Homogenización de muestras de tejidos	
3.1.2	Extracción de proteínas a partir de cultivos de células en placa	
3.1.3	Obtención de homogenados crudos de membrana	
3.2	VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	
3.3	ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE	
3.4	WESTERN BLOTTING	
3.4.1	Procedimiento de transferencia de proteínas	
3.4.2	Inmunodetección	
3.4.3	Revelado	
3.5	PURIFICACIÓN DE IgGs POR COLUMNA DE PROTEÍNA A	
3.6	PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS CITOLÓGICAS	
3.6.1	Preparaciones para criostato	
3.6.2	Preparaciones embebidas en parafina	
3.6.3	Arrays de tejidos	
3.6.4	Tinción Hematoxilina-Eosina	
3.7	Corte de las Muestras	
3.7.1	Criostato	
3.7.2	Micrótomo	
3.8	Inmunohistoquímica	
3.8.1	Pre-tratamiento de muestras congeladas	
3.8.2	Pre-tratamiento de los cortes en parafina	
3.8.3	Inmunolocalización enzimática con peroxidasa (LSAB)	
3.8.4	Inmunofluorescencia indirecta	
3.8.5	Inmunocitoquímica	
3.8.6	Inmunocompetencia	
3.8.7	Captación de imágenes	
3.9	ANTICUERPOS UTILIZADOS	
4.	<u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN</u>	95
4.1	PURIFICACIÓN DE ARN	
4.1.1	Purificación de ARN a partir de células en cultivo y tejidos	
4.1.2	Purificación de ARN mensajero a partir de ARN total	
4.1.3	Tratamiento del ARN con DNasa I	
4.2	VALORACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
4.2.1	Valoración espectrofotométrica	
4.4	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DESNATURALIZANTE	
5.	<u>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y TÉCNICAS AFINES</u>	98

5.1	SÍNTESIS DE ADNc	
5.2	PCR A TIEMPO REAL	
5.2.1	Cuantificación relativa de la expresión génica	
5.2.2	Validación del método comparativo	
5.2.3	Diseño de <i>primers</i> y sonda	
5.2.4	Sondas y oligonucleótidos utilizados	
5.2.5	Parámetros universales de PCR a Tiempo Real	
5.2.6	Análisis de resultados por el método de comparación de CT	
6.	<u>OTRAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</u>	103
6.1	PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	
6.2	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	
6.3	AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	
6.4	DIGESTIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA CON ENDONUCLEASAS	
6.5	LIGACIÓN DE FRAGMENTOS	
6.5.1	Ligación de fragmentos con DNA ligasa	
6.5.2	Ligación de fragmentos con el kit pGEM-T Easy vector System	
6.6	ELECTROFORESIS EN GEL NO DESNATURALIZANTE DE AGAROSA	
6.7	SECUENCIACIÓN POR PCR	
7.	<u>HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FRÍAS SOBRE CORTES FLOTANTES</u>	110
7.1	PREPARACIÓN DE LAS SONDAS FRÍAS	
7.1.1	Sondas utilizadas	
7.1.2	Transcripción con NTPs marcados con digoxigenina	
7.1.3	Valoración por Dot-blot	
7.2	PERFUSIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO	
7.3	PRE-TRATAMIENTOS	
7.4	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	
7.5	INMUNO Y REVELADO	
8.	<u>TRANSPORTE DE NUCLEÓSIDOS EN MONOCAPA</u>	116
8.1	MEDIOS DE TRANSPORTE	
8.2	ENSAYO DE TRANSPORTE	
8.3	CÁLCULOS	
9.	<u>AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS TRANSFECTADAS.</u>	118
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
1.	<u>LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO</u>	123
1.1	EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO DE RATA	
1.1.1	Expresión de rCNT2 y rENT1 en neuronas y glía	
1.2	REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE ADENOSINA CNT2 EN CEREBRO DE RATA ADULTA	
1.2.1	Análisis de la expresión de CNT2 durante la privación del sueño	
1.2.2	Análisis de la expresión de CNT2 en ratas tratadas con ácido kaínico	
1.3	EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS	

Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD DE TRANSPORTE EN LÍNEA CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES.	
2. <u>DISEÑO Y GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES MONOESPECÍFICOS CONTRA LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS</u>	141
3. <u>CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS</u>	144
3.1 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO CONGELADO	
3.1.1 Inmunofluorescencia indirecta	
3.1.2 Método enzimático	
3.1.3 Comprobación de la especificidad de los anticuerpos por inmunocompetencia	
3.2 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO ENGLOBADO EN PARAFINA	
3.2.1 Matrices de tejidos	
3.3 CARACTERIZACIÓN POR WESTERN-BLOT	
3.3.1 hENT1 y hENT2	
3.3.2 CNT1 y CNT2	
4. <u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS hCNT1, hENT1 Y hENT2 EN TUMORES GINECOLÓGICOS Y DE MAMA</u>	158
4.1 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CARCINOMAS DE OVARIO, ENDOMETRIO Y ÚTERO CERVICAL.	
4.1.1 Análisis de la expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en los diferentes subtipos histológicos de tumores ginecológicos	
4.2 EXPRESIÓN DE hCNT1 EN TUMORES DE MAMA	

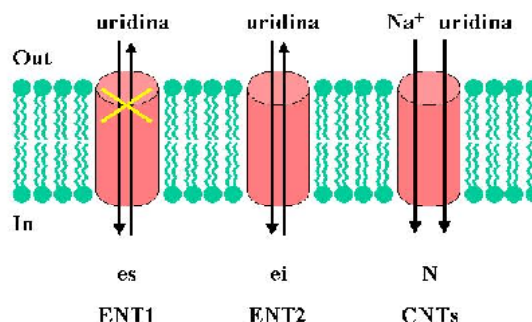
1. NUCLEÓSIDOS Y TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

Los nucleótidos son las moléculas que constituyen los ácidos nucleicos e intervienen en gran variedad de procesos bioquímicos. Constan de una base nitrogenada, un residuo de azúcar y un grupo ortofosfato (mono-, di- o tri-). En ausencia del grupo fosfato se habla de nucleósido. Los nucleósidos intervienen en múltiples procesos celulares y no sólo en la síntesis de ácidos nucleicos. Juegan un papel importante en el metabolismo energético de la célula, actúan como unidades de transferencia de energía (ATP y GTP) y coenzimas (NAD y FAD), además de funcionar como activadores metabólicos en vías biosintéticas. Existen células animales que son incapaces de sintetizar sus propios nucleósidos, como los eritrocitos o las células de la médula ósea, por lo que necesitan captarlos, bien a partir de la dieta, de la degradación de ácidos nucleicos o de algunas células precursoras. De todas formas, la síntesis *de novo* requiere mucho más gasto de energía que la vía de recuperación de nucleósidos, por lo que esta última adquiere gran importancia en todos los tipos celulares. A pesar de que existe una pequeña difusión a través de la membrana plasmática, ésta es muy lenta y los nucleósidos, debido a su carácter hidrófilo, necesitan transportadores de membrana para ser internalizados. Existen dos grupos de transportadores según su dependencia energética y de cada uno de ellos se han descrito distintas entidades cinéticas según su sensibilidad a inhibidores y su especificidad por un tipo u otro de nucleósido. Estos transportadores de nucleósidos están implicados en muchos procesos fisiológicos, modulan la concentración extracelular de los sustratos que internalizan y representan la forma de entrada a la célula de un gran número de análogos citotóxicos utilizados en tratamientos antineoplásicos y antivirales. La capacidad de transportar estos análogos al interior celular puede ser uno de los factores limitantes para que estos agentes terapéuticos tengan su efecto en la célula transformada o infectada.

1.1 CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

Existen dos grandes tipos de transportadores, aquellos que utilizan un transporte equilibrativo por difusión facilitada gracias al gradiente transmembrana de concentración y los que utilizan un transporte concentrativo dependiente de sodio con gasto de energía (Griffith y Jarvis 1996, Pastor-Anglada y col. 1998). Se pueden diferenciar distintos sistemas de transporte que pertenecen a uno u otro grupo (tabla 1 y figura 1).

Figura 1: Agencias cinéticas de transporte de nucleósidos y entidades moleculares que las identifican. N: Cotransporte concentrativo Na⁺/uridina; es: transporte equilibrativo sensible a NBTI (nM); ei: transporte equilibrativo insensible a NBTI (nM). ENTs i CNTs (CNT1/2/3): familias génicas o entidades moleculares, respectivamente "Equilibrative Nucleoside Transporters" y "Concentrative Nucleoside Transporters".



Los **transportadores equilibrativos** (SLC29) no dependientes de sodio son potencialmente bidireccionales, de manera que promueven tanto la salida como la entrada de nucleósidos a favor de gradiente de concentración. Dentro de este grupo, se han descrito dos sistemas diferentes según su sensibilidad a la NBTI o nitrobenziltioinosina, un análogo estructural de la adenosina. De esta manera, si el sistema de transporte se inhibe por concentraciones de NBTI del orden de nanomolar se habla de un transportador equilibrativo sensible a NBTI o **es**, mientras que si es necesaria una concentración de NBTI superior a 1 μ M, se trata de un transportador equilibrativo insensible a NBTI o **ei**. La cantidad de análogo que se une al transportador es proporcional al grado de inhibición observado, con una estequiometría inhibidor/transportador de 1:1. Es por ello que el NBTI se ha utilizado de manera rutinaria como ligando para caracterizar (Jarvis y col., 1980; Shi y col., 1984; Wu y Young, 1984; Tse y col., 1985) y cuantificar (Lee y col., 1994) el número de transportadores **es** presentes en la membrana plasmática. Existen otros agentes como el dilazep, la draflazina y el dipiridamol que actúan tanto sobre los transportadores **es** como **ei**, aunque el sistema **es** es mucho más sensible que el **ei**. Con la clonación de las isoformas humanas y murinas se ha puesto de manifiesto una respuesta inhibitoria diferencial dependiente de especie: igualmente, el dipiridamol y el dilazep inhiben el transporte equilibrativo en humanos y en la mayoría de especies, pero no en rata, donde ambos sistemas de transporte son resistentes (Sundaram y col., 1998). Existen compuestos como los derivados halogenados de la adenosina, 2-cloradenosina y 2-fluoradenosina, y la solufazina, un análogo de la draflazina, que tienen más afinidad por el sistema **ei** que por **es**, pero las afinidades absolutas (>200nM) no permiten su uso como sondas, aunque nos orienta acerca de que ambos subtipos de transportadores tienen que presentar dominios de unión a ligando diferentes. Por ejemplo, se ha demostrado que **ei**, pero no **es**, puede transportar nucleobases como la hipoxantina (Osses y col., 1996; Crawford y col., 1998b). Tanto uno como otro sistema de transporte se han descrito en numerosos tipos celulares sanos y tumorales (Belt y col. 1993), mostrando una baja afinidad de sustrato con constantes aparentes de entre 100 y 800 μ M y una también baja especificidad, pudiendo transportar tanto purinas como pirimidinas.

Transportador concentrativo	Gen	Substratos (Km)	Referencias
hCNT1 (N2,cit)	SLC28A1	uridina (40-60 μ M) timidina (6 μ M) citidina (34 μ M)	(Ritzel y col., 1997; Lostao y col., 2000)
hCNT2 (N1,cif)	SLC28A2	adenosina (8 μ M) guanosina (21 μ M) uridina (80 μ M) inosina (4.5 μ M)	(Chandrasena y col., 1997; Wang y col., 1997b; Ritzel y col., 1998)
hCNT3 (N3,cib)	SLC28A3	uridina (21.6 μ M) citidina (15.4 μ M) timidina (21.2 μ M) adenosina (15.1 μ M) guanosina (43.0 μ M) inosina (52.5 μ M)	(Ritzel y col., 2001b)
N4	No clonado	Urd, Cyd, Ado, Tyd, Guo (n.d.)	(Gutierrez & Giacomini, 1993)
N5 (csg)	No clonado	Ado,Guo, Urd, sensible a NBTI	(Flanagan & Meckling-Gill, 1997)
Transportador equilibrativo	Gen	Substratos(Km)	Referencias
hENT1 (es)	SLC29A1	adenosina (40 μ M) guanosina (140 μ M) inosina (170 μ M) uridina (260 μ M) timidina (300 μ M) citidina (580 μ M)	(Ward y col., 2000)
hENT2 (ei)	SLC29A2	adenosina (100 μ M) inosina (50 μ M) uridina (250 μ M) timidina (710 μ M) citidina (5610 μ M)	(Ward y col., 2000)

Tabla 1: Propiedades cinéticas de los transportadores de nucleósidos concentrativos y equilibrativos. Extraído de Pastor-Anglada y col., 2004.

Recientemente se ha identificado una nueva isoforma designada ENT3 en tejidos humanos y de ratón (Hyde y col. 2001), pero parecería que las propiedades de este nuevo transportador son muy diferentes de ENT1 y ENT2, y a diferencia de éstos la proteína se encuentra mayoritariamente en el citoplasma celular co-localizando, en parte, con marcadores lisosomales en líneas celulares humanas (Baldwin y col., 2005). Parece ser una proteína de amplia especificidad de sustrato y de baja afinidad y que no muestra sensibilidad a NBTI, dipiridamol ni dilazep (Baldwin y col., 2005). La última de estas proteínas clonadas es hENT4, esta proteína ubicua se encuentra filogenéticamente muy alejada de hENT1, mostrando únicamente un 18% de identidad, lo que puede indicar una antigua divergencia de los otros miembros de la familia SLC29. A pesar de esto, existen evidencias de que esta proteína podría ser igualmente un transportador de baja afinidad de nucleósidos, como por ejemplo la adenosina (Baldwin y col.,2004)

Dentro del grupo de **transportadores concentrativos** (SLC28), los sistemas de transporte se clasifican según su especificidad de sustrato. Todos ellos son dependientes de sodio, normalmente con una estequiometría de 1 Na⁺: 1 nucleósido y, en condiciones normales, llevan a cabo la internalización de nucleósidos provocando un aumento de su concentración intracelular y un gasto de energía. Se conocen cinco tipos diferentes de transportadores concentrativos. Los dos primeros, **N1** y **N2**, son los mayoritarios y transportan nucleósidos púricos y uridina en el caso de N1, mientras que N2 es específico para nucleósidos pirimidínicos y, aparentemente según la especie, adenosina. N1 y N2, son mutuamente excluyentes para la permeabilidad de formicina B, un análogo poco metabolizable de la inosina, y para la timidina, respectivamente. Anteriormente, N1 se conocía con el nombre de **cif**, sistema concentrativo e insensible a NBTI que acepta formicina B como sustrato. N2 se llamaba **cit**, sistema concentrativo e insensible a NBTI que acepta timidina como sustrato diferenciado. **N3** tiene una amplia especificidad de sustrato por lo que era conocido como **cib**, ya que puede transportar tanto formicina B como timidina. Es uno de los pocos casos, junto con N2, en el que la estequiometría Na⁺:nucleósido es 2:1 (Larrayoz y col., 2004).

N4 y **N5**, los dos últimos sistemas, se han descrito únicamente en tipos celulares muy concretos. N4, caracterizado por Gutiérrez y Giacomini en vesículas de membrana en cepillo de riñón humano, acepta purinas y pirimidinas pero no formicina B ni inosina (Gutierrez y Giacomini, 1993). N5, la única actividad concentrativa inhibible por NBTI y dipiridamol definida hasta el momento, ha sido descrita en células humanas NB4 de leucemia promielocítica aguda (Flanagan y Meckling-Gill, 1997) y equivale a una actividad de transporte sodio-dependiente preferente para guanosina que también ha sido detectada en linfocitos B humanos (líneas celulares Raji y BSL-1) por nuestro grupo de investigación (Soler y col., 1998; Soler y col., 2000) y que recientemente se ha relacionado con el transporte de análogos de la guanosina como el ara-G (Flanagan y col., 2003). El sistema N5 se ha llamado también **csg** en base a su condición de concentrativo, sensible a NBTI y preferente para guanosina.

Estos transportadores concentrativos muestran una elevada afinidad por sus sustratos con valores de Km aparente en el rango micromolar bajo (1-50 μM) y son insensibles a los inhibidores NBTI o dipiridamol a concentraciones que bloquean los transportadores equilibrativos, excepto en el caso de N5 para el cual se ha visto que el transporte de guanosina disminuye un 75% en presencia de 1μM de NBTI.

1.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

La clonación de los transportadores de nucleósidos ha permitido su estudio individual al disponer de sistemas de expresión heterólogos como son los oocitos de

Xenopus laevis o células de mamífero. Gracias a estos sistemas de expresión se pueden obtener transportadores con modificaciones post-traduccionales, distinguir los sistemas concentrativos de los equilibrativos inhibiendo esta última actividad y diferenciar entre las cinéticas del metabolismo y del transporte, ya que en estos sistemas de oocitos el metabolismo es bajo o fácilmente inhibible. Por otro lado, el desarrollo de anticuerpos específicos contra estas proteínas permite avanzar en el estudio de las características moleculares o estructurales, su localización y su regulación (Wang y col. 1997b), además de poder utilizarlos como herramienta de diagnóstico en ciertos tumores, principalmente tras la observación de patrones alterados entre células normales y tumorales en cuanto a los transportadores de nucleósidos (Dragan y col. 2000). Los transportadores de nucleósidos de mamífero clonados hasta la fecha se recogen en la tabla 2.

1.2.1 Transportadores concentrativos

En ausencia de inhibidores de alta afinidad y de anticuerpos dirigidos contra sistemas de transporte concentrativos, en 1994, se clonó por primera vez una proteína transportadora de nucleósidos de células de mamífero, correspondiente al transportador dependiente de sodio de rata **CNT1** (**Concentrative Nucleoside Transporter 1**). La estrategia utilizada fue la de la clonación por expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis* a partir de un ADNc de epitelio de yeyuno de rata con actividad de transporte N2 (Huang y col. 1994). Existían evidencias previas, por microinyección de ARNm poliadenilado de mucosa intestinal de conejo en oocitos, de la expresión funcional de N2, selectiva para pirimidinas y adenosina (Jarvis y Griffith, 1991). Este sistema transportaba timidina, de manera saturable e inhibible por uridina y citidina pero no por guanosina, y coincidía con el expresado por enterocitos intactos y vesículas de membrana. De forma simultánea a la de Huang y colaboradores, se clonaba su homólogo, el transportador de nucleósidos protón-dependiente NupC de *Escherichia coli* (Craig y col. 1994). La caracterización molecular de estas proteínas inició un avance en un campo que hasta ese momento se había limitado a la caracterización cinética. El ADNc identificado por Huang y colaboradores codificaba para la proteína CNT1 de 648 aminoácidos (71 KDa) que participa en la absorción intestinal y renal de nucleósidos y análogos de nucleósidos de pirimidinas utilizados muy frecuentemente en tratamientos antivirales y antitumorales (Huang y col. 1994).

ADNc	Tejido de origen	Método de clonación	Tejido de expresión	Actividad de transporte	Sustrato (K _m)	Inhibición (K _i)	Tamaño de la proteína
Sistemas concentrativos (slc28)							
rCNT1	Yeyuno de rata	Expresión	Yeyuno, riñón, hígado, cerebro	N2	Uridina (37 μM), adenosina (26 μM)	+++ U +++ A - G, I	648 aa (71 kDa)
hCNT1	Riñón humano	Homología	Riñón	N2	Uridina (37-45 μM)	+++ U, T, C +++ A +++ dA (46 μM)	650 aa (71 kDa)
rCNT2	Hígado de rata	Expresión	~ Ubicuo Hígado, yeyuno, bazo, corazón, cerebro, riñón...	N1	Adenosina (6 μM), timidina (13 μM), inosina (28 μM), uridina (20 μM)	+++ U +++ G, FB, I + T, C	659 aa (72 kDa)
hCNT2	Riñón, intestino humano	Homología	~ Ubicuo Riñón, intestino, corazón, hígado, cerebro, pulmón, páncreas, músculo esquelético	N1	Uridina (80 μM), inosina (4,5 μM)	+++ U +++ G, I, A (6 μM) +++ dA (30 μM) ++ FB - C, T, Hp	658 aa (72 kDa)
hCNT3	Células HL-60 y glándula mamaria	Búsqueda de EST por BLAST. Obtención de ADNc por 5'-RACE y RT-PCR	Yeyuno, tráquea, páncreas, hígado, médula ósea, próstata, glándula mamaria, placenta	N3	(15-50 μM)	No determinado	691 aa
mCNT3	Hígado	Igual que para hCNT3	No determinado	N3	No determinado	No determinado	703 aa
Sistemas equilibrativos (slc29)							
rENT1	Yeyuno de rata	Homología	Hígado	es	Uridina (0,15 mM)	+++ U, T, C +++ A, G, I +++ NBTI (4,6 nM) ^a	457 aa
hENT1	Placenta humana	NBTI-binding, sec. proteica, screening de una librería	~ Ubicuo Eritrocitos, corazón, placenta, cerebro, hígado, pulmón, cólon	es	Uridina (0,24 mM)	+++ U, T, C +++ A, G, I +++ NBTI (2 nM) ^a	456 aa
rENT2	Yeyuno de rata	Homología	Hígado	ei	Uridina (0,30 mM)	+++ U, T +++ A, G, I ++ C - NBTI	456 aa
hENT2	Placenta humana	Complementación génica	Ubicuo	ei	Uridina (0,20 mM)	+++ A, I, T ++ G, C, Hp -/+ NBTI -nucleobases	456 aa

Tabla 2: Características moleculares de los sistemas de transporte concentrativo y equilibrativo

El homólogo humano, hCNT1, se clonó a partir de ARN de riñón (Ritzel y col., 1997) y de él se han descrito dos isoformas, hCNT1a y hCNT1b, aunque las diferencias entre ambas parecen deberse exclusivamente a la existencia de un polimorfismo en este

gen, sin que afecte a la actividad de la proteína. La homología entre el transportador de rata y hCNT1a es de un 83% y con hCNT1b de un 99%. Ésta era la primera evidencia de que un miembro de la familia de los CNTs existía en células humanas. El gen de hCNT1 se ha localizado en el cromosoma 15q25-26.

La clonación de un sistema de transporte N1 se consiguió mediante la misma estrategia de expresión en oocitos de *Xenopus laevis* de ADNc de hígado de rata (Che y col. 1995). El ADNc obtenido codifica para un transportador llamado inicialmente SPNT (*Sodium Purine-preferring Nucleoside Transporter*) actualmente rebautizado como **rCNT2** (*rat Concentrative Nucleoside Transporter 2*). rCNT1 tiene un 64% de homología con rCNT2, pero hay diferencias en la especificidad de sustrato y su distribución tisular. Adicionalmente, pequeñas diferencias, como la presencia del motivo de unión de ATP/GTP o de los lugares fosforilables por la proteína quinasa A, hacen pensar en una regulación diferencial de ambas isoformas. Sea como fuere, los dos subtipos de transportadores formarían parte de una misma superfamilia génica que incluye algunos transportadores de nucleósidos bacterianos como NupC de *Escherichia coli*, que llevan a cabo el simporte con protones y no con iones sodio (Craig y col. 1994). La isoforma humana correspondiente a la actividad N1 fue clonada a partir de riñón humano por homología y RT-PCR y se la denominó hSPNT1. La expresión en oocitos de *Xenopus laevis* identificó esta proteína como un transportador de nucleósidos que transporta de forma selectiva nucleósidos purínicos, pero también uridina. Esta isoforma consta de 658 aminoácidos y tiene un 81% de identidad con rCNT2, aunque difiere considerablemente de rCNT2 en el extremo N-terminal, en términos de estructura primaria. Otra diferencia es la presencia de un elemento repetitivo Alu de unos 282 pares de bases que se observa en la región no transcrita 3' del ADNc de hSPNT (Wang y col. 1997b). De forma paralela también se clonó una proteína a partir de intestino delgado humano por Ritzel y colaboradores en 1998 correspondiente a la actividad N1 y a la que llamaron hCNT2 y, debido a que la secuencia es casi idéntica a hSPNT1 excepto por un cambio de un aminoácido en el residuo 75, se consideró que se trataba de la misma isoforma, a la que a partir de ahora llamaremos hCNT2. hCNT2 presenta un 83 % de homología con rCNT2 y un 72 % respecto a hCNT1.

Posteriormente, una estrategia basada en la técnica de PCR ha permitido aislar 2653 pb de un ADNc que codifica para la correspondiente isoforma murina mCNT2. La secuencia proteica deducida exhibe un 93 % y un 80 % de identidad con rCNT2 y hCNT2. La transfección transitoria de este ADNc en células COS-1 es coherente con una actividad de transporte de uridina N1. El gen de mCNT2, de aproximadamente 13,7 Kb y codificado por 15 exones, ha sido mapado en el cromosoma de ratón 2e3 mediante técnicas de hibridación *in situ* (Patel y col., 2000).

Los dominios estructurales involucrados en la unión de los sustratos y los determinantes moleculares responsables de la diferente selectividad de transporte se han

identificado mediante la generación de quimeras a partir de los transportadores de rata, rCNT1 y rCNT2. Datos recientes muestran que la sustitución de los dominios transmembrana 8-9 de la isoforma rCNT1 por los de rCNT2 convierte un transportador pirimidino-preferente en un transportador selectivo para purinas. Si lo que se transfiere es exclusivamente el dominio transmembrana 8, la quimera muestra una amplia especificidad de sustrato, acercándose a lo que sería la actividad de transporte N3 (Wang y Giacomini, 1997) aunque la estequiometría sodio/nucleósido continúa siendo 1:1 (Wang y Giacomini, 1999). Debido a que entre el dominio transmembrana 8 de rCNT2 y rCNT1 sólo hay una diferencia de 5 residuos, su sustitución uno a uno ha permitido identificar los aminoácidos críticos para la selectividad de sustrato. La especificidad para nucleósidos pirimidínicos de rCNT1 se pierde al sustituir la Ser³¹⁸ por la glicina equivalente en rCNT2. Si bien los cuatro residuos restantes no parecen estar implicados, lo que sí se ha demostrado es que la Gln³¹⁹ adyacente, contribuye en cierta medida a modular la afinidad aparente del transportador (Wang y Giacomini, 1999).

Análogamente, y mediante el uso de técnicas diversas, se han identificado los aminoácidos responsables de la especificidad de sustrato de las isoformas humanas, que han resultado ser equivalentes. Así, la sustitución en la Ser³¹⁹ del dominio transmembrana 7 de hCNT1 por la Gly³¹³, equivalente en hCNT2, posibilita el transporte de purinas y convierte el sistema N2 en un sistema N3. El cambio adicional de la Ser³⁵³, en el dominio transmembrana 8 de hCNT1, por la Thr³⁴⁷ correspondiente de hCNT2, convierte la nueva actividad N3 en una del tipo N1. La sustitución de los residuos adyacentes en hCNT1, Gln³²⁰ y Leu³⁵⁴, por sus equivalentes en hCNT2, aumenta la actividad de transporte y pone de manifiesto su implicación probable en el empaquetamiento de las hélices (Loewen y col., 1999).

Respecto a la topología de estos transportadores concentrativos, se había propuesto una topología de 14 dominios transmembranana, con 5 posibles lugares de N-glicosilación, varios para la fosforilación por proteínas quinasas A y C y un motivo de unión de ATP/GTP en el extremo N-terminal; pero estudios realizados con anticuerpos apuntan hacia una nueva predicción de un modelo de 13 dominios transmembrana (Hamilton y col., 1997). En un trabajo reciente, Hamilton y colaboradores (2001) han definido la distribución subcelular y la topología de rCNT1. Inequívocamente ambas o una de las asparaginas Asn^{605/648} situadas en el extremo carboxílico de la proteína estarían glicosiladas, hecho que implica su ubicación en el espacio extracelular. Los potenciales lugares de N-glicosilación en el extremo amino-terminal o entre los dominios transmembrana (hélices 4 y 5) se mantendrían sin cadenas oligosacáridas. El modelo propuesto es, en consecuencia, un modelo con 13 dominios transmembrana, el extremo amino-terminal citoplasmático y el extremo C-terminal extracelular (figura 2).

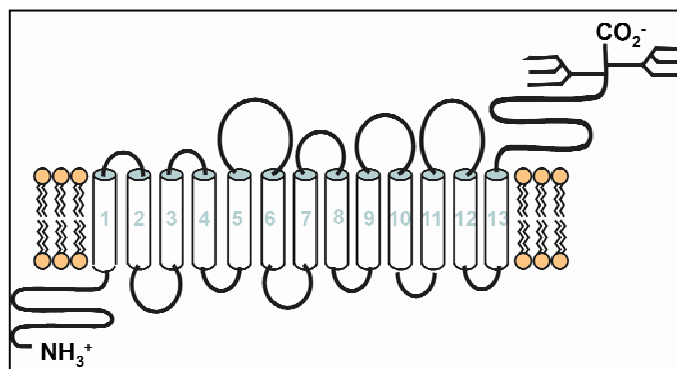


Figura 2. Topología propuesta para la familia de transportadores concentrativos (CNTs)

Teniendo en cuenta las evidencias que describen la actividad N3 en plexo coroideo de conejo (Wu y col., 1992), oocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con ARNm de yeyuno de rata (Huang y col., 1993), células de leucemia humana (Belt y col., 1992), células de carcinoma colorectal Caco2 (Belt y col., 1993) y células de la microglía de rata (Hong y col., 2001), se han buscado entidades del tipo CNT como potenciales representantes del sistema de transporte N3. Esto ha llevado finalmente a la identificación de ESTs (**Expressed Sequences Tags**) que codifican para regiones, parcialmente solapadas, correspondientes al extremo carboxi-terminal de un nuevo CNT humano, diferente a hCNT1/2 y no identificado previamente. El ADNc de la secuencia completa del potencial transportador se ha obtenido mediante técnicas de 5'-RACE y RT-PCR a partir del mensajero de células HL-60 diferenciadas con ésteres de forbol (PMA), que constituyen una fuente definida de actividad N3, y de glándula mamaria, que fue el origen de uno de los ESTs identificados. El ADNc codifica para una proteína de 691 aminoácidos (77 kDa) que se ha atribuido a **hCNT3**, y que ha permitido, adicionalmente, identificar los ESTs correspondientes al extremo carboxi-terminal de la isoforma murina, a partir de glándula mamaria de ratón. En este caso, la secuencia completa se ha obtenido por 5'-RACE y RT-PCR a partir de hígado y codifica para una proteína, mCNT3, de 703 aminoácidos (Ritzel y col., 2001b).

Ambas proteínas son homólogas en un 79%. La homología existente entre la isoforma humana de este nuevo transportador y hCNT1 y hCNT2 es de un 48% y un 47%, respectivamente, en su secuencia de aminoácidos. hCNT3 consta de 691 residuos, mientras que hCNT1 y hCNT2 presentan 650 y 658, respectivamente. Estas diferencias se justifican por la longitud de los dominios transmembrana 5-6, 9-10 y 11-12 de hCNT3, que son más largos que los de los otros dos transportadores concentrativos. A pesar de las diferencias entre estos tres transportadores de nucleósidos, todos son capaces de transportar uridina, por lo que se le considera el sustrato universal en los procesos de transporte de nucleósidos. De todas formas, cuando se analizan las secuencias y la

homología entre ellas, se ve que la zona menos conservada se encuentra entre los dominios transmembrana 1-3. El transportador de nucleósidos en bacterias NupC (Craig y col., 1994) no presenta los dominios transmembrana 1-3, lo que hizo pensar que la zona clave para la funcionalidad de la proteína se encuentra entre los dominios 4-13. Para su comprobación, se realizó una construcción en la que se había eliminado la parte de la secuencia correspondiente a los dominios 1-3 de rCNT1 y, efectivamente, la proteína conservaba su capacidad de transporte (Ritzel y col., 2001a)

En cuanto a las actividades concentrativas N4 y N5, hasta el momento, no han sido clonadas.

1.2.2 Transportadores equilibrativos

Debido a que los eritrocitos son células que presentan un sistema de transporte equilibrativo por difusión facilitada independiente de sodio y sensible a NBTI (es), fueron de los primeros tipos celulares utilizados para el estudio de estos transportadores. Teniendo en cuenta esta información, la proteína correspondiente a la actividad es se purificó parcialmente mediante una técnica de unión a NBTI (Jarvis y Young, 1981). De todas formas, no fue hasta más adelante cuando se clonó el primer transportador equilibrativo, **hENT1** (de **human Equilibrative Nucleoside Transporter 1**) de 456 residuos, mediante microsecuenciación de la proteína purificada gracias a su capacidad para unirse a NBTI marcado (Griffiths y col. 1997). Esta proteína consta de 11 dominios transmembrana conectados por regiones hidrofílicas cortas, excepto 2 grandes bucles entre los dominios transmembrana 1/2 y 6/7 que contendrían posibles lugares de N-glicosilación (figura 3). Su gen ha sido mapado en el cromosoma 6p21.1-p21.2 (Coe y col., 1997). Más adelante, se identificaron las dos proteínas de transporte equilibrativo en rata (rENT) por homología y expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis* de los dos ADNc. Se utilizó una amplificación por RT-PCR con oligonucleótidos basados en la anterior proteína clonada hENT1 y en HNP36 (una proteína citosólica de papel desconocido) para aislar rENT1 a partir de pulmón, yeyuno e hígado. rENT1 muestra un 78% de homología con la secuencia de aminoácidos de su homólogo humano y codifica para una proteína de 457 residuos (50 kDa), uno más que hENT1. La otra proteína, **rENT2**, se aisló por clonaje por homología de yeyuno de rata. Cuando se expresó este ADNc en oocitos de *Xenopus laevis*, se comprobó que rENT2 mostraba la actividad correspondiente a *ei*. rENT2 es una proteína formada por 456 aminoácidos, mostrando una similitud del 49% con rENT1 y un 50% con hENT1 (Yao y col., 1997).

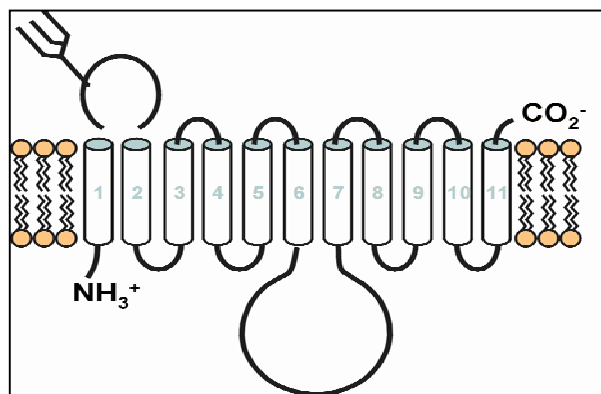


Figura 3. Topología propuesta para la familia de transportadores equilibrativos (ENTs)

En tercer lugar, se clonó hENT2 de forma casi simultánea por dos grupos de investigación distintos a partir de un ADNc de placenta humana (Griffiths y col. 1997b, Crawford y col. 1998b). Griffiths y colaboradores (1997), mediante técnicas de clonación por homología y posterior expresión funcional en oocitos, aislaron un ADNc de placenta humana (el mismo tejido del cual se había aislado el ADNc de **es-hENT1**) que codificaba para el transportador. Paralelamente, Crawford y colaboradores describieron la clonación de 2,6 kb de un ADNc que expresaron por complementación funcional en una sublínea mutada de leucemia humana CEM, deficiente en transporte de nucleósidos (Crawford y col., 1998b). hENT2 es una proteína de 465 aminoácidos con un 46-50 % de identidad con hENT1.

Con el fin de determinar los dominios responsables de la selectividad de sustrato de los transportadores ENT, se han utilizado los inhibidores del transporte *es* y el hecho que compartan requerimientos estructurales con los sustratos naturales ha permitido determinar los dominios responsables del reconocimiento y unión al NBTI. Estas regiones, presumiblemente involucradas en la translocación de nucleósidos han sido confinadas, por el momento, entre los dominios transmembrana 3-6 (Sundaram y col., 1998; Sundaram y col., 2001). La sustitución de la Gly¹⁵⁴ de hENT1 por el residuo equivalente en hENT2 no afecta a la actividad de transporte pero supone la pérdida de la sensibilidad a NBTI. El proceso contrario, sin embargo, no sensibiliza hENT2, indicando que además de la Gly¹⁵⁴, otros residuos deben participar en la sensibilidad diferencial de *es* y *ei* al inhibidor (Hyde y col., 2001).

Exceptuando la última clonación de las isoformas murinas mENT1 y mENT2 (Hammond y Kiss, 1999), los avances más novedosos en el terreno de los transportadores equilibrativos quedan recogidos en la revisión de Hyde y colaboradores en el año 2001: Algunos miembros de la familia de los ENTs tienen la capacidad de transportar nucleobases y, adicionalmente, se han descrito dentro de esta familia transportadores concentrativos protón-dependientes. Aunque su función predominante es la recuperación

de nucleósidos, estas moléculas se han comenzado a utilizar como potenciales dianas de fármacos vasodilatadores así como vías de entrada de un gran número de fármacos citotóxicos en humanos y protozoos.

La clonación de ENT3 y ENT4 es muy reciente. La isoforma humana de ENT3 es una proteína de 475 residuos con una identidad del 29% con hENT1 y de un 74% con mENT3. este transportador se localiza intracelularmente y parece que su actividad de transporte es relativamente insensible a la NBTI, dipiridamol o dilazep. Aunque se trata de una proteína no dependiente de sodio sí que parece que depende del pH. La proteína hENT4 consta de 530 residuos y es idéntica en un 86% a su homóloga murina, mientras que con hENT1 sólo comparte un 18% de identidad (Baldwin y col., 2004, 2005).

1.3 REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

La captación de nucleósidos mediante la actividad de sus transportadores está regulada por una gran variedad de factores como hormonas o la progresión del ciclo celular. No existen muchos estudios sobre la regulación de estos sistemas de transporte ya que el interés general se ha dirigido hacia la clonación de estos transportadores. En este apartado del trabajo se detallarán algunos de estos estudios, a modo de ejemplo, con la intención de mostrar la complejidad de esta modulación.

Los primeros estudios de regulación de transportadores concentrativos de nucleósidos se realizaron en un modelo de regeneración hepática de ratas parcialmente hepatectomizadas, en el que se mostraba una inducción de la actividad de transporte durante la fase pre-replicativa de regeneración del hígado. Este efecto podría indicar un aumento del número de transportadores, pero sin cambios en la afinidad del transportador hacia el sustrato (Ruiz-Montasell y col. 1993).

Las primeras evidencias de que estos sistemas de transporte podrían estar regulados por hormonas se obtuvieron en un estudio comparativo entre ratas obesas y normales. Los resultados mostraron un aumento de la actividad de transporte dependiente de sodio asociado a un cambio en el valor de la V_{max} , mientras que los valores de K_m se mantenían invariables. Este cambio se atribuyó a un aumento del número de transportadores de la superficie de las vesículas, aunque además se observó una inducción de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa que tendría como fin mantener el gradiente de sodio y permitir la captación de los sustratos para la síntesis de ADN y proteínas (Ruiz-Montasell y col. 1994). Estos resultados también se observaron en un modelo *in vivo* en ratas con hiperinsulinemia. En este mismo estudio, se observaron los efectos del glucagón en cultivos primarios de hepatocitos, mostrando una inducción transitoria y dosis dependiente de la actividad concentrativa (Gómez-Angelats y col. 1996).

Se ha descrito que la incubación de las células cromafines con la hormona tiroidea T_3 durante un periodo de tiempo largo (26 horas) provoca un aumento en el transporte de adenosina debido a un aumento del número de transportadores, medido por unión a la

NBTI, mientras que la afinidad del transportador por su sustrato no se ve alterada, así como tampoco se altera la afinidad a la unión de NBTI. Estos efectos requieren un mecanismo de síntesis proteica, ya que en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, la capacidad del transporte de adenosina se ve disminuída a la mitad (Fideu y Miras-Portugal, 1992). Otras hormonas como los glucocorticoides, los esteroides sexuales y el ácido retinoico inhiben el transporte de adenosina después de 24 horas de incubación. En este caso, los efectos se deben a una disminución de la capacidad del transportador de alrededor de un 20%. Las hormonas esteroideas antagonizan el efecto activador llevado a cabo por la hormona tiroidea (Fideu y Miras-Portugal, 1993).

Mediante experimentos de Northern blot, se pudo observar que los cambios en la actividad concentrativa de transporte de los modelos descritos anteriormente estaban asociados a un incremento de los niveles de ARNm de CNT2, lo que llevó a pensar en una regulación transcripcional del gen CNT2 (Felipe y col. 1997). Una vez que fueron clonados los ADNcs de los sistemas concentrativos CNT1 y CNT2, se generaron anticuerpos contra ambas isoformas de rata. Mediante experimentos de Western blot y Northern blot, se llegó a la determinación de que ambas isoformas coexisten en las células parenquimales hepáticas, aunque podrían diferenciarse en su localización subcelular y en una regulación específica (Mercader y col, 1996; Felipe y col., 1997).

La línea celular FAO, derivada de hepatoma de rata, mantiene muchas características celulares y bioquímicas de un hepatocito diferenciado. La actividad de transporte mayoritaria en esta línea se corresponde a un transporte equilibrativo y en menor grado al sistema N1 (CNT2), mientras que en hepatocitos normales la actividad mayoritaria es debida a las isoformas concentrativas CNT1 y CNT2 (del Santo y col, 1998). Esto permitió deducir que la expresión de CNT2 venía regulada por la progresión del ciclo celular debido a que los niveles de ARNm de CNT2 aumentaban a medida que entraban en el ciclo celular las células FAO que habían sido sincronizadas en cultivo. En este modelo, se observó el mismo patrón de expresión para ENT2 pero no para ENT1, lo que indicaría una expresión diferencial de ambas isoformas equilibrativas en un mismo tipo celular.

El estado de diferenciación celular puede influir en la regulación de estos transportadores. A partir de un modelo transgénico de hepatocarcinogénesis de rata, se generaron dos líneas celulares: L25, que deriva del tejido tumoral y L37, derivada de células parenquimales del mismo hígado pero no afectadas por la transformación. Se observó que tanto el tejido como la línea celular tumorales perdían la expresión de CNT1, mediante pruebas de inmunohistoquímica, Western-blot y Northern blot (Dragan y col. 2000).

En células de neuroblastoma humano LA-N-2 indiferenciadas, el transporte de formicina B se realiza únicamente mediante el sistema de transporte es. Cuando se

diferencian estas células en un medio libre de suero, la captación de formicina B se ve aumentada, pero no lo hace el número de lugares de unión a NBTI ni tampoco se observa un transporte dependiente de sodio. Este aumento en la captación de formicina B se podría deber a un aumento en la expresión funcional del sistema de transporte de nucleósidos resistente a NBTI, ya que a concentraciones de NBTI que bloquean totalmente el transporte en las células indiferenciadas, un 18% de la captación es resistente a su inhibición (Jones y col., 1994)

Se han descrito los sistemas de transporte en las células indiferenciadas HL-60 y su regulación mediante la inducción de la proliferación con PMA (Lee y col., 1994). Se ha visto que estas células presentan un transporte mayoritariamente equilibrativo, correspondiendo un 70 % de este transporte al sistema *es*. El 30% restante correspondería al sistema *ei* y a un sistema dependiente de sodio minoritario. Mediante PMA se observa una disminución de 20 veces en la capacidad o V_{max} de ambos transportadores equilibrativos. Esto está acompañado por una caída del número de uniones a NBTI. En el efecto del PMA parece estar involucrada la proteína quinasa C, ya que su adición de forma exógena disminuye el número de lugares de unión a NBTI mediante un posible cambio conformacional en el lugar de unión y de transporte del sustrato.

Respecto a la regulación dependiente de la disponibilidad de sustrato, se han realizado estudios en modelos *in vivo*. Se ha visto que CNT1 es sensible a la disponibilidad de nutrientes en el intestino delgado, ya que su expresión se veía incrementada en la superficie del epitelio intestinal en ratas mantenidas en ayuno durante 48 horas. También se ha observado un aumento en la captación dependiente de sodio de timidina y gemcitabina (una droga derivada de nucleósidos pirimidínicos). Parece que el responsable de estos efectos son los nucleótidos de la dieta, ya que si se administra a las ratas una dieta libre de nucleótidos, se observa un incremento de la expresión de CNT1 (Valdés y col., 2000).

Estudios de regulación de la expresión de transportadores de nucleósidos concentrativos demuestran que induciendo un arresto en G_1/S en las células FAO cae la expresión de la proteína CNT1 y ésta se restituye con la eliminación del medio del agente que causaba el arresto, la mimosina. La regulación de su expresión con el tiempo se produce paralelamente a la acumulación de proteínas de ciclo celular implicadas en el arresto, como la ciclina E y la ciclina A, demostrando que CNT1 se encuentra altamente regulado por el ciclo celular (Valdes y col., 2002).

Un trabajo realizado en nuestro laboratorio con ratones knockout del receptor-I de TNF-alfa (TNFR1) y de IL-6 muestra como TNF-alfa e IL-6 inducen de forma independiente la expresión de CNT1 en la línea celular FAO y células parenquimales hepáticas mediante mecanismos dependientes de PI-3 quinasa y ERK respectivamente. Los resultados referentes al estudio *in vivo* muestran que los niveles de proteínas del

transportador fueron inferiores en aquellos hígados de los ratones knockout para TNFR1, pero no en los correspondientes a IL-6, aunque la administración de IL-6 sólo recuperó parcialmente la expresión de CNT1 en este caso. Este estudio identifica al TNF-alfa como un modulador prioritario del transportador CNT1 y sugiere un rol secundario para IL-6 (Fernández-Veledo y col., 2004)

2. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

Los **transportadores equilibrativos** se caracterizan por encontrarse ampliamente distribuidos. ENT1 es prácticamente ubicuo y se detectan niveles de ARNm en eritrocitos, placenta, cerebro, corazón, hígado, pulmones y colon. Los niveles máximos del ARNm de hENT2 se han encontrado en músculo esquelético y en menor grado en intestino, tejido cardiovascular y líneas derivadas de leucemia. El hecho de que ambos sistemas equilibrativos coexistan en un mismo tipo celular cuando presentan características cinéticas y especificidad de sustrato similares podría explicarse, en parte, por el transporte de hipoxantina, una base púrica que sólo se transporta a través del sistema ENT2 o *ei* (Osses y col., 1996).

La actividad de transporte equilibrativa también se encuentra presente en los hepatocitos, pero el ARNm de los dos transportadores equilibrativos ENT1 y ENT2 es de difícil detección (del Santo y col., 1998). A pesar de los resultados de algunos estudios en membranas de hígado total donde se han observado niveles elevados de unión a NBTI (Wu y Young, 1984), la mayoría de la actividad de transporte medida en hepatocitos aislados de rata adulta parece ser mediada por ENT2, lo que sugiere que otros tipos celulares hepáticos contribuyen a la unión de alta afinidad por este análogo.

Existe un estudio comparativo de la expresión de los ARNm de los transportadores de nucleósidos en rata y ratón, lo que tiene importancia en cuanto a que en el desarrollo de fármacos o en ensayos de toxicología estos animales son necesarios antes de llevar a cabo estudios clínicos en humanos. Asimismo, se observó que ENT1, como era de prever, se encuentra expresado de forma ubicua en todos los tejidos analizados, aunque los niveles máximos se encontraron en testículos de ambas especies. También se detectaron niveles elevados-moderados en pulmón, aunque la proporción fue muy superior en rata que ratón. En cuanto a ENT2, también se localizó en todos los tejidos analizados y en ambas especies testículos y cerebro fueron los dos tejidos con la máxima expresión (Lu y col., 2004).

El transporte de nucleósidos juega un papel importante en la regulación de los niveles de adenosina extracelular y en la actividad de sus receptores, por lo que se han realizado estudios sobre la distribución de los dos sistemas equilibrativos en cerebro de rata, donde la adenosina juega un papel de neuromodulador. Tanto rENT1 como rENT2

están ampliamente distribuidos a nivel celular y regional, incluyendo regiones como el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado y el cerebelo (Anderson y col., 1999a, b). En humanos, se ha comprobado mediante anticuerpos dirigidos contra las isoformas humanas de estos transportadores equilibrativos por Western-blot que hENT1 está más presente en los lóbulos frontal y parietal de la corteza cerebral, tálamo, mesencéfalo y ganglios basales, mientras que hENT2 parece estar más concentrado en el cerebelo y en regiones del tronco encefálico, particularmente en el pons. Esto puede sugerir que estas proteínas pueden estar producidas en distintas regiones del sistema nervioso central (Jennings y col., 2001). Un nuevo trabajo de Peng y colaboradores muestra la expresión y funcionalidad de ENT1 y ENT2 en cultivos primarios de astrocitos de ratón, donde el transporte de nucleósidos es importante ya que a parte de ser necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, los astrocitos sintetizan AMP, ADP y ATP a partir de adenosina y GTP a partir de guanosina y además tanto uno como otro nucleósido pueden intervenir como neuromoduladores, cuyos efectos acaban parcialmente en un transporte celular (Peng y col., 2005).

ENT3, el miembro más reciente de este grupo de transportadores se encuentra expresado de forma muy parecida en rata y ratón. Su ARNm se localiza en la gran mayoría de tejidos, aunque aquellos que muestran los niveles más elevados son el riñón seguido de los testículos. En ratas, se ha observado una expresión predominante en machos respecto a las hembras en pulmón, estómago, corazón y vasos sanguíneos (Lu y col., 2004)

En cuanto a los **transportadores concentrativos**, en 1996, Mercader y colaboradores observaron que en hepatocitos detectaban una actividad de transporte dependiente de Na^+ cinéticamente heterogénea y que era consistente con la expresión de al menos dos sistemas de transporte independientes (Mercader y col., 1996). Hasta entonces se había llegado a aislar el ADNc de la proteína responsable del transporte de nucleósidos púricos dependiente de Na^+ a partir de células de hígado (SPNT o *sodium purine nucleoside transporter*) (Che y col., 1995). Estos datos indicaban que faltaba una actividad por identificar en el hígado que debía corresponder a un segundo transportador de nucleósidos preferente para pirimidinas. Mediante técnicas de Northern-blot y RT-PCR se identificó este segundo transportador en el hígado, resultando idéntico a la isoforma conocida como CNT1 (Felipe y col., 1998). Conjuntamente, se utilizaron anticuerpos específicos contra las isoformas de CNT1 y CNT2, que mostraron un enriquecimiento de CNT2 en vesículas de membrana plasmática de hígado respecto a homogenados, mientras que con CNT1 ocurrió lo contrario, lo que indicaba una posible localización subcelular diferente para cada uno de estos transportadores (Felipe y col. 1998). Anteriormente ya se había sugerido la posibilidad de que los transportadores de nucleósidos también estuvieran localizados en la membrana del canalículo de hígado en

relación a una necesidad de recuperación de los nucleósidos generados por las ecto-ATPasas canaliculares (Che y col., 1995)

También mediante el uso de anticuerpos, se detectó la presencia de CNT1 en intestino, hígado y riñón mediante técnicas de inmunofluorescencia (Hamilton y col., 2001). Así, en secciones de yeyuno se localizó una intensa señal en membranas en cepillo, mientras que no se detectó localización alguna en las membranas basolaterales. En cuanto al riñón, la localización de CNT1 se concentró en la superficie de las células epiteliales de la membrana en cepillo de túbulos corticales (Hamilton y col., 2001), lo que era consistente con las actividades de transporte detectadas en preparaciones de la membrana en cepillo renal (Le Hir, 1990). En hígado, CNT1 sólo se encontró en células parenquimales y restringido a las membranas del canalículo biliar, mientras que no se manifestó en las membranas basolaterales (Hamilton y col., 2001); de hecho, la localización subcelular y el tráfico de CNT1 y CNT2 en hepatocitos se encuentran regulados de forma diferencial, de manera que CNT1 sigue la vía de transcitosis hacia la membrana canalicular, mientras que CNT2 se encuentra altamente expresado en la membrana basolateral (Dufloy y col., 2002). Históricamente, se ha considerado que la distribución tisular de hCNT1 se encontraba concentrada en epitelios especializados (riñón, intestino delgado, hígado) y algunas partes del cerebro y la de hCNT2, además de localizarse en algunos de estos epitelios, también se observa en otros tejidos (pulmón, cerebro, corazón y músculo esquelético). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación muestran una distribución más extensa de estos sistemas concentrativos de transporte gracias a la disponibilidad de anticuerpos contra las isoformas de rata (Valdés y col., 2000). En estos estudios se realizó un análisis mediante Western blot de diferentes tejidos, mostrando que rCNT2 se localiza, además de en los tejidos mencionados, en páncreas y tejido adiposo marrón. Además, se pudo ver que la expresión de este transportador en riñón no se detectaba en Western blot si no era mediante la utilización de vesículas renales. En cuanto a rCNT1, se detectaron niveles muy elevados en riñón e hígado, pero también, aunque en menor grado, en tejido adiposo marrón, intestino, corazón y pulmón. CNT2 también ha sido localizado, tanto la expresión de su ARNm como funcionalmente, en cultivos primarios de astrocitos de ratón (Peng y col., 2005).

Existen niveles elevados del ARN mensajero de CNT1 en ratas y ratones en las tres secciones del intestino delgado, siendo mayoritarios en duodeno y yeyuno y no tanto en el íleo. También se han detectado niveles moderados en riñón y testículos de ambas especies. En cerebro de ratas y ratones, en corazón de ratas, estómago y próstata de ratón, así como la glándula pituitaria femenina en ratones, los niveles de CNT1 son bajos. En cuanto a CNT2 parece que la distribución entre ratas y ratones es muy similar, con la excepción del hígado de rata, donde CNT2 se encuentra altamente expresado y no tanto en el de ratón. Así, la expresión más elevada de CNT2 se encuentra en intestino delgado.

Se ha visto que las ratas hembra tienen una expresión superior en un 60% a la de los machos en el bazo y en vasos sanguíneos (Lu y col., 2004).

Respecto a hCNT3, parece que muestra una distribución más amplia que los dos anteriores, con una gran cantidad de transcritos en glándula mamaria, médula ósea, tráquea y páncreas; también se detecta en intestino, hígado, pulmón, placenta, próstata, testículos y diferentes partes de cerebro y corazón, aunque los niveles son bajos (Ritzel y col. 2001b). Cuando se estudia la presencia de CNT3 en rata y ratón, los patrones de expresión parecen ser muy diferentes. En ratas, los niveles más elevados de ARN mensajero se han encontrado en pulmón, siendo dicha expresión un 87% superior en machos respecto a hembras. En ratones, en cambio, los niveles del ARN más elevados se encuentran en útero, mientras que en el pulmón son bajos. En ambas especies, se ha encontrado una expresión moderada en testículo, próstata, ovario, cerebro, pituitaria y estómago y baja en el resto de tejidos, aunque en ratón también se ha de incluir una moderada expresión en intestino delgado, mientras que en rata es difícilmente detectable.

2.1 SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.1.1 Introducción

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la expresión de los transportadores de nucleósidos en cerebro, ya que apenas existe información acerca de estas proteínas en el sistema nervioso central, sobre todo en el caso de los transportadores concentrativos.

El Sistema Nervioso es un sistema de coordinación general del organismo, al igual que el sistema endocrino, aunque el sistema nervioso tiene una acción más localizada y permite respuestas rápidas (milisegundos) y de corta duración. El Sistema Nervioso se encuentra formado en su mayoría por tejido nervioso, pero también vasos sanguíneos y meninges. Este tejido está formado por células gliales y neuronas (figura 4). Estas últimas se caracterizan por sus prolongaciones, una membrana plasmática excitable y por su capacidad de establecer multitud de contactos celulares entre ellas para aumentar la comunicación. Tienen un citoesqueleto muy desarrollado con el que se asegura el transporte a través de las prolongaciones. Las células gliales son más abundantes que las neuronas (de 4 a 10 veces), también tienen prolongaciones y un citoesqueleto desarrollado. Estos tipos celulares se dividen según su función, por ejemplo, la oligodendroglía fabrica vainas de mielina, mientras que la microglía se trata de células fagocitarias implicadas en defensa. Los astrocitos tienen funciones tróficas y estructurales. Algunos autores les atribuyen un polémico rol en el almacenamiento de información (Robertson, 2002).

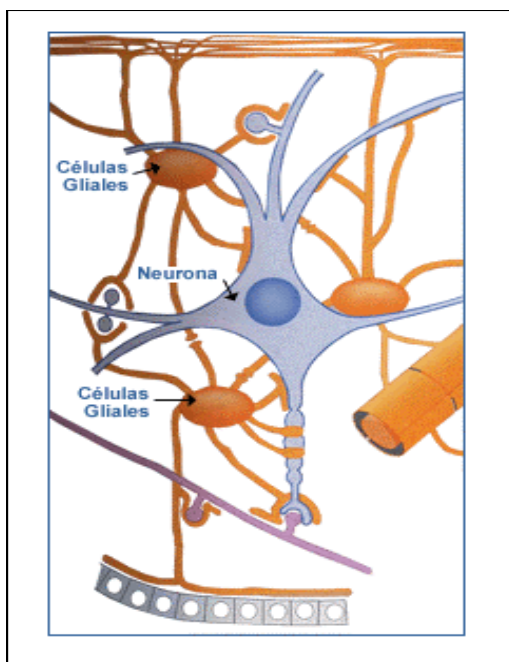


Figura 4: Las células gliales rodean a las neuronas y son de 10 a 50 veces más numerosas que éstas. Se trata de células de soporte. Las neuronas pueden tener numerosas dendritas ramificadas que se encargan de recibir la información procedente de otras neuronas, mientras que el axón consta de una región terminal donde se induce la liberación de una señal o neurotransmisor

El Sistema Nervioso se puede dividir según su anatomía en Sistema Nervioso Central (cerebro y médula espinal) y Periférico (nervios, ganglios nerviosos a los lados de la columna y terminaciones de nervios) y también funcionalmente en Sistema Nervioso Somático que controla la musculatura estriada frente a un estímulo y Sistema Nervioso Autónomo que a su vez se divide en Simpático (relacionado con estados de alerta) y Parasimpático.

La neurona es una unidad anatómica y funcional independiente, integrada por un soma del que salen numerosas dendritas capaces de recibir información procedente de otras células nerviosas, y de un axón, que conduce la información hacia otras neuronas en forma de corriente eléctrica. Las neuronas se conectan entre sí por contactos sinápticos y la transmisión de las señales a través de estas sinapsis se realiza mediante los neurotransmisores. Los neurotransmisores pueden actuar sobre receptores ionotrópicos, que son aquellos que forman parte de canales iónicos y tienen repercusiones en el balance iónico de la célula, o metabotrópicos, que se encuentran acoplados a proteínas G y que modulan la sensibilidad de la célula a un potencial de acción. Ambos tipos pueden localizarse en la célula post-sináptica o pre-sináptica, donde los receptores metabotrópicos tienen funciones reguladoras importantes. Tanto los ionotrópicos como los metabotrópicos pueden ser activadores o inhibidores y la generación del potencial de acción de la célula post-sináptica dependerá de la suma de entradas activadoras e inhibitoras.

El cerebro se encarga de las funciones motoras, sensitivas y de integración. Gracias a los circuitos formados por las neuronas, de las que puede haber unos 100.000 millones en un cerebro humano, el cerebro es capaz de procesar información sensorial procedente del mundo exterior y del propio cuerpo. El lóbulo occipital recibe y analiza las

informaciones visuales, mientras que los lóbulos temporales procesan ciertas sensaciones visuales y auditivas. Los lóbulos frontales están relacionados con el lenguaje, la inteligencia y la personalidad, mientras que los parietales se asocian con los sentidos del tacto y el equilibrio. En la base del encéfalo se encuentra el tronco cerebral, que es responsable de la respiración, la tos y el latido cardíaco y detrás de éste, el cerebelo, que coordina la posición corporal, el equilibrio y el tono muscular. En el centro del encéfalo se encuentra el sistema límbico que se vincula a la memoria; el hipocampo controla la memoria a corto plazo y el aprendizaje, forma parte del sistema límbico y controla las emociones y el estrés, mientras que el hipotálamo regula la hipófisis, productora de varias hormonas, y controla la sed y el hambre. La corteza cerebral es la responsable de las capacidades cognitivas del individuo, lo que nos permite ser conscientes, establecer relaciones y hacer razonamientos complejos (Reith y col., 1982).

La actividad cerebral consiste en procesar los miles de millones de impulsos nerviosos que se producen entre neuronas y que viajan a una velocidad de hasta 300 kilómetros por hora. Para transmitir la información son necesarios los neurotransmisores, sustancias químicas liberadas por las terminaciones nerviosas que transmiten impulsos de una neurona a otra, a un músculo o a una glándula. Las sinapsis son las zonas de unión entre dos neuronas por donde los impulsos nerviosos pasan en una sola dirección, del axón de una neurona a la dendrita de la otra.

La conducción de un impulso a través del axón es un fenómeno eléctrico causado por el intercambio de iones Na^+ y K^+ a lo largo de la membrana. En cambio, la transmisión del impulso de una neurona a otra o una célula efectora no neuronal depende de la acción de neurotransmisores específicos sobre receptores también específicos. Cada neurona individual genera un potencial de acción idéntico de cada estímulo y lo conduce a una velocidad fija a lo largo del axón. La velocidad depende del diámetro axonal y del grado de mielinización. Cuando un impulso llega a la terminal presináptica se abren los canales de Ca^{2+} . El Ca^{2+} entra y el neurotransmisor es liberado en el espacio sináptico. El neurotransmisor se une a su neuroreceptor y éste es el responsable del envío de señales que pueden desencadenar diferentes respuestas. El neurotransmisor será eliminado bien mediante un enzima que lo inactive, bien mediante la recaptación. Existen diferentes neurotransmisores que se pueden agrupar según sean activadores o inhibidores. Los aminoácidos glutamato y aspartato son los principales neurotransmisores excitadores del Sistema Nervioso Central, mientras que el ácido g-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más importante. El glutamato actúa tanto a través de receptores acoplados a canales iónicos (receptores ionotrópicos) como a receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos). La activación de estos receptores es la responsable de la transmisión sináptica excitadora y de muchas formas de plasticidad sináptica que se cree están implicadas en los procesos del aprendizaje y de la memoria. Dentro de los

receptores ionotrópicos se encuentran los receptores de kainato que se han considerado históricamente implicados en la epileptogénesis.

2.1.2 Receptores de adenosina en cerebro

Los receptores purinérgicos se dividen en dos grupos, los receptores P1 que se unen preferentemente a la adenosina modulando la actividad de la adenilato ciclasa y los P2 que regulan la actividad de la fosfolipasa C y las concentraciones de Ca^{2+} intracelular vía ATP (Burnstock y col., 1996). Los receptores de ATP constituyen otra categoría de receptores purinérgicos. Son receptores de membrana esenciales implicados en la transducción de señales.

Hasta el momento, se han clonado cuatro receptores P1 preferentes por adenosina (tabla 3); todos ellos constan de 7 dominios transmembrana, están acoplados a proteínas G y se encuentran ligados a mecanismos de transducción (figura 5). El receptor A_1 , el más abundante en cerebro, está acoplado a la activación de canales de K^+ (Trussell y Jackson, 1985) e inhibición de canales de Ca^{2+} , lo que da lugar a la inhibición de la actividad neuronal. Este receptor inhibe la adenilato ciclasa y activa la fosfolipasa C (PLC). Recientemente, se ha visto que concentraciones elevadas de agonistas de A_1 o niveles elevados de expresión del receptor potencian efectos en la PLC, lo que activa la proteína quinasa C (PKC) vía la producción de inositol trifosfato (IP_3) (Biber y col., 1997).

Receptor	Afinidad por Adenosina	Mecanismos de Transducción	Acciones en cerebro	Distribución en cerebro
A_1	~ 70 nM	-Inhibición de AC y canales de Ca^{2+} -Activación de GIRKs y PLC	Inhibición de la transmisión sináptica Hiperpolarización de neuronas	Amplia
A_{2A}	~ 150 nM	-Activación de AC y canales de Ca^{2+} ?? -Inhibición de canales de Ca^{2+}	Facilita/inhibe la liberación del neurotransmisor	Estriado, tubérculo olfativo y nucleus accumbens
A_{2B}	~ 5100 nM	-Activación de AC y PLC	Aumenta AMPc en secciones de cerebro. Modulación de función de canales de Ca^{2+}	Amplia (niveles bajos) por RT-PCR
A_3	~ 6500 nM	-Activación de PLC -Inhibición de AC -Aumento de Ca^{2+} intracelular	Desacopla A_1	Amplia (niveles bajos) por RT-PCR

Tabla 3: Tipos de receptores de adenosina. A_1 y A_{2A} son los receptores de alta afinidad, mientras que A_{2B} y A_3 se consideran de baja afinidad. La mayoría se encuentran ampliamente distribuidos en cerebro, pero los niveles más elevados corresponden a A_1 . Aunque A_{2A} también se expresa con niveles elevados, su localización es más limitada.

El receptor A_{2A} está presente con niveles elevados en algunas zonas concretas del cerebro como el estriado, nucleus accumbens y bulbo olfativo y se encuentra ligado a la activación de la adenilato ciclasa. El receptor A_{2B} también activa esta enzima y parece que se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, aunque con niveles bastante bajos, de forma que podría ser relevante en ciertas condiciones patológicas. Su estudio es difícil, ya

que no se conocen agonistas ni antagonistas de este receptor. Parece que los receptores A_1 y A_2 tienen efectos opuestos en la activación del AMP cíclico (AMPc), mientras que los efectos del primero sobre la adenosina son inhibidores en el tejido diana, a través de A_2 son excitadores. El cuarto de ellos, A_3 , está poco caracterizado pero parece que desacopla al receptor A_1 y los receptores de glutamato metabotrópicos vía un mecanismo dependiente de una proteína quinasa C (Dunwiddie y col., 1997; Macek y col., 1998), de esta manera, una de sus funciones podría ser la modulación de otros receptores. Este receptor se encuentra presente en niveles bajos en el sistema nervioso central. Existen datos que indican que la inosina puede ser un agonista más potente que la adenosina en la activación del receptor A_3 (Jin y col., 1997)

Un mismo receptor se puede unir a diferentes proteínas G; A_1 y A_3 se unen normalmente a proteínas G “inhibidoras” (G_i y G_o) mientras que A_{2A} y A_{2B} se unen a proteínas G “excitadoras” (G_s) (Linden, 1991).

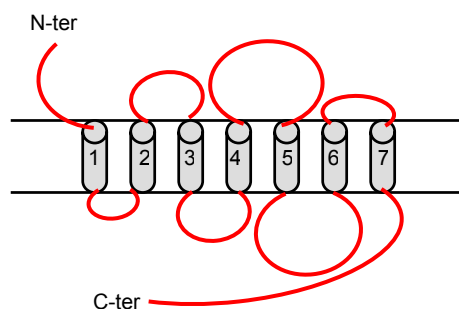


Figura 5: Topología típica de los receptores de adenosina. Son polipéptidos de 36 a 45 kDa que constan de 7 dominios transmembrana con un extremo C-terminal intracelular y el N-terminal extracelular.

Los receptores de adenosina se pueden localizar tanto presinápticamente (Thompson y col., 1992; Rebola y col., 2003) como postsinápticamente (Thompson y col., 1992; de Mendonza y Ribeiro, 1994; Rebola col., 2003) y una fracción significativa de estos receptores parece estar localizada fuera de la hendidura sináptica (Tetzlaff y col., 1987). Los receptores presinápticos causan hiperpolarización activando canales de potasio y los postsinápticos inhiben la entrada de calcio. Ambas vías conducen a la inhibición de la neurotransmisión (Thompson y col., 1992).

La adenosina endógena activa tanto los receptores A_1 como los A_{2A} y ambos pueden coexistir en la misma terminal nerviosa (Correia-de-Sá y col., 1991). Parece que la fuente de adenosina extracelular determina la preferencia por uno u otro tipo de receptor que será activado. Así, la adenosina que proviene de los nucleótidos de adenina actúa principalmente sobre los receptores A_{2A} , mientras que la adenosina liberada como tal prefiere los receptores A_1 (Cunha y col., 1996).

Existe mucha información acerca de la distribución de los receptores A_1 y A_{2A} debido a la disponibilidad de herramientas, mientras que en el caso de los otros dos receptores los datos no son tantos y se tiende a limitar a los niveles de ARNm

El receptor A_{2A} parecía tener una distribución limitada en el del sistema nervioso central, detectándose niveles muy elevados en el estriado y otros ganglios basales relacionados con sinapsis dopaminérgicas (para una revisión consultar Svenningsson y col., 1999). Mediante técnicas de hibridación *in situ* y autoradiografías de unión a ligando se demostró la presencia lugares de unión y ARNm de este receptor (Parkinson y Fredholm, 1990; Johansson y col., 1997; Svenningsson y col, 1997, 1998). Estudios posteriores han corroborado la expresión del receptor A_{2A} en el estriado mediante anticuerpos monoclonales (Rosin y col., 1998). Los primeros estudios con el agonista CGS 21680 confinaron a este receptor en el caudado putamen, nucleus accumbens, tubérculo olfativo y partes del globus pallidus (Jarvis y Williams, 1989), aunque estudios posteriores también detectaron unión a este agonista en hipocampo y corteza cerebral (Wan y col., 1990; James y col., 1992; Cunha y col., 1994)

Mediante anticuerpos policlonales dirigidos contra las isoformas de rata y humana del receptor de adenosina A_1 , se han localizado las zonas en las que este receptor se encuentra expresado. Así, se han encontrados niveles muy elevados de A_1 en muchas regiones del cerebro: en el hipocampo, concretamente en los cuerpos celulares y dendritas de las células granulares y en las neuronas piramidales; en el cerebelo, en las células *basket* y de una manera menos intensa, en las células granulares del cerebelo; en la corteza cerebral, las células piramidales fueron las que mostraron una mayor intensidad en el marcaje y algunas interneuronas también; en los ganglios basales, se localizó A_1 en el 43% de las células del globus pallidus y el caudado putamen, el 38% de las neuronas. También se localizaron niveles elevados de expresión en muchos núcleos talámicos y también en varios núcleos del tronco encefálico. (Rivkees y col., 1995).

2.1.3 Papel de la adenosina en el Sistema Nervioso Central

La adenosina no es un neurotransmisor clásico, ya que no se almacena en vesículas y no se conocen sinapsis donde el neurotransmisor principal sea este metabolito (Dunwiddie y Masino, 2001), por lo que la adenosina se considera un neuromodulador que actúa por otros sistemas. Este nucleósido actúa principalmente como un neuromodulador inhibitorio, inhibiendo la actividad neuronal, ya sea de neuronas excitadoras (colinérgicas y glutamatérgicas) como inhibitorias (GABAérgicas), aunque es mucho más potente inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitadores que inhibitorios. Post-sinápticamente, la adenosina inhibe la actividad neuronal aumentando la conductancia de potasio. La velocidad de la formación de adenosina se encuentra regulada por la actividad neuronal (Mitchell y col., 1993). Los niveles de adenosina empiezan a aumentar cuando la

proporción suministro/demanda de oxígeno disminuye bajo circunstancias como la isquemia, la hipoxia y la hipoperfusión (Van Wylen y col., 1986). Esto se ha entendido como un mecanismo de defensa para minimizar el daño celular y, así, las necesidades energéticas. La adenosina se forma principalmente a partir del AMP, paso catalizado por la 5'-nucleotidasa y extracelularmente por la enzima ecto-5'-nucleotidasa. Además, la adenosina también se puede generar intracelularmente a partir de la S-adenosilhomocisteína (SAH), mediante la acción de la SAH hidrolasa; la SAH procede de diversas reacciones de metilación que utilizan la S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo. La SAH hidrolasa se ha localizado en tejidos periféricos y también en el sistema nervioso central, pero el papel de esta vía en el cerebro no está claro. Los niveles de adenosina extracelular pueden controlarse tanto por el receptor A₁ como por A₂, ya que el bloqueo de A₁ aumenta la concentración extracelular de adenosina en fibroblastos cardíacos (Andresen y col., 1999), y la activación de los receptores A₂ en células cromafines activa el transporte de adenosina (Delicado y col., 1990). El transporte de la adenosina a través de la membrana celular es la principal vía para eliminar la adenosina del espacio extracelular (Gu y col., 1992). Las concentraciones de adenosina intra- y extracelular están en equilibrio gracias a los transportadores de nucleósidos. Se sabe que la adenosina se transporta a través de ENT1 en sinaptosomas (Gu y col., 1995).

Aunque la adenosina no sea un neurotransmisor clásico, existen evidencias sobre su implicación como mensajero sináptico retrógrado. Un simple aumento en la concentración intracelular de adenosina conduce a un incremento de la adenosina extracelular, lo que puede provocar la inhibición de la actividad sináptica. Esto puede producirse en una única célula de la región CA1 del hipocampo y como consecuencia inhibir las respuestas sinápticas. Estos datos sugieren que células individuales pueden regular su actividad sináptica aferente, lo que induce a pensar que las células piramidales usan la adenosina como un mensajero retrógrado para regular sus propias entradas sinápticas. (Brundege y Dunwiddie, 1996). Por otro lado, la liberación de adenosina por neuronas o glía da lugar a la vasodilatación, ya que se encuentra implicada en la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral (Wahl y Schilling, 1993) y la administración de antagonistas provoca vasoconstricción y revierte la vasodilatación mediada por la adenosina (Hylland y col., 1994; Dirnagl y col., 1994).

Se cree que la adenosina induce la transición de vigilia a sueño y que aumenta en cerebro anterior basal de ratas privadas de sueño (Porkka-Heiskanen y col., 1997, 2000). Durante los estados de vigilia, los niveles de adenosina son elevados y se acumulan alcanzando un umbral que es capaz de inhibir los núcleos colinérgicos del cerebro anterior basal implicados en el control del sueño y la vigilia (Porkka-Heiskanen y col., 1997; Mignot y col., 2002). El estudio de los cambios diurnos en los niveles extracelulares de adenosina en ratas muestran niveles elevados del nucleósido durante las doce horas de oscuridad,

cuando los animales están despiertos y activos, en comparación con las doce horas de luz correspondientes al periodo de sueño (Murillo-Rodríguez y col., 2004). Además, los agonistas del receptor A₁ producen cambios encefalográficos en ratas fuera de la fase REM (*rapid eye movement*), lo que concuerda con los observados por privación de sueño, sugiriendo la mediación de la adenosina en su control (Benington y col., 1995). En regiones cerebrales que regulan la vigilancia cortical, particularmente en el cerebro anterior basal, concentraciones extracelulares elevadas de adenosina inducidas por un estado de vigilia prolongado disminuyen la actividad de lo que podrían ser células colinérgicas y, vía este mecanismo, se podría promover la entrada en sueño. Se ha sugerido que los receptores A₁ del núcleo supraquiasmático regulan la respuesta del reloj circadiano a la luz (Elliott y col., 2001). El sueño está promovido por unas células del hipotálamo: las células GABAérgicas del área preóptica ventrolateral (VLPOA) y células cercanas a éstas en el área preóptica (Sherin y col., 1996; Szymusiak y col., 2000). Estas neuronas son muy numerosas en el hipotálamo anterior preóptico (POAH) y se ha observado que lesiones en el POAH en ratas y gatos producen una reducción significativa del sueño. La microinyección de adenosina (Ticho y col., 1991) así como de triazolam, una benzodiazepina que disminuye el tiempo de vigilia, (Mendelson y col., 1989) y prostaglandina D₂, un prostanóide promotor de sueño, (Ueno y col., 1983) en el POAH aumenta el sueño. A pesar de estos datos, las neuronas del POAH/VLPO pueden no estar involucradas en la mediación de la somnolencia asociada a estados de vigilia prolongados, ya que se ha visto que las neuronas del VLPO están activas solamente durante la etapa de sueño, pero no durante periodos de somnolencia que preceden al estado de sueño, por ejemplo en estados de vigilia prolongada (Szymusiak y col., 1998; Porkka-Heiskanen y col., 2000). Se han realizado observaciones en las que, tras 6 horas de privación de sueño, la concentración de adenosina aumenta en el cerebro anterior basal dos veces el valor detectado al inicio del periodo de privación de sueño (Porkka-Heiskanen y col., 2000; Porkka-Heiskanen y col., 1997). Durante el periodo de recuperación, tras el final de la privación de sueño, los niveles de adenosina disminuyen de forma gradual en 2-3 horas. En este experimento se encontraron diferencias de niveles del receptor, lo que indica que la adenosina extracelular se acumula selectivamente en el cerebro anterior basal y también en la corteza, mientras que en otras zonas estudiadas, como el tálamo, no se han encontrado estos cambios de concentración de adenosina. Estudios preliminares han mostrado una disminución de los niveles de ENT1 tras 6 horas de privación de sueño en el cerebro anterior basal, aunque no en la corteza cerebral (Porkka-Heiskanen y col., 2002).

En cuanto a las funciones de la adenosina en condiciones patológicas, la mayor parte de los procesos tienen como último fin la neuroprotección y, además de ofrecer efectos protectores agudos, también se produce la activación transitoria de los receptores de adenosina de manera que se aumenta la protección en casos de hipoxia o isquemia

(Miura y Tsuchida, 1999). Parece que esta neuroprotección está mediada mayoritariamente vía el receptor de adenosina A₁: la adenosina inhibe la liberación del neurotransmisor, se hiperpolarizan las neuronas y se inhiben de forma directa ciertos canales de Ca²⁺. Todas estas acciones pueden reducir la citotoxicidad limitando la entrada de Ca²⁺ y reduciendo la demanda metabólica, lo que puede ayudar a mantener las reservas de ATP esenciales para bombear el calcio hacia el exterior celular. La adenosina interviene como anticonvulsivo en procesos epilépticos (Dunwiddie, 1999), mientras que antagonistas de los receptores de adenosina tienen efectos pro-convulsivos (Ault y col., 1987). De hecho, se ha localizado una reducción crónica de los receptores A₁ en el tejido epiléptico, tanto en humanos como en ratas (Ochiishi y col, 1999).

La cafeína es una sustancia que actúa bloqueando los receptores de adenosina aumentando la actividad neuronal. Así, parece que la ingesta de café a lo largo de la vida puede proteger del declive cognitivo asociado a la edad, de forma que aquellas mujeres mayores que habían bebido cantidades relativamente elevadas de café a lo largo de su vida tenían mejores memoria y otros tests cognitivos respecto a las no bebedoras (Johnson-Kozlow y col., 2002). De hecho, existe un estudio que relaciona inversamente la ingesta de cafeína con la enfermedad de Alzheimer (Maia y de Mendonça, 2002). Una de las estrategias más utilizadas en el tratamiento del Alzheimer es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y así aumentar la disponibilidad de acetilcolina (Doody y col., 2001), pero también podría utilizarse la activación de los receptores de adenosina A_{2A} que favorecen la liberación de acetilcolina o bloquear los receptores A₁ (Sebastiao y Ribeiro, 1996).

2.1.4 Transportadores de nucleósidos en cerebro

Hasta la fecha, se dispone de muy poca información acerca de los transportadores de nucleósidos en el sistema nervioso. Mediante RT-PCR, northern blot e hibridación in situ se han detectado los transcritos de ENT1 y rENT2 en muchas regiones cerebrales. Para ENT1, se detectaron niveles de transcrito en las neuronas piramidales del hipocampo, en neuronas granulares del giro dentado, Purkinje y neuronas granulares del cerebelo, así como neuronas corticales y del estriado. En cuanto a ENT2 la localización que está descrita incluye hipocampo, corteza, estriado y cerebelo. Más recientemente, y mediante anticuerpos específicos contra las isoformas humanas de ENT1 y ENT2, se ha realizado un barrido de muestras cerebrales mediante western-blot que indica que la expresión de ENT1 es más abundante en la corteza cerebral, tálamo, cerebro medio y ganglios basales, mientras que ENT2 se encontró en el cerebelo y en el tronco encefálico, particularmente en el pons (Figura 6). También hay que tener en cuenta que la distribución de ENT1 se correlaciona con la del receptor de adenosina A₁ lo que en principio sugería

un papel importante del transportador es en el control de acciones neuromoduladores mediadas por los receptores A₁ de adenosina en el cerebro (Anderson y col., 1999a, b).

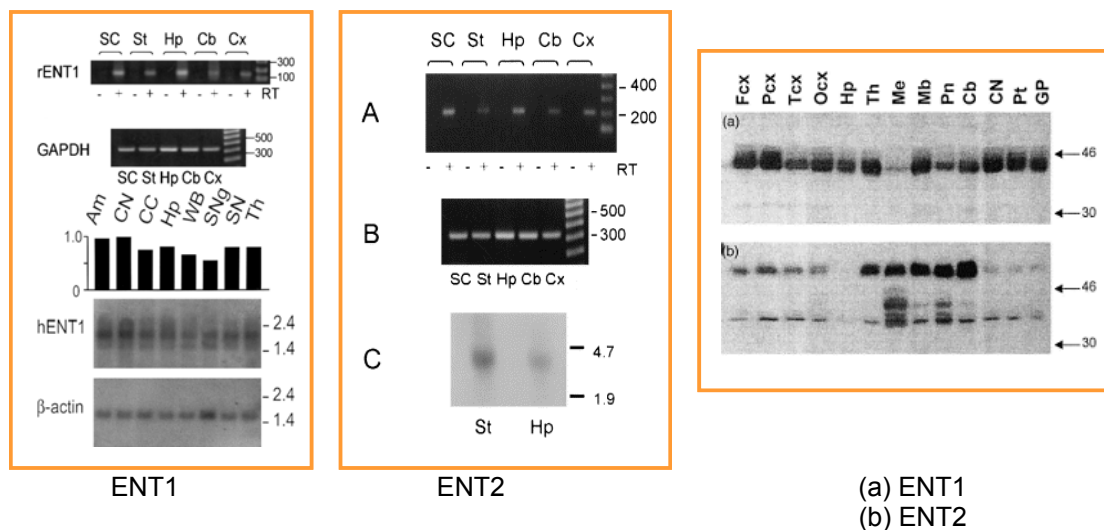


Figura 6: Detección de los niveles de los transportadores equilibrativos en cerebro mediante técnicas de RT-PCR (paneles izquierdo y central) y Western-blot (panel derecho). Extraído de Anderson y col., 1999a, b.

La adenosina se transporta hacia el interior de las células por la mayoría de transportadores de nucleósidos, pero parece ser que los transportadores principales serían ENT1 y CNT2 ya que muestran unas Km aparentes por este nucleósido que se encuentran dentro del rango fisiológico, siendo 40 μ M en el caso de ENT1 y de 8 μ M para CNT2, y entre ambos, este último sería un mejor candidato para el transporte eficiente en células de mamífero (Mackey y col., 1999) (Tabla 1). Agonistas del receptor A₁ se transportan con muy poca eficiencia a través de la barrera hematoencefálica (BBB), con la excepción de la 5' dCPA (5' Desoxy-N⁶-ciclopentiladenosina) y parece que ENT1 no contribuiría de manera significativa en el transporte de dichos agentes a través de la BBB (Schaddelee y col., 2005), mientras que una isoforma de rata de CNT2 se aisló a partir de la BBB y una vez inyectada en oocitos se obtuvieron niveles de transporte de adenosina 50 veces superiores a los obtenidos por los clones de CNT2 procedentes de tejidos periféricos (Li y col., 2001).

El bloqueo de la actividad ENT1 en las terminales nerviosas motoras potencia los efectos de la adenosina a través de sus receptores (Correia-de-Sa y Ribeiro, 1996), mientras que la administración intraventricular de un inhibidor de ENT1 ejerce la activación de la conductancia de K⁺, lo que es consistente con una implicación de ENT1 en la activación de los receptores A₁ de adenosina mediante agonistas (Szkotak y col., 2001). Estudios muy recientes en nuestro grupo, muestran que a través del agonista rPIA se provoca un rápido incremento en la actividad de transporte de CNT2 en la línea de hepatoma de rata FAO y en el cultivo primario de hepatocitos. Incubaciones con diferentes agonistas de los receptores de adenosina y el hecho que este efecto se bloquee

completamente con DPCPX, un antagonista de A₁, demuestran que dicho incremento está mediado por el receptor A₁. Se trata de la primera evidencia en la relación entre el receptor de adenosina A₁ y el transportador concentrativo de alta afinidad CNT2. Además, esta interacción depende de los canales K_{ATP}, lo que hace pensar que la actividad de CNT2 puede estar relacionada con el estado energético de la célula (Duflot y col., 2004). Estudios muy recientes también en nuestro laboratorio han mostrado que la adenosina activa la AMPK en la línea IEC-6 de intestino de rata. Este efecto, que es muy rápido y se mantiene hasta 30 min tras la adición del nucleósido, se bloquea de forma significativa cuando las células se tratan con 5'-yodotubercidina, un inhibidor de la adenosina quinasa. El transporte de adenosina hacia el interior de la célula es necesario para esta activación de la AMPK y está mediado principalmente por CNT2, ya que, al inhibir este transportador con formicina B, el efecto se bloquea. Estos resultados nos indican un posible papel de CNT2 en procesos de señalización celular y no sólo en aquellos implicados en la recuperación de nucleósidos, con lo que CNT2 podría considerarse como posible diana farmacológica (Aymerich y col., enviado). Cuando se provoca un descenso de la temperatura de 30°C a 21°C en cortes de hipocampo de rata, los niveles de adenosina extracelular aumentan de 220 nM a 430 nM. Paralelamente se observa cómo la actividad de los transportadores de nucleósidos equilibrativos, principalmente ENT2, se ve disminuida, lo que indicaría una regulación preferente por ENT2, respecto de ENT1, de la adenosina extracelular (Dunwiddie y Diao, 2000). Muy recientemente se ha investigado cómo la activación de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} modifica el transporte de adenosina mediado por los transportadores equilibrativos en sinaptosomas de hipocampo, de manera que el agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 facilita el transporte a través de un mecanismo dependiente de PKC, pero la activación de A₁, en este caso, no tiene ningún efecto (Pinto-Duarte y col., 2005).

3. QUIMIOTERAPIA DE LOS TUMORES GINECOLÓGICOS Y DE MAMA

3.1 DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN TEJIDOS TUMORALES

Las células animales combinan distintos transportadores de nucleósidos y, en gran variedad de células y tejidos tanto sanos como tumorales, coexisten sistemas de transporte de nucleósidos tanto concentrativos como equilibrativos. Parece que la expresión de las diferentes isoformas depende del estado de diferenciación y transformación celular, de manera que puede haber cambios de expresión de estos transportadores a medida que progresa la transformación de una célula. Se ha visto que un gran número de células neoplásicas humanas expresan mayoritariamente actividad es, mientras que las células normales expresan principalmente transporte concentrativo (Belt y

col. 1993). Se sabe que el hepatocito coexpresa las formas de transporte concentrativas N1 y N2 (Felipe y col. 1998), mientras que apenas presenta los transportadores equilibrativos. En cambio, cuando se estudia la línea celular FAO de hepatoma de rata, se observa que la expresión de ENT2 y sobre todo de ENT1 está muy incrementada (del Santo y col. 1998). Una diferencia importante entre las células normales y tumorales son los valores aparentes del número de transportadores NBTI-sensibles, ya que son de 5 a 10 veces superiores para las células transformadas que para las normales (Plagemann y Wohlhueter, 1985).

Existe un artículo sobre la expresión diferencial de los transportadores de nucleósidos humanos en tejidos sanos y tumorales. En este trabajo de Pennycooke y colaboradores, se realizó una comparación de los niveles de los transportadores en varios tejidos normales y tumorales mediante ensayos de Dot-blot de ARNm de diferentes individuos, hipotetizando que los niveles de ARNm se correlacionan con los niveles de proteína, lo que es indicativo de transporte funcional. Con hENT1 y hENT2 no se encontraron diferencias considerables entre el nivel de expresión en tejidos normales y tumorales, excepto en el caso de hENT1 en la próstata, donde se veía una disminución en todos los individuos. En contraste con los CNTs, algunos individuos mostraron niveles elevados de hENT1 en tejido tumoral respecto al sano, aunque esta situación no era frecuente. Los sistemas concentrativos en general mostraron una disminución de su expresión en los tejidos tumorales, pero hCNT2 mostró una elevada expresión en tejido tumoral respecto al sano en casi todas las muestras tumorales derivadas de pulmón, ovario, útero y próstata. Este trabajo muestra una gran variabilidad de resultados, lo que es indicativo de que el nivel de expresión de los distintos transportadores depende de cada individuo y de cada tejido (Pennycooke y col., 2001). Recientemente se ha caracterizado un anticuerpo monoclonal dirigido contra hENT1 y se ha utilizado en un estudio en secciones de tumores de mama, demostrando las diferencias de expresión de este transportador en una serie de 33 pacientes (Mackey y col., 2002)

La mayoría de células animales combinan diversos sistemas de transporte de nucleósidos. Aunque inicialmente las entidades equilibrativas se creyeron mayoritarias, de manera que el transporte concentrativo quedaba limitado básicamente a los epitelios especializados, hoy día sabemos que ambos tipos de sistemas presentan una amplia distribución tisular, coexistiendo en un gran número de tipos celulares, normales y tumorales. De hecho, incluso parece que exista un cambio en la dotación de estos sistemas de transporte a medida que la célula progresa hacia la malignidad. A nivel global, Belt y colaboradores han descrito que un gran número de células neoplásicas humanas expresan fundamentalmente actividades es en oposición al transporte concentrativo mayoritario en células no transformadas. Este hecho se ha venido estudiando desde hace ya unos años con finalidades quimioterapéuticas (Belt y col., 1993; Handschumacher y

col., 1993; Cass, 1995; Yao y col., 1996; Wang y col., 1997a; Griffiths y col., 1997a; Mackey y col., 1998a; Pastor-Anglada y col., 1998a; Baldwin y col., 1999; Hammond y col., 1999)

3.2 CÁNCER DE MAMA: Tipos de tumores y clasificación.

Los **tumores benignos** están relacionados en su mayoría con factores genéticos. Los síntomas que producen son dolor e inflamación pero ni se diseminan al resto del organismo ni son peligrosos. Dentro de los **tumores malignos**, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y según su estadio. Los tumores pueden ser localizados o haberse extendido a través de los vasos sanguíneos o mediante los vasos linfáticos, y haber dado lugar a metástasis. De todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7-10% de ellos presenta metástasis de inicio.

- **El carcinoma ductal in situ** se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Por este motivo esta enfermedad 'pre maligna' puede extirparse fácilmente. La tasa de curación ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

- **El carcinoma ductal infiltrante** (o invasivo) es el que se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.

- **El carcinoma lobular in situ** se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y, aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro. Se suele dar antes de la menopausia (figura 7).

- **El carcinoma lobular infiltrante** (o invasivo) comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectar a través de una mamografía (figura 7).

- **El carcinoma inflamatorio** es un cáncer poco común, tan sólo representa un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de rápido crecimiento. Hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja, y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.

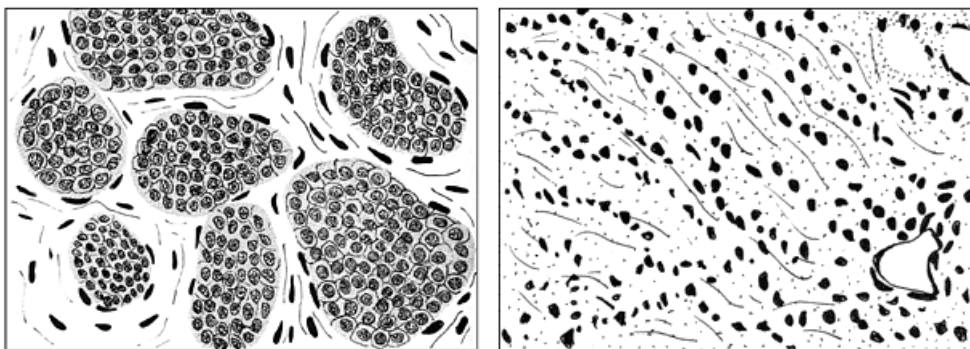


Figura 7: Esquema de un carcinoma lobular *in situ* (izquierda) y carcinoma lobular infiltrante (derecha) donde se aprecia la infiltración tumoral del estroma por células neoplásicas aisladas u ordenadas en filas.

El cáncer tiene un pronóstico y tratamiento distintos en función de la etapa de desarrollo en que se encuentre y de los factores de riesgo que tenga la mujer. Para conocer esto hay que realizar una serie de análisis que facilitan su clasificación en uno u otro estadio. El Comité Conjunto Americano del Cáncer utiliza el sistema de clasificación TNM (Wittekind y col., 2002):

- La letra **T**, seguida por un número que va del 0 al 4, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos.
- La letra **N**, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras.
- La letra **M**, seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes.

La clasificación, para los subgrupos, se realiza con números que van del I al IV. Los niveles de malignidad comprenden desde el estadio I que indica que el tumor es menor de 2 cm y no hay metástasis, y donde el índice de supervivencia relativa a 5 años es del 98%, hasta el estadio IV que incluye procesos donde el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. Los órganos en los que suele aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También es posible que el tumor haya afectado localmente a la piel. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 16%. Existen dos estadios intermedios, el II y el III que se divide en IIIa y IIIb según el nivel de extensión del tumor y la afectación de los ganglios linfáticos.

3.2.1 Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento vendrá determinado por el tamaño del tumor y si ha habido extensión a los ganglios u otras zonas del cuerpo. Por lo general, cuando el tumor es

menor de 1 centímetro de diámetro, la **cirugía** es suficiente para terminar con el cáncer y no se precisa de quimioterapia. No obstante, hay pocos casos en los que no se requiera un tratamiento complementario a la cirugía, bien con quimioterapia o con hormonoterapia. Actualmente el factor pronóstico más importante sigue siendo la afectación ganglionar: el número de ganglios afectados ayuda al oncólogo a seleccionar el tratamiento posterior.

La **radioterapia** consiste en el empleo de rayos de alta energía para destruir o disminuir el número de células cancerosas. Es un tratamiento local que se administra después de la cirugía conservadora (cuando se emplea después de la mastectomía es porque se considera que existe riesgo de que el tumor se reproduzca). Lo que se consigue con la radioterapia es disminuir el tamaño del tumor, para luego resecarlo quirúrgicamente o, una vez realizada la intervención, limpiar la zona de células malignas.

La **quimioterapia neoadyuvante** es aquella que se realiza antes de la cirugía y sólo en algunos casos. Su objetivo es reducir el tamaño del tumor y poder realizar una operación que permita conservar la mama en mujeres para las que la primera opción era la mastectomía. El clásico tratamiento "CMF" (ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluoruracilo), ha acreditado su eficacia y conserva su vigencia, siendo uno de los más usados en la práctica asistencial diaria. Habitualmente se aplica cada 3-4 semanas hasta completar un total de 6 ciclos. En la actualidad se van introduciendo otros regímenes quimioterapéuticos en los que se incluyen agentes de eficacia demostrada como las antraciclinas y los taxanos. La **quimioterapia adyuvante** se realiza después de la cirugía para eliminar las posibles células cancerosas que hayan quedado en cantidades microscópicas e impedir su crecimiento. Sólo hay un 10% de todas las pacientes que no reciben tratamiento postoperatorio y que son aquellas que no tienen afectados los ganglios y que el tumor es menor de 1cm., y/o los receptores hormonales son positivos. Junto a la quimioterapia, se administra tratamiento hormonal, siempre que el tumor presente receptores hormonales.

La **terapia hormonal** consiste en la administración de fármacos que bloquean la acción de las hormonas que estimulan el crecimiento de las células cancerosas. Se les da a aquellas pacientes que tienen receptores hormonales positivos, esto viene a ser el 60-70% del total de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

Recientemente se han empezado a realizar tratamientos a partir de los resultados de estudios clínicos con capecitabina, un pro-fármaco de 5'-DFUR que es convertido a 5-FU por la enzima timidina fosforilasa (TP). La TP parece encontrarse expresada más abundantemente en los tejidos tumorales que en los sanos, de forma que la expresión de esta enzima en un tejido tumoral puede predecir parte de la eficacia clínica de la capecitabina. Estudios clínicos en fase III comparan directamente una monoterapia de docetaxel con otra combinada de docetaxel más capecitabina en pacientes con cáncer de mama que habían sido tratados con antraciclinas y donde se observa que los niveles de respuesta del grupo combinado fueron superiores que en el caso de la monoterapia

(Fumoleau y col., 2004; Reichardt y col., 2003). La capecitabina, en tumores de mama, tanto se aplica como único fármaco como en tratamientos combinados y se ha demostrado que tiene una menor toxicidad cuando se compara con el 5-FU (McKendrick y Coutsouvelis, 2005). Asimismo, la capecitabina presenta una actividad sustancial en pacientes con cáncer de mama localmente avanzados o metastáticos tras el fracaso de tratamientos que incluyen el uso de taxanos o antraciclinas (Blum y col., 1999). La gemcitabina también es un análogo de nucleósidos que se administra por vía intravenosa y da lugar a la fosforilación intracelular hacia el metabolito activo, la gemcitabina difosfato, que inhibe la ribonucleótido reductasa y permite incorporar la gemcitabina trifosfato, también generada, al ADN o ARN. Este fármaco tiene actividad antitumoral en cáncer de mama, principalmente cuando se utiliza en terapia de primera línea en presencia de metástasis (Possinger, 1995; Carmichael y Walling, 1996).

3.3 TUMORES GINECOLÓGICOS

Los ovarios están en la pelvis, uno a cada lado del útero. Tienen la forma y tamaño de una almendra, y producen tanto óvulos como hormonas femeninas (estrógenos y progesterona). El **cáncer de ovario** representa el 4% de los tumores que afectan a la mujer. Hay tres tipos fundamentales de tumores malignos; los que se forman en la superficie del ovario se denominan carcinoma epitelial y son los más comunes (figura 8). También, pero de manera mucho menos frecuente, se pueden dar casos de cáncer en las células que producen los óvulos y en los tejidos que rodean al ovario. Aunque es el cuarto cáncer más frecuente en ginecología oncológica (tras mama, endometrio y cérvix), sigue siendo la primera causa de muerte, lo que se debe a la gran dificultad de un diagnóstico precoz y a que el 65% de las pacientes se diagnostican ya en estadios avanzados, III y IV.

El cuello del útero, también llamado cérvix, une la vagina con la cavidad del útero que está recubierto por el endometrio. El **cáncer de cérvix** también es conocido como carcinoma escamoso ya que las células que recubren su superficie son planas y muy delgadas. El útero está compuesto por dos capas de tejidos diferentes: la interior, muy fina, que se llama endometrio y otra más externa, formada por músculo, llamada miometrio. El cáncer cervical es el segundo cáncer más frecuente entre mujeres de todo el mundo y el más frecuente en Asia, África y América del Sur (Cannistra y Niloff, 1996).

Para la clasificación la gravedad del cáncer se utiliza un sistema que incluye datos sobre su tamaño, su extensión a otros órganos o el tipo de células que lo forman. Se usan como criterios de extensión los de la FIGO (Federación Internacional de Ginecólogos y Obstetras).

3.3.1 Ovario

Los adenocarcinomas serosos son los cánceres de ovario más frecuentes (60-80%). Más del 70% son bilaterales y entre el 70-80 % aparecen en estadios avanzados. El tamaño medio es de 15 cm. Aparecen con una superficie muchas veces papilar y las secciones muestran áreas sólidas de aspecto amarillento o rosado y áreas quísticas con papilas prominentes. Generalmente se acompañan de ascitis hemorrágica. Los tumores mucinosos son en su mayoría benignos (80%). Macroscópicamente se trata de tumores muy grandes con superficie lisa o en ocasiones irregular que si se seccionan muestran múltiples cavidades llenas de material mucinoso y sin papilas. Los tumores endometrioides, en cambio, son en la mayoría de los casos malignos. Representan el 15-25% de los cánceres ováricos. En el 10% de los casos se asocian a endometriosis y en el 30% a adenocarcinomas primitivos de endometrio. Los adenocarcinomas de células claras representan el 5% de las cánceres del ovario, son bilaterales en el 20-40% de los casos y el 70% están en estadio I. Son los tumores malignos más frecuentes en casos de endometriosis (figura 8).

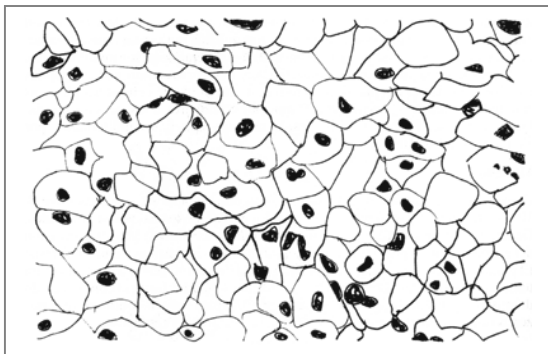


Figura 8: Esquema del aspecto citológico característico de un carcinoma de células claras del ovario. Nótese hiperchromasia nuclear y aspecto vacío del citoplasma.

Los diferentes estadios en los que se puede encontrar un cáncer de ovario van desde el estadio I donde el tumor afecta sólo a los ovarios, hasta el estadio IV donde la metástasis llega a otros órganos del cuerpo.

3.3.2 Útero

Existen muchos tipos de cáncer uterino, siendo el adenocarcinoma el tipo de cáncer uterino más común. Otras variantes del cáncer uterino con un comportamiento más agresivo incluyen el carcinoma seroso, el carcinoma uterino de células claras y los tipos mixtos. Estos cánceres presentan un pronóstico menos favorable que el adenocarcinoma. La apariencia del cáncer cuando se examina bajo el microscopio también puede afectar los resultados del tratamiento del adenocarcinoma. Los médicos clasifican los adenocarcinomas como escasos, moderados o bien diferenciados. Estos términos describen el grado de semejanza del cáncer con las células normales del útero. Por lo general, a menor diferenciación de las células, mayor la agresividad del cáncer y más alta la tasa de reincidencia.

En el cáncer de útero se pueden distinguir diferentes fases desde el estadio I donde el cáncer no se ha extendido ni siquiera al cuello, hasta el estadio IV donde la vejiga y el recto se encuentran afectados, así como otras zonas del cuerpo.

3.3.3 Cuello del útero (cérvix)

Existen dos tipos principales de cáncer de cuello uterino: el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. Alrededor del 80% al 90% de los casos de cáncer del cuello uterino son carcinomas de células escamosas, que están compuestos por células similares a células planas y delgadas llamadas células escamosas que recubren la superficie del ectocérvix. Los carcinomas de células escamosas se originan con mayor frecuencia donde el ectocérvix se une al endocérvix. El restante 10% al 20% de los casos de cáncer de cuello uterino son adenocarcinomas. El adenocarcinoma cervical se origina a partir de las células de las glándulas productoras de mucosidad del endocérvix. Con menor frecuencia el cáncer de cuello uterino tiene características tanto de los carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas. Así como para los tumores descritos anteriormente, este tipo de tumor también se clasifica en estadios, desde un tumor microscópico limitado al útero correspondiente al estadio I, hasta metástasis a distancia en el estadio IV B.

3.3.4 Tratamiento de los tumores ginecológicos

La **cirugía** es el tratamiento más común, permite eliminar las células cancerosas y, en caso de ser necesario, retirar los ovarios, trompas de Falopio u otros órganos que se hayan visto afectados por el cáncer o una metástasis. En caso de que lo extraído sea el útero la técnica se denomina histerectomía. También los ganglios linfáticos pueden ser retirados mediante cirugía. La **radioterapia** suele complementar a la cirugía; esta técnica emplea radiaciones de alta energía para matar a las células cancerígenas.

El cáncer epitelial de ovario ha sido uno de los primeros tumores sólidos malignos en los que se ha utilizado la **quimioterapia** como parte del tratamiento. Los esquemas quimioterapéuticos han sufrido profundos cambios a lo largo del tiempo: hasta finales de los años 70 la base del tratamiento quimioterapéutico fueron los agentes alquilantes (permiten supervivencias a 5 años en la enfermedad avanzada de alrededor del 15%), destacándose entre estos el melfalán (L-PAM) como agente único, y la ciclofosfamida en los esquemas de poliquimioterapia. A partir de finales de los 70 y principios de los años 80 los derivados del platino (supervivencia a 5 años en estadios avanzados del 25%) pasaron a constituir la base de los esquemas terapéuticos más utilizados y finalmente, en la actualidad, los taxanos han sido identificados como la clase de agentes quimioterapéuticos más efectiva en el tratamiento del cáncer de ovario. Se ha visto que la gemcitabina, un análogo de nucleósidos, puede ser activa como un único agente y también en combinación con otros fármacos en carcinomas de ovario, principalmente en el tratamiento de pacientes

con cáncer de ovario recurrente (para una revisión consultar Fruscella y col., 2003) En el cáncer de útero, por lo general, se emplean hormonas que interrumpen el crecimiento del cáncer. La administración de progestágenos (a partir de la progesterona) suele dar buenos resultados. Si el cáncer se ha extendido por fuera del útero, es posible que se necesiten dosis más altas de progestágenos, ya que reducen el tamaño del cáncer hasta en el 40 por ciento de las mujeres con metástasis y controlan su extensión durante 2 a 3 años. Si el cáncer se ha extendido o no responde al tratamiento hormonal, pueden añadirse otros fármacos (como ciclofosfamida, doxorubicina y cisplatino).

4. MECANISMO DE ACCIÓN DE DERIVADOS DE NUCLEÓSIDOS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER.

Existen numerosos análogos de nucleósidos utilizados en terapias antineoplásicas y antivirales que utilizan los transportadores de nucleósidos naturales de la membrana plasmática como sistema de entrada a la célula trasformada. Una vez en el interior, estos compuestos, que retienen muchas de las características metabólicas de los componentes de los que proceden, son metabolizados de la misma forma que los nucleósidos naturales y actúan entonces modificando la síntesis de ácidos nucleicos con efectos antiproliferativos, en el caso de células tumorales o de resistencia a la replicación vírica, en el tratamiento del SIDA y otras afecciones víricas (Figura 9).

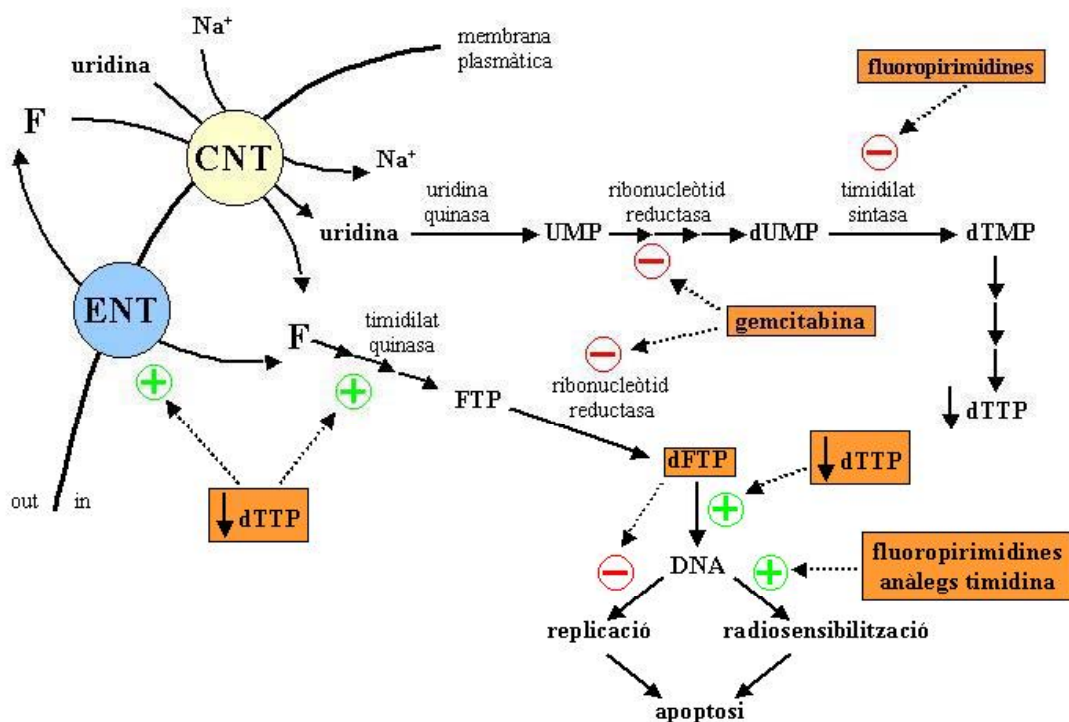


Figura 9: Entrada de fármacos al interior de la célula y sus posibles efectos citotóxicos

Los diferentes tipos de análogos de nucleósidos se pueden dividir en base al tipo de modificaciones que presentan sobre el nucleósido natural. Podríamos dividirlos también entre análogos púricos y análogos pirimidínicos en función del tipo de base modificada. Dependiendo del tipo de análogo, ejercen su función a diferentes niveles y causan una disminución en la proliferación tumoral a través de mecanismos diferentes. Esto resulta en una diferente eficiencia en el tratamiento de los diferentes tipos de neoplasias para los diversos tipos de análogos.

Parece que las células expresan diferentes patrones de isoformas de transportadores de nucleósidos en función del tipo celular y el estado de diferenciación. Por ejemplo, cuando se analizan posibles diferencias en el número de lugares de unión a NBTI entre tejidos humanos normales y tumorales, se ve que la cantidad total de lugares de unión en tejido tumoral colorrectal, hepático, gástrico y mamario es de 1.5 a 5 veces superior a la de los controles no neoplásicos, manteniéndose constante la afinidad por el inhibidor (Goh y col. 1995). De esta forma, se puede pensar que la sensibilidad o resistencia al fármaco puede ser debida en parte a una falta de disponibilidad en la célula por una alteración del transporte. De hecho, muchas de las evidencias experimentales obtenidas corresponden a inhibiciones del transporte de nucleósidos naturales por fármacos (Pastor-Anglada y col., 1998).

4.1 PRINCIPALES FÁRMACOS EN LA TERAPIA ANTICANCERÍGENA Y ANTIVIRAL.

Hasta la fecha, se han desarrollado multitud de fármacos anticancerígenos con el objetivo de eliminar las células tumorales sin dañar a las sanas. A finales de los años 50 se sintetizó el fármaco **cytosine arabinoside (Ara-C, citarabina)** y en la actualidad todavía es uno de los fármacos más ampliamente utilizados (Tallman, 2001).

El **2-cloro-2'-desoxiadenosina (CdA, Cladribina)** fue sintetizado por primera vez en 1972 y se demostró su efecto anti-leucemia (Christensen y col., 1972). Ese mismo año, Giblett y colaboradores observaron que niños con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) eran deficientes en el enzima adenosina desaminasa (ADA), lo que significó el primer paso en el desarrollo de análogos de nucleósidos (Giblett y col., 1972). La ausencia de este enzima puede significar la acumulación de niveles letales de ATP en los linfocitos, ya que estos tipos celulares contienen niveles bajos de 5'-NT y niveles elevados del enzima dCK responsable de la fosforilación de desoxiadenosina a dAMP (Carson y col., 1977).

Actualmente, varios de los fármacos empleados en terapia anticancerígena son derivados de nucleósidos que se transportan al interior celular por medio de los transportadores de nucleósidos. Se trata, básicamente, de fluoropirimidinas, análogos de la timidina y derivados de purinas. Estos compuestos pueden ser citotóxicos por sí mismos o actuar sobre la sensibilización a la radiación de las células tumorales mediante la

alteración de su metabolismo nucleotídico. Los dos principales análogos de nucleósidos púricos son la 2-clorodesoxiadenosina (CdA, **cladribina**) y la 9-β-D-arabinosil-2-fluoroadenina (F-Ara-A, **fludarabina**). Ambas son utilizadas mayoritariamente en el tratamiento de leucemias y linfomas. Las principales pirimidinas son la 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (ara-C, **citarabina**), la 2',2'-difluorodeoxicitidina (dFdC, **gemcitabina**), la **capecitabina** y el **5-fluorouracilo** (5-FU), derivado de la base uracilo.

La **cladribina o 2CdA (2-clorodesoxiadenosina)** y la **fludarabina o F-ara-A** (fluoroarabinosiladenosina) son análogos púricos que se utilizan en tumores linfoproliferativos muchas veces en combinación con **ara-C o citarabina**, un derivado de pirimidina que es una de los fármacos más efectivos en tumores hematopoyéticos (leucemias agudas y linfomas). El paso inicial de activación intracelular es llevado a cabo por la enzima dCK en el caso de la fludarabina, y por la dCK y la dGK mitocondrial (desoxiguanosina quinasa) en el caso de la cladribina (Wang y col., 1993). A su vez, la 5' nucleotidasa citosólica desfosforila la fludarabina y la cladribina, contribuyendo así a su inactivación (Hunsucker y col., 2001). Una vez incorporados a la cadena en replicación en el lugar de la adenina, ambos fármacos causan la terminación de la elongación mediante la implicación de la ADN polimerasa α, en el caso de la F-Ara-A y la subunidad β en el caso de la 2-CdA. También inhiben la ribonucleótido reductasa de forma que interfieren en la reparación del ADN (Shewach y col., 1992; Iwasaki y col., 1997, Plunkett y col., 1990).

La 1-β-D arabinofuranosilcitosina (**ara-C, citarabina**) se usa comúnmente en el tratamiento de leucemias agudas y linfomas pero no muestra buena actividad en el tratamiento de tumores sólidos. Dentro de la célula, es metabolizada por la dCK a ara-CMP, mientras que la enzima citidina desaminasa (CDD) la cataboliza produciendo el metabolito no tóxico arabinosido de uridina. Puede ser también desfosforilada por la 5'-NT citoplasmática.

La **gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina, dFdC)** es un análogo de la desoxicitidina con actividad en tumores sólidos comunes (Mackey y col. 1998) que inhibe la ribonucleótido reductasa una vez que ha sido fosforilada a dFdCTP, lo que disminuye el pool de dNTPs, principalmente dCTP, y proporciona una ventaja del fármaco en cuanto a su incorporación al ADN y la posterior parada de la replicación (Plunkett y col. 1995). Es una molécula algo más lipófila y con mayor afinidad por los transportadores de nucleósidos que el ara-C y además es uno de los mejores sustratos conocidos de la dCK (Merriman y col., 1996; Iwasaki y col., 1997). Tras el primer paso de fosforilación, la gemcitabina continúa fosforilándose gracias a la acción de quinastas menos específicas hasta producir el dFdCTP, considerado el metabolito más importante (Heinemann y col., 1988). Este análogo de la desoxicitidina fue el primero y único agente quimioterapéutico que mostró tener un impacto significativo en los síntomas de adenocarcinomas de páncreas. El tratamiento de quimioterapia más empleado en muchos tumores ginecológicos implica el

uso de tratamientos basados en combinaciones de platino con taxanos. En algunos casos, la cirugía por sí sola puede ser suficiente en tumores de bajo riesgo. A pesar de esto, el uso de análogos de nucleósidos puede ser eficaz en el tratamiento de tumores resistentes a la quimioterapia convencional, tras una recaída o incluso como primera línea de tratamiento en casos de cáncer avanzado (Underhill y col., 2001; Nagourney y col., 2003). De esta forma, la gemcitabina parece apropiada en pacientes previamente tratados que muestran resistencia al cisplatino y en el tratamiento de cáncer de ovario avanzado (Markman, 2002; Orlando y Mandachain, 2001)

Las **fluoropirimidinas** inhiben el enzima timidilato sintasa (TS) que cataliza el paso de dUMP a dTMP. Esto hace que se induzca la depleción de las formas fosforiladas de desoxitimidilatos (dTMP, dTDP, dTTP), lo que lleva a la apoptosis (Bouffard y Momparler, 1995). También pueden provocar sensibilidad a la radiación por arresto celular en las primeras etapas de la fase S del ciclo celular (Mc Ginn, 1994). El **5-FU** (5-fluorouracilo) y la **5-FdU** (5-fluoro-2'-desoxiuridina) tienen actividad antitumoral en pacientes con cáncer colorrectal, mama y de cabeza y cuello. Estos agentes necesitan la activación metabólica a 5-fluorodesoxuridina monofosfato (5-FdUMP), 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP) o 5-fluorodesoxiuridina trifosfato (5-dFUTP). El 5-FU es principalmente catabolizado por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) produciendo el metabolito inactivo 5-fluoro-dihidrouracilo. Los efectos de estos compuestos incluyen la inhibición de la timidilato sintasa (TS) por parte de la forma monofosfato, 5-FdUMP, resultando en una depleción de los nucleótidos de timidina con la inhibición subsiguiente de la síntesis y reparación de ADN. Además, se incorporan al ARN resultando en un procesamiento y función anómalos y una incorporación de la forma trifosfato 5-dFUTP produciendo daño en la cadena nascente de ADN (Galmarini y col., 2002).

Se han sintetizado nuevas fluoropirimidinas orales, de tal manera que se consigue aumentar los niveles de 5-FU en los tumores incrementando así su eficacia y reduciendo su toxicidad. El agente más activo de esta clase es la **capecitabina**. Los derivados de la **capecitabina** utilizan los transportadores de nucleósidos para su internalización y se emplea en tumores sólidos. Existe un intermediario (5'-DFUR) entre la capecitabina y la forma activa 5-Fluorouracilo (5-FU) (figura 10).

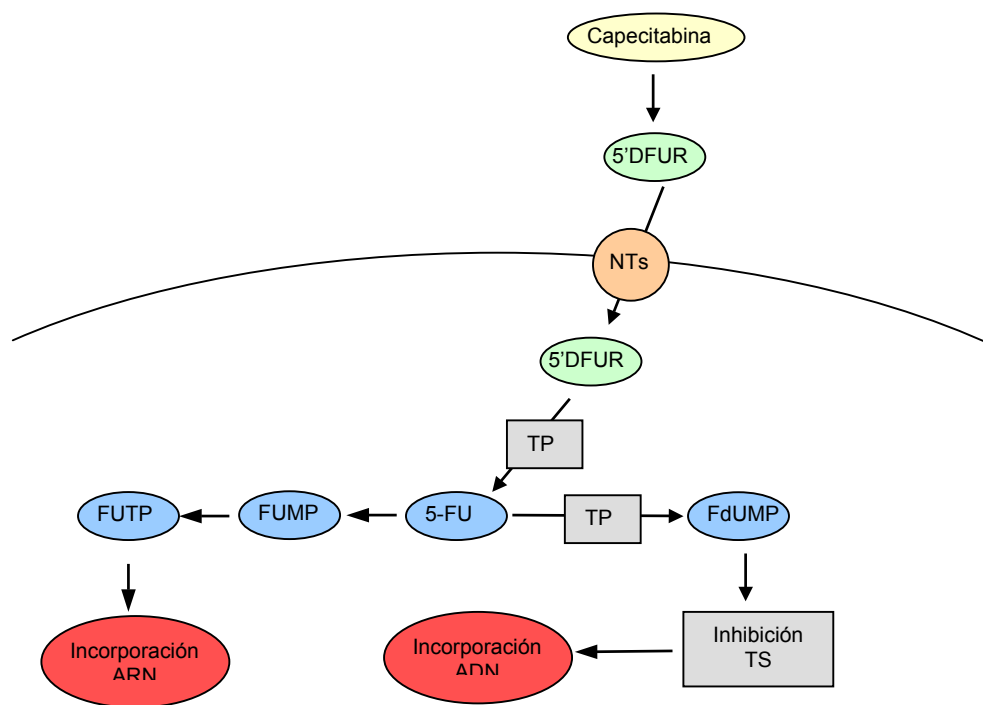


Figura 10. Esquema de la actividad de la capecitabina. La inhibición de la TS provoca la incorporación al ADN impidiendo la reparación y la síntesis de ADN. Modificado a partir de Longley y col., 2003.

El enzima cboxilesterasa cataliza la capecitabina a 5'-desoxi-5-fluorocitidina, que se convierte en 5'-DFUR mediante la citidina desaminasa, un enzima hepático que puede estar presente en algunos tumores sólidos. La conversión a 5-FU ocurre en muchos tumores que expresan el enzima timidina fosforilasa, aunque su citotoxicidad también depende de la actividad de la dihidropirimidina deshidrogenasa que inactiva el 5-FU. Se ha visto que ni la forma administrada ni la forma activa en el interior celular son internalizados por el transportador hCNT1, mientras que sí lo es el intermediario 5'-DFUR (Mata y col. 2001) lo que permite su concentración en el interior de la célula. hENT1 reconoce a la gemcitabina como sustrato con una afinidad relativamente alta, unas diez veces menor que hCNT1, mientras que hENT2 puede ser considerado como un transportador de baja afinidad para esta fluoropirimidina (Mackey y col., 1999). La función de los transportadores de nucleósidos es esencial para la citotoxicidad inducida por fármacos derivados de nucleósidos. La expresión heteróloga de hCNT1 en células sin actividad de transporte dependiente de Na^+ provoca un aumento de la sensibilidad a los sustratos de hCNT1 (Mata y col., 2001; García-Manteiga y col., 2003), mientras que la sensibilidad *ex vivo* a fludarabina en células de pacientes con leucemia linfática crónica se correlaciona de forma significativa con el transporte de fludarabina mediado por ENT (Molina-Arcas y col., 2003).

4.2 METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

Los desoxirribonucleótidos son las unidades que forman el ADN, por lo que no sólo son necesarios para la síntesis de ADN, sino para procesos implicados en la reparación. La síntesis de estas unidades tiene lugar de dos formas diferentes, bien por una síntesis *de novo* o por la vía de recuperación (figura 11).

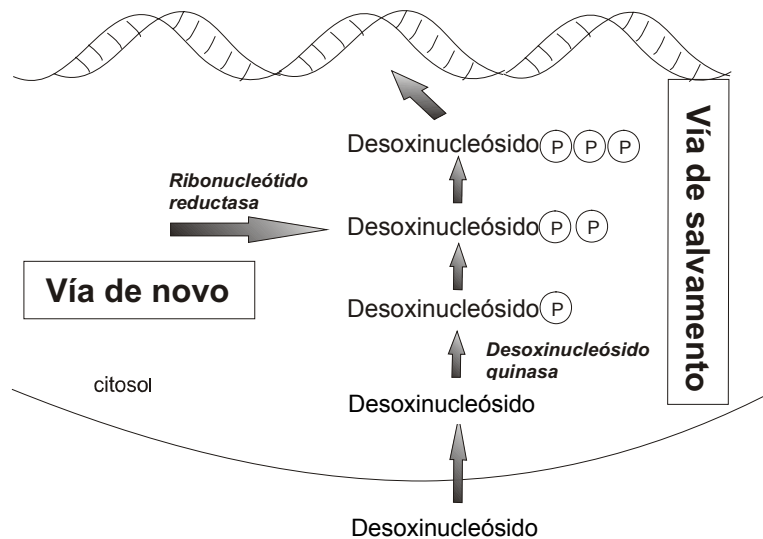


Figura 11: Vías de recuperación y *de novo* de síntesis de desoxirribonucleótidos. En la vía *de novo*, los ribonucleótidos son reducidos por la RR a desoxirribonucleótidos y en la vía de salvamento o recuperación, los desoxirribonucleótidos son fosforilados para formar el monofosfato correspondiente.

En el primer caso la enzima ribonucleótido reductasa (RR) reduce los ribonucleósidos difosfato a desoxirribonucleótidos. En la vía de recuperación, los desoxirribonucleósidos derivan de los nutrientes ingeridos y el ADN degradado es transportado al interior celular. Los desoxirribonucleósidos son fosforilados por las desoxirribonucleótido quinastas intracelulares produciendo las formas fosfato correspondientes. Las enzimas de la vía de recuperación son la **dCK** (desoxicitidina quinasa), la **dGK** (desoxiguanosina quinasa), la **TK1** y la **TK2** (timidina quinasa), detalladas a continuación (Reichard, 1988).

4.2.1 Enzimas anabólicas

La especificidad de sustrato de la **dCK**, la desoxicitidina quinasa, es amplia y fosforila tanto nucleósidos naturales como análogos (figura 12). La dCK fosforila la desoxicitidina, la desoxiadenosina y la desoxiguanosina, aunque tiene menor afinidad para las purinas (Arner y Eriksson, 1995). Los análogos de nucleósidos como la 2CdA, Ara-C, gemcitabina y F-ara-A (fludarabina) son también fosforilados eficientemente. El tratamiento con estos análogos estimula la actividad dCK, probablemente mediante modificaciones

post-traduccionales de la enzima (Sasvari-Szekely y col., 1998; Spasokoukotskaja y col., 1998).

Los nucleósidos purínicos pueden también ser fosforilados por la enzima mitocondrial **dGK**, desoxiguanosina quinasa. La dGK fosforila los substratos naturales desoxiguanosina, desoxiadenosina y desoxiinosina, pero también fosforila análogos como la Ara-G, CdA, gemcitabina y fludarabina (Sjoberg y col., 1998). Las enzimas **TK1** y **TK2** se encargan de la fosforilación tanto de desoxinucleósidos como desoxinucleótidos. La TK1 es la mejor estudiada de todas: se expresa en altos niveles durante la fase S del ciclo celular (Sherley & Kelly, 1988) y fosforila los substratos naturales timidina y uridina. La TK2 se localiza en la mitocondria y tiene una especificidad más amplia, fosforilando con cierta eficiencia también análogos como Ara-C y gemcitabina (Wang y col., 1999).

4.2.2 Enzimas catabólicos

La **5'-nucleotidasa** (5'-NT) desfosforila los desoxinucleótidos por hidrólisis del enlace éster eliminando el grupo fosfato del correspondiente nucleósido (figura 12). Las 5'-NTs constituyen una familia de enzimas que difieren en su localización subcelular y especificidad de sustrato. La ecto-5'-NT o CD73 se localiza en la membrana plasmática y degrada los nucleótidos extracelulares a nucleósidos de tal forma que puedan ser transportados al interior celular y reutilizados (Resta y col., 1998). Existen otras dos enzimas 5'-NT de localización intracelular que se diferencian por su afinidad por el sustrato, la 5'-NT de baja K_m y la de alta K_m (cN-I y cN-II, respectivamente). La cN-II es específica de monofosfatos purínicos y es activada por ATP, mientras que la cN-I es específica de monofosfatos pirimidínicos y es inhibida por ATP (Spychala y col., 1989). Existen otras 5'-NT con diferencias en localización y especificidad pero su impacto en la fosforilación de análogos de nucleósidos no ha sido estudiado por el momento (Hunsucker y col., 2001).

La ribonucleótido reductasa (RR) es una enzima esencial para la síntesis de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) requeridos para la síntesis del ADN y para mantener una reserva equilibrada de dNTPs. La RR reduce el ADP, GDP, CDP y UDP a sus correspondientes desoxinucleótidos, que son posteriormente fosforilados por la quinasa de nucleótidos difosfato (NDPK) y pueden incorporarse entonces al ADN. La excepción es el UTP, que es desfosforilado por la dUTPasa a su forma monofosfato. La timidilato sintasa (TS) convierte el dUMP en dTMP, que es fosforilado a su vez por la timidilato quinasa y la NDPK (Reichard, 1988). La RR se ve inhibida por los análogos CdA, fludarabina y gemcitabina y como resultado de ello se ven alterados los *pools* de dNTPs de la célula (Gandhi y col., 1995; Parker y col., 1991). Recientemente se ha descubierto un nuevo gen que codifica para una nueva RR, **p53R2**, que es directamente regulada por p53 (Tanaka y col., 2000; Xue y col., 2003).

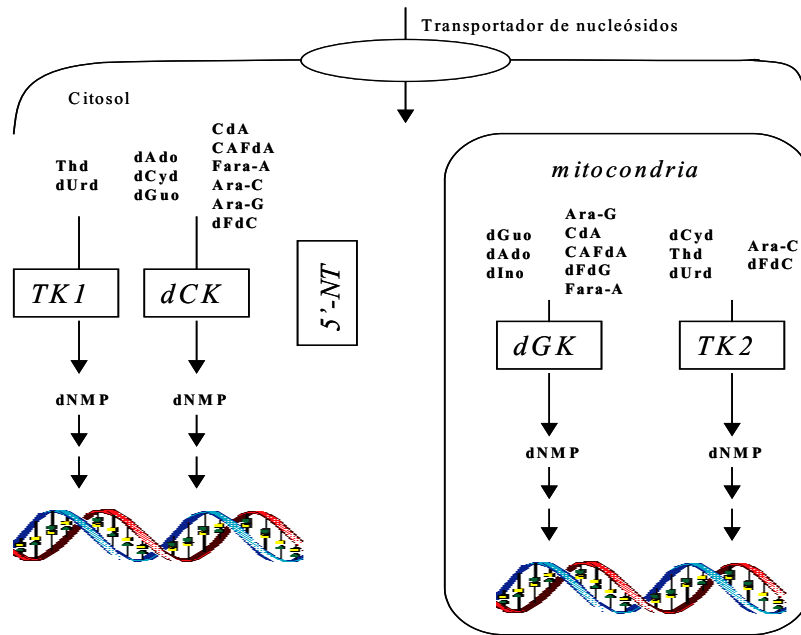


Figura 12: Desoxinucleósido quinasa y nucleotidasas y sus sustratos. La timidina quinasa, la desoxicitidina quinasa y la 5'-NT intracelular se localizan en el citosol mientras que la desoxiguanosina quinasa y la timidina quinasa 2 se localizan en la mitocondria.

4.3. RESISTENCIA A FÁRMACOS

La resistencia a fármacos incluye un proceso de selección celular, con poblaciones de células resistentes que sobreviven y se expanden durante repetidos ciclos. Las células pueden ser resistentes inicialmente o adquirir la resistencia tras diversos ciclos de tratamiento quimioterapéutico. Se han descrito tres mecanismos de resistencia a los análogos de nucleósidos. El primero se refiere a la insuficiente concentración intracelular de las formas metabólicamente activas (formas trifosfato). Esto se debe a una limitada internalización del sustrato, a una fosforilación insuficiente por la falta o por los bajos niveles de las enzimas implicadas en la activación y/o a un aumento de la degradación debido a un incremento de los *pools* internos de dNTPs o de las actividades 5'-nucleotidasa y/o citidina desaminasa (Galmarini y col., 2001). Un segundo mecanismo de resistencia deriva de la incapacidad de producir un número suficiente de alteraciones en las cadenas del ADN o de los *pools* de dNTPs. Esto podría ser debido a una deficiente interacción análogo/ADN polimerasa, la falta de inhibición de la ribonucleótido reductasa o la inadecuada actividad p53 exonucleasa. El último de los mecanismos tendría como consecuencia una ausencia o un bajo nivel de la inducción de la apoptosis.

La enzima *dCK* es esencial en la activación de muchos análogos de nucleósidos, por lo que la resistencia adquirida a estos fármacos se ha relacionado mayoritariamente con la deficiencia de esta enzima. Las células linfoides mutantes deficientes en *dCK* y en la adenosina quinasa han mostrado resistencia al tratamiento *in vitro* con fludarabina

(Verhoef y col., 1981). También se obtuvieron resultados similares en una línea celular de leucemia promielocítica humana resistente a ara-C. Existen múltiples estudios en células linfoides que correlacionan la resistencia a fármacos como la fludarabina, ara-C, CdA y ara-G con la deficiencia en dCK (Verhoef y col., 1981; Bhalla y col., 1984; Shewach & Mitchell, 1986; Stegmann y col., 1993; Orr y col., 1995; Bai y col., 1998; Dumontet y col., 1999b; Curbo y col., 2001; Lotfi y col., 2002). De hecho, la reintroducción mediante adenovirus de la actividad dCK restituye la sensibilidad a ara-C y CdA (Hapke y col., 1996). Se ha visto relacionada la deficiencia en dCK con la resistencia a gemcitabina en estudios en líneas celulares de cáncer de ovario humano (Ruiz van Haperen y col., 1994; Ruiz van Haperen y col., 1995; Kroep y col., 1998).

La TK2 es capaz de fosforilar tanto gemcitabina como desoxicidina, pero fosforila con mucha más eficiencia el substrato natural. Por tanto, un incremento en la relación dCK/TK2 conduciría a una relación dFdCTP/dCTP aumentada, contribuyendo a aumentar la actividad de la gemcitabina. Se ha visto que una baja actividad de la TK2 permite predecir una alta sensibilidad a la gemcitabina (Nielsen y col., 1995). La 5'-NT se opone a la acción de las quinasas al catabolizar la reacción de producción de nucleósidos a partir de los nucleótidos. La sobreexpresión de la 5'-NT confiere resistencia a análogos de pirimidinas (Hunsucker y col., 2001). En este mismo sentido, en pacientes con leucemia se encontró una correlación entre los niveles anteriores al tratamiento de la expresión de la 5'-NT y la eficacia del análogo purínico 2-CdA (Kawasaki y col., 1993). En la línea celular de eritroleucemia K562, se observó un incremento de la actividad 5'-NT asociada con la resistencia al tratamiento con gemcitabina (Dumontet y col., 1999b). La ribonucleótido reductasa (RR) se ve inhibida por varios análogos de nucleósidos entre los que se encuentran la dFdC (gemcitabina), la CdA, la CAFdA y la F-ara-A (fludarabina) (Parker y col., 1991; Lawrence y col., 1997). La falta de efecto inhibitorio sobre la RR o una actividad aumentada de la enzima pueden llevar a la resistencia (Goan y col., 1999). La RR es clave en la acción de la gemcitabina al modular los niveles de dNTPs, pero una deficiencia o un aumento en su actividad sólo afectará a la sensibilidad dependiendo de la regulación de otros determinantes como la dCK o el transporte a través de la membrana (Wong y col., 1999).

En cuanto a la resistencia relacionada con la incorporación a los ácidos nucleicos, los análogos purínicos CdA, CAFdA y F-ara-A inhiben la ADN polimerasa α , β , y γ en diferentes grados (Parker y col., 1991). Un posible mecanismo de resistencia propuesto podría ser la alteración del sitio de unión de la ADN polimerasa, haciéndola insensible a los efectos de los análogos. Se ha sugerido esta causa en la resistencia a ara-C y F-ara-A (Tanaka & Yoshida, 1982; Higashigawa y col., 1991).

Por otro lado, la gemcitabina, en su forma trifosfato dFdCTP, es incorporada al ADN por la ADN polimerasa α y ϵ (Huang y col., 1991; Ross y Cuddy, 1994). También se

incorpora al ARN dependiendo del tipo celular (van Moorsel y col., 1999). La tasa de incorporación de gemcitabina depende de la capacidad de las células para incorporar el dFdCTP al ADN y al ARN y la capacidad para escindir la gemcitabina del ADN y reparar el daño causado por la incorporación de dFdCTP. Ruiz van Haperen y colaboradores fueron los primeros en describir la incorporación de la gemcitabina al ARN (Ruiz van Haperen y col., 1993).

Hoy en día, se acepta que los análogos de nucleósidos matan las células por muerte celular programada o apoptosis. Defectos en la inducción de la maquinaria apoptótica, causarían por tanto resistencia al tratamiento. Ya que el daño causado sobre el ADN por los análogos de nucleósidos en su forma trifosfato es detectado por la proteína p53, las mutaciones en el gen p53 pueden ser un mecanismo de resistencia a la quimioterapia (Wattel y col., 1994). También la perturbación de la integridad mitocondrial se ha sugerido como importante en la inducción de apoptosis por análogos de nucleósidos (Marzo y col., 2001). Así, las proteínas de la familia de Bcl-2, inhibidoras o activadoras de la apoptosis, cuando se encuentran desreguladas pueden verse envueltas en mecanismos de resistencia. De hecho, Bax y Bcl-2 se han visto correlacionadas con ello en estudios clínicos (Zaja y col., 1998) aunque otros estudios no encontraron correlación alguna (Thomas y col., 1996; Morabito y col., 1997).

Se ha descrito que, en células de leucemia humanas, la formación de fragmentos grandes de ADN durante el proceso apoptótico, causados por la incorporación de la gemcitabina al ADN, es un proceso crítico en la apoptosis inducida por el fármaco (Huang y Plunkett, 1995). Las mutaciones en el gen p53 son muy comunes en las células tumorales y resultan en la pérdida de su función e inactivación (Hollstein y col., 1991). En células que expresan p53, la exposición a análogos como la gemcitabina causa una acumulación de células en fase G₁ y una sobreexpresión de los genes p21 y p53. Esta activación es dependiente de la dosis de gemcitabina, y mientras a bajas concentraciones se induce un arresto en el ciclo celular, a altas concentraciones, p53 induce apoptosis (Tolis y col., 1999).

La actividad de las vías de transducción de señal también se ha visto implicada como posible causa de resistencia. La vía de la PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3'- Kinase*) puede encontrarse activada, permitiendo así la supervivencia celular a través de la quinasa Akt/PKB (Downward, 1998). Se ha caracterizado la resistencia debido a esta vía ya que la acción del fármaco fue mejorada por concentraciones crecientes de inhibidores de la PI3K resultando en una mayor apoptosis por gemcitabina, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Ng y col., 2001). También se ha implicado a la PKC en resistencia a gemcitabina y ara-C al comprobar que la gemcitabina inducía la PKC y su inhibición mejoraba la apoptosis, sugiriéndole un papel en la apoptosis inducida por gemcitabina (Cartee y Kucera, 1998).

4.3.1. Implicación del transporte en la resistencia al tratamiento con análogos.

•Transportadores de nucleósidos

Muchos fármacos se transportan al interior celular a través de los sistemas de transporte de nucleósidos concentrativos con constantes de afinidad inferiores a las de los sistemas de transporte equilibrativos (Tabla 5). Si un tumor posee transportadores concentrativos, los inhibidores de los sistemas equilibrativos, como el NBTI, bloquearán la salida de la droga y por lo tanto, disminuirá la IC_{50} de las drogas y se incrementará el potencial antitumoral. Por otro lado, si el tumor no dispone de los sistemas concentrativos de transporte, el fármaco deberá ser transportado por los sistemas equilibrativos y sus inhibidores bloquearán la entrada de sustratos, de forma que se aumentará la IC_{50} y el tumor se hará resistente, aunque ayudará a disminuir la recuperación de los nucleósidos. Es decir, que se pueden utilizar los inhibidores de los sistemas equilibrativos para mejorar la respuesta a la quimioterapia.

Se ha visto que el NBTI y el dipiridamol, ambos inhibidores del sistema es, pueden proteger algunos tipos celulares en cultivo de la actividad antiproliferativa y tóxica de diversos análogos de nucleósidos. Por ejemplo, la captación de arabinosiladenina en células L1210/C2 está mediada por el sistema equilibrativo y por el dependiente de sodio y concentrativo que tienen estas células. En presencia de dipiridamol y dilazep se observa una acumulación intracelular de ara-A y de ara-ATP. Cuando las células se incuban con ara-A tritiado más dipiridamol o dilazep, se observa una prolongada retención de ara-ATP, que se explicaría por un bloqueo de la salida de ara-A. Este aumento en las concentraciones y esta retención de ara-A y ara-ATP tienen implicaciones terapéuticas, ya que la adición de dipiridamol a las células en un medio en suspensión que contenga ara-A incrementa sinérgicamente la actividad antiproliferativa de ara-A (Dagnino y Paterson, 1990).

Los inhibidores NBTI, dilazep y dipiridamol pueden tener aplicaciones farmacológicas al modular el índice de antimetabolitos utilizados en la quimioterapia del cáncer. Se ha estudiado la capacidad de estos inhibidores en la reducción de la toxicidad de exposiciones *in vitro* a tubercidina (7-desazaadenosina) en células progenitoras normales de médula ósea y en dos líneas celulares de leucemia, que difieren en su diferente expresión de subtipos de transportadores. Se ha visto que la protección a la tubercidina es debida al bloqueo de su captación por sistemas de transporte equilibrativos, principalmente los sensibles a NBTI (Cass y col., 1992). Recientemente, se ha descrito el papel de un derivado del dipiridamol, el BIBW22BS, entre 20 y 100 veces más potente que éste, en la reversión de la resistencia múltiple a fármacos. En diversas líneas celulares de cáncer de mama, el BIBW22BS, a concentraciones no tóxicas, incrementa los efectos antiproliferativos del 5-FU de 2 a 6 veces, y en menor grado los del metotrexato, pero

inhibe la actividad de la gemcitabina de 30 a 100 veces, probablemente por la falta de transportadores concentrativos en estas células (Jansen y col., 1995).

A pesar de la existencia de diferentes observaciones, la importancia farmacológica de la falta o deficiencia de transportadores de nucleósidos como una causa directa de ciertos tipos de resistencia, no está bien establecida *in vivo* debido a las dificultades asociadas a este tipo de estudio (Pastor-Anglada y col., 1998). En ese aspecto, en nuestro laboratorio se han realizado estudios de correlación del transporte de nucleósidos en células de pacientes de leucemia linfática crónica (CLL) con la toxicidad *ex vivo* al tratamiento con fludarabina, resultando en una acumulación del fármaco debida, casi exclusivamente, a una actividad equilibrativa de transporte que claramente se correlacionaba con la citotoxicidad de la fludarabina, lo que revela un papel clave del transporte equilibrativo en la respuesta al tratamiento de pacientes con CLL *in vivo* (Molina-Arcas y col., 2002). Mackey y colaboradores, utilizaron un anticuerpo monoclonal para determinar por inmunohistoquímica la expresión diferencial de la proteína hENT1 en tumores de mama. En estudios con líneas celulares se había demostrado que una resistencia aumentada a 5'-DFUR se asociaba a una baja expresión de hENT1 (Mackey y col., 2002).

En relación al papel de los transportadores concentrativos, y en un trabajo contemporáneo al estudio realizado en esta tesis, Lang y colaboradores introdujeron hCNT2 en estas mismas células de leucemia deficientes en transporte de nucleósidos, y vieron que esta reintroducción causaba un aumento en la sensibilidad a cladribina, 5'-dFUr y 5-FUd, pero no a fludarabina (Lang y col., 2001).

En resumen, se ha encontrado correlación entre la actividad de transporte de nucleósidos equilibrativa sensible a NBTI (**es**) y la sensibilidad a análogos de nucleósidos, aunque no está claro el papel que puede jugar esta actividad en tipos celulares que coexpresen actividades concentrativas de alta afinidad. Los transportadores concentrativos son capaces de transportar fármacos con alta eficiencia y se ha visto que se expresan mayoritariamente en tejidos diferenciados y su expresión se ve disminuía o llega incluso a perderse durante el proceso de desdiferenciación asociado a la carcinogénesis.

Sistemas concentrativos

	Análogos como sustratos (K_m aparente)	Referencias
hCNT1	gemcitabina + (17 μ M) 5'-DFUR (209 μ M) citarabina + fludarabina – cladribina –	(Mackey y col., 1999; Lostao y col., 2000; Mata y col., 2001; Galmarini y col., 2002a)
hCNT2	cladribina – fludarabina – gemcitabina –	(Schaner y col., 1999; Lang y col., 2001; Galmarini y col., 2002a; Gerstin y col., 2002;)
hCNT3	cladribina + fludarabina + gemcitabina +	(Ritzel y col., 2001b)

Sistemas equilibrativos

	Análogos como sustratos (K_m aparente)	Referencias
hENT1	gemcitabina+ (160 μ M) citarabina + fludarabina + cladribina +	(Avery y col., 1989; Jamieson y col., 1989; Gati y col., 1997; Mackey y col., 1999; Galmarini y col., 2002a)
hENT2	gemcitabina + (740 μ M) fludarabina+ cladribina + citarabina ^a +	(Mackey y col., 1999; Ward y col., 2000; Galmarini y col., 2002a)

Tabla 5: Propiedades farmacológicas de los transportadores de nucleósidos concentrativos y equilibrativos. ((+) transportado; (–) no transportado;^a análogo probado como inhibidor;5'-DFUR 5'-desoxi-5-fluorouridina. Extraído de (Pastor-Anglada y col., 2004)).

•Transportadores ABC (ATP- binding cassette)

Las proteínas de la familia ABC son transportadores activos dependientes de ATP y representan una de las mayores familias de proteínas transmembrana (Higgins, 1992 ; Dean y Allikmets, 1995). La unidad funcional típica de estas proteínas consta de dos dominios hidrófilos de unión a ATP también llamados NBD de *nucleotide binding domains* y dos dominios transmembrana hidrófobos o MSD de *membrane spanning domains*. Los MSDs determinan la especificidad por el tipo de molécula transportada y son los que forman el poro por el que el sustrato atraviesa la membrana. Los NBDs interactúan con los bucles intracelulares de los MSDs formando un núcleo de 215 aminoácidos. Dentro de este núcleo de 215 aminoácidos de los NBDs existen dos motivos característicos de las proteínas ABC, son los llamados motivos Walker A y Walker B (Walker y col., 1982). Entre

estos dos motivos existe un tercero de 14 aminoácidos llamado Walker C (Hyde y col., 1990) (Figura 13). En eucariotas, la mayoría de estas proteínas media el transporte desde el citoplasma hacia el exterior celular. Estas proteínas eucariotas pueden presentar los dos dominios transmembrana y los dos de unión a ATP o bien sólo la mitad formando homodímeros o heterodímeros para constituir un transportador funcional (Hyde y col., 1990).

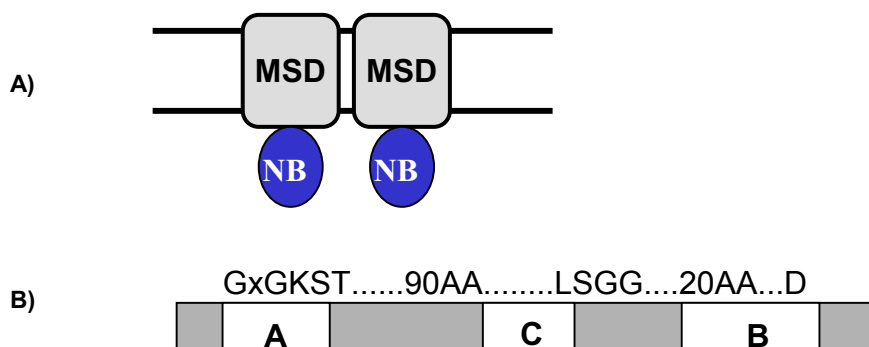


Figura 13: (A) Organización de los dominios de una típica proteína transportadora ABC con los dos dominios hidrófobos transmembrana y dos hidrófilos en la cara interna de la membrana celular. Estos dominios se pueden encontrar fusionados de diferentes maneras. (B) Los NBD de los genes ABC contienen los motivos Walker A y Walker B encontrados en todas las proteínas con uniones a ATP, además de un tercero, llamado Walker C. En la figura se muestra la secuencia más común de estos motivos (Figura modificada a partir de Dean y col., 2001).

Las bombas de extrusión ABC transportan los sustratos básicamente de manera unidireccional. En bacterias se encuentran principalmente relacionadas en el transporte hacia el interior de la célula de compuestos esenciales que no pueden ser adquiridos por difusión, como azúcares, vitaminas, o iones metálicos. En eucariotas, la mayoría de genes ABC desplazan compuestos del citoplasma celular hacia el exterior de la célula o hacia compartimentos como el retículo endoplasmático, mitocondria o peroxisomas. La mayor parte de funciones conocidas para esta familia de genes se dirigen hacia la salida de sustancias hidrofóbicas como parte de un proceso metabólico o hacia el exterior celular en el transporte hacia otros órganos.

Algunas de estas proteínas pueden transportar fármacos hacia el exterior de la célula en contra del gradiente de concentración dando lugar a resistencia frente a los fármacos transportados. Las proteínas MRP (multidrug resistance protein) forman parte de los transportadores ABC y constituyen la subfamilia de transportadores ABCC, aunque la primera proteína humana clonada que parecía ofrecer resistencia a una variedad de fármacos fue la MDR1-glicoproteína P (PgP), que pertenece a la subfamilia B (ABCB), por eso también conocida como ABCB1 y que fue caracterizada debido a su capacidad de conferir un fenotipo de resistencia múltiple a fármacos en células cancerosas (Roninson y col., 1986). Esta resistencia a fármacos, cómo ya hemos visto anteriormente, puede

producirse por diferentes factores como puede ser una disminución en la entrada del fármaco al interior de la célula, una elevada desintoxicación, alteración de las proteínas diana o una elevada secreción del fármaco. Esto puede llevar a la a la resistencia múltiple a fármacos (MDR), donde la célula es resistente a varios fármacos, lo que limita el tratamiento anticancerígeno. Los genes ABC juegan un papel importante en la MDR, de manera que, aunque la entrada de fármacos no se vea alterada por estas proteínas, sí se ve disminuida su acumulación en el interior celular.

La PgP puede provocar resistencia a drogas anfipáticas de gran tamaño, como puede ser el paclitaxel (taxol), antraciclinas y alcaloides Vinka (Eytan y col., 1996). Esta proteína interviene en procesos de protección. En la barrera hematoencefálica, en los trofoblastos placentarios, testículos y médula ósea, la PgP actúa como protector de zonas vitales para el organismo. Además, en intestino, hígado y riñón esta proteína ayuda en la eliminación de toxinas. Por otro lado, la PgP puede interferir con la llegada de fármacos al tejido diana.

Tras el descubrimiento de la PgP, se vio que muchos tipos celulares que presentaban MDR sin acumulación intracelular del fármaco, no sobreexpresaban esta proteína (McGrath and Center, 1987; McGrath y col., 1989). Poco después se detectó una glicoproteína de 190 kDa en una cepa de la línea celular HL-60 resistente a doxorubicina, utilizando anticuerpos de la humana MDR1 p-glicoproteína contra el extremo carboxilo (Marquardt y col., 1992). Dos años más tarde se clonó el ADNc de MRP1 (Cole y col. 1992). MRP1 confería resistencia a un amplio espectro de fármacos anticancerígenos, de manera similar, pero no idéntica, a la PgP. MRP1, a diferencia de la PgP, puede actuar como una bomba de GS-X, con lo que podría transportar fármacos conjugados a glutation (GSH) ya que los niveles de transporte dependientes de ATP para varios compuestos se correlacionaron con el nivel de expresión de MRP1 en muchas preparaciones celulares (Jedlitschky y col., 1994; Leier y col., 1994). Por otro lado, la sobreexpresión de MRP1 en células tumorales humanas, ha dado lugar a un aumento del transporte dependiente de ATP de conjugados a GSH en vesículas de membrana plasmática y también en células (Müller y col., 1994; Evers y col., 1996). En 1996, diferentes grupos identificaron un nuevo miembro de esta familia, a la que llamaron cMOAT (**c**analicular **m**ultispecific **o**rganic **a**nion **t**ransporter) y cMRP (**c**analicular **M**RP) (Büchler y col., 1996; Keppler y Kartenbeck, 1996; Paulusma y col., 1996), pero, ya que se vio que esta proteína no estaba restringida a la membrana canalicular de los hepatocitos, se rebautizó como MRP2. Estudios mediante la base de datos humana EST consiguieron aislar 21 genes nuevos de la superfamilia ABC incluyendo MRP1 y MRP2, así como cuatro genes homólogos a ambas proteínas (Allikmets y col., 1996) y más adelante, con estudios del mismo tipo se identificaron estos cuatro genes como MRP3, MRP4, MRP5 y MRP6 (Kool y col., 1997). En el año 2001 se

identificaron tres nuevos miembros: MRP7, MRP8 y MRP9 (Hoper y col., 2001; Bera y col., 2001, Tammur y col., 2001; Yabuuchi y col., 2001).

Actualmente se sabe que la subfamilia ABCC, está formada por doce miembros con funciones que incluyen transportadores de iones, receptores de superficie celular y proteínas con actividades implicadas en la secreción de toxinas (tabla 6). La proteína CFTR es un canal iónico de cloro que actúa en todas las secreciones exocrinas y mutaciones en este gen causan fibrosis quística. ABCC8 y ABCC9 son proteínas que se unen a la sulfonilurea y regulan los canales de potasio involucrados en la modulación de la secreción de insulina. El resto de subfamilia se compone de nueve genes MRP, de éstos, ABCC1, ABCC2 y ABCC3 transportan fármacos conjugados a glutatión y otros aniones orgánicos. ABCC4, ABCC5, ABCC11 y ABCC12 son más pequeñas que el resto de genes MRP y coinciden en la falta de un dominio en el extremo amino terminal (Borst y col., 2000) que no es esencial para el transporte (Bakos y col., 2000). Las proteínas ABCC4 y ABCC5 confieren resistencia a nucleósidos como los análogos de purina.

Gen	Alias	Localización	Expresión	Función
ABCC1	MRP1	6p13.1	Hígado, testículo, PBMC	Resistencia a fármacos
ABCC2	MRP2	10q24	Hígado	Transporte aniones orgánicos
ABCC3	MRP3	17q21.3	Pulmón, intestino, hígado	Resistencia a fármacos
ABCC4	MRP5	13q32	Próstata	Transporte de nucleósidos
ABCC5	MRP5	3q27	Ubicuo	Transporte de nucleósidos
ABCC6	MRP6	16p13.1	Riñón, hígado	
ABCC7	CFTR	7q31.2	Tejido exocrino	Canal iónico de cloro
ABCC8	SUR	11p15.1	Páncreas	Receptor de sulfonilurea
ABCC9	SUR2	12p12.1	Corazón, músculo	
ABCC10	MRP7	6p21	Niveles bajos en todos los tejidos	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	Niveles bajos en todos los tejidos	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	Niveles bajos en todos los tejidos	

Tabla 6: Lista de los genes de la subfamilia ABCC, localización cromosómica y función. Adaptado de Dean y col. 2001

• El transportador MRP5 (ABCC5)

Con el fin de investigar un posible papel de los homólogos MRP en la resistencia a fármacos, Kool y colaboradores examinaron en un amplio número de líneas celulares que

presentaban MDR para la sobreexpresión de MRP2 (entonces cMOAT), MRP3, MRP4 y MRP5, de manera que encontraron que la expresión de MRP2 era elevada en muchas de las líneas seleccionadas por su resistencia a cisplatino, mientras que para MRP3, MRP4 y MRP5 no mostraban una clara correlación entre la resistencia celular y los niveles de expresión, por lo que concluyeron que aunque existía la posibilidad de una implicación en el fenómeno de MDR por estas proteínas, estas correlaciones no eran suficientes para establecer una relación causal (Kool y col., 1997).

Trabajos posteriores mediante la generación de líneas que sobreexpresaban MRP5 permitieron el estudio de su posible implicación en la MDR, sus características de transporte y su localización intracelular en líneas epiteliales polarizadas (Wijnholds y col., 2000). De esta manera, MRP5 se localizó mediante anticuerpos monoclonales por inmunocitoquímica principalmente en la membrana plasmática, y en particular en la membrana basolateral de las células MDCK, mientras que en células no polarizadas la presencia de MRP5 se detectó intracelularmente. MRP5 se encuentra expresada de manera casi ubicua, con niveles elevados de ARNm en cerebro, músculo esquelético, pulmón y corazón (Belinsky y col., 1998; Kool y col., 1997).

En cuanto a la MDR, se observaron niveles de resistencia a 6-MP, su profármaco azatioprina, tioguanina, 5-hidroxipiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (5-HP), y PMEPA, pero no contra fármacos como tamoxifen, 5-FU o cisplatino, entre otros (Wijnholds y col., 2000). Aunque estaba claro que existe una liberación de nucleósidos monofosfato por las células, las proteínas de transporte involucradas y su efecto potencial sobre las terapias de análogos de nucleósidos continuaba sin conocerse, al menos hasta que se demostró que tanto MRP4 como MRP5 eran capaces de transportar nucleósidos monofosfato (Schuetz y col., 1999, Lee y col., 2000; Wijnholds y col., 2000). Ambas proteínas, a diferencia de otros miembros de las MRP, transportan nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc (Chen y col., 2001; Jedlitschky y col., 2000), aunque hay diferentes opiniones sobre si este transporte es dependiente de GSH o no. A MRP5, al igual que MRP4, le falta el dominio N-terminal MSD0 que se encuentra en MRP1, lo que indica que sus funciones pueden ser diferentes al de otros miembros de la familia MRP. Muy recientemente se ha descrito que MRP5 confiere resistencia al 5-FU en células HEK, de manera que en tres días de ensayos de citotoxicidad, estas células transfectadas con MRP5 muestran una resistencia a 5-FU y 6-thioguanina 9 veces superior al control (Pratt y col., 2005).

En resumen, un número importante de fármacos derivados de nucleósidos o nucleobases se están utilizando en el tratamiento del cáncer. Algunas enzimas implicadas en la metabolización de estos análogos pueden ser dianas de predicción de respuesta, pero los transportadores responsables, tanto de su internalización como de la salida de la célula, pueden contribuir a modular la biodisponibilidad de estos fármacos y por lo tanto su

acción terapéutica. Nuestro grupo de investigación se centra en el estudio de los transportadores de nucleósidos y su caracterización funcional y molecular. La sensibilidad celular a estos fármacos puede depender en gran parte de la expresión de estas proteínas transportadoras. Asimismo, la expresión de un transportador de fluoropirimidinas de alta afinidad como hCNT1 confiere mayor citotoxicidad a aquellos derivados que son sustrato del transportador. Por estas razones nos interesaba estudiar las posibles diferencias de expresión de los transportadores en modelos experimentales humanos, tal y como hemos descrito en modelos animales. Por otro lado, las bombas de ATP pueden facilitar la salida del fármaco desde el interior celular. Muy recientemente se ha visto que las isoformas MRP4 y MRP5 pueden estar involucradas en la resistencia a análogos de bases como la tioguanina y a fármacos derivados de tiopurinas, respectivamente. El estudio del impacto de la co-expresión de un transportador de fluoropirimidinas de alta afinidad como es hCNT1 y una bomba de ATP que pueda transportar hacia el exterior de la célula dicho fármaco nos puede servir de aproximación en el estudio de quimiorresistencias en la terapia anticancerígena.

1. EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO

Los transportadores concentrativos son proteínas de membrana que se expresan en un número mayor de tejidos de los que se creía en un principio. Existen evidencias de la presencia de los transportadores equilibrativos en el sistema nervioso central, mientras que apenas se dispone de información acerca de los transportadores concentrativos. El hecho de que la adenosina juegue un papel tan importante en cerebro nos hizo pensar en una posible implicación de CNT2, el transportador preferente por adenosina, en el transporte y recaptación de este nucleósido neuromodulador. Existen evidencias en nuestro grupo de una activación del transporte de CNT2 vía el receptor A₁ de adenosina (Dufloy y col., 2004). El objetivo principal de este apartado es el estudio de la distribución de los transportadores de nucleósidos, principalmente CNT2, en el sistema nervioso central y la caracterización, mediante estudios de regulación, del posible papel que juega esta proteína transportadora en cerebro.

Objetivos concretos y planteamiento experimental:

- Análisis de expresión de CNT2 en cerebro de rata por hibridación *in situ* y comparación de su localización con la de ENT1, un transportador del que ya se conocen los tipos celulares que lo expresan.
- Comparación de los niveles de transcrito de ambos transportadores por PCR a tiempo real.
- Utilización de modelos experimentales animales donde la adenosina tenga un papel prioritario para estudiar los cambios del transcrito de CNT2 en cerebro.
- Detección de la actividad de transporte de CNT2 en líneas neuronales y/o cultivos primarios de neuronas para buscar un modelo donde estudiar la regulación de este transportador en cerebro.

2. DESARROLLO DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

Nuestro grupo de investigación fue el primero en generar anticuerpos contra los transportadores de nucleósidos concentrativos en rata (Felipe y col. 1998). Estas herramientas han sido de gran utilidad en el estudio de expresión de estas proteínas en una variedad de muestras de diferentes tejidos, indicando que la localización de CNT1 y CNT2 es mucho más amplia de lo que se creía en un principio (Valdés y col., 2000). Estas evidencias promovieron en nuestro grupo de investigación la generación y caracterización de anticuerpos que podrían reconocer aquellas isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos clonados de manera que nos permitiera estudiar la expresión diferencial en muestras de biopsias de tejidos tumorales humanos, tal y como se había hecho en rata (Dragan y col., 2000). La expresión de los transportadores de nucleósidos depende del

estado de diferenciación y transformación celular, y el patrón de estas proteínas puede diferir entre una célula sana y otra tumoral, así mediante la generación de estas herramientas se podría justificar, en parte, la sensibilidad tumoral a fármacos derivados de nucleósidos.

Objetivos concretos y planteamiento experimental:

- Diseño y generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra las isoformas clonadas de los transportadores de nucleósidos mediante programas de predicción de dominios transmembrana y estructuras secundarias de hélice α .
- Caracterización de los anticuerpos para western blot e inmunohistoquímica preferentemente en tejido incluido en parafina.
- Realización de las primeras pruebas de análisis de expresión tisular de los transportadores de nucleósidos en tejidos tumorales.

3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN TUMORES HUMANOS

Una misma célula puede coexpresar varias isoformas de los transportadores de nucleósidos y este patrón de expresión parece depender del estado de diferenciación y/o transformación celular. La generación de los anticuerpos contra las isoformas de rata, ha permitido confirmar estos niveles de expresión diferencial entre células tumorales y sanas mediante la técnica de inmunohistoquímica en dos modelos de hepatocarcinogénesis en rata (Dragan y col., 2000). Esta fue la primera evidencia de que un tumor puede condicionar la pérdida selectiva de estas isoformas de transportadores de nucleósidos con lo que sería de esperar que la bioasequibilidad de los fármacos que son sustratos de este transportador se encuentre alterada.

El objetivo general de este bloque consiste en el estudio de la expresión de los transportadores de nucleósidos en una variedad de muestras de tejidos tumorales humanos que nos permita valorar su expresión y localización, las implicaciones clínicas en el tratamiento de tumores ginecológicos y de mama, y evaluar un probable rol de estas proteínas, en concreto hCNT1, como posibles marcadores biológicos.

Objetivos concretos y planteamiento experimental:

- Expresión de los transportadores de nucleósidos en carcinomas de ovario, endometrio y útero cervical.
- Análisis de la expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en los diferentes subtipos histológicos de tumores ginecológicos y sus posibles correlaciones con el tipo histológico.
- Expresión de hCNT1 en tumores de mama.

1. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares se han clasificado según su capacidad de adherencia y también dependiendo de si las células fundadoras han sido aisladas a partir de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido alguna modificación. Se habla de cultivo primario cuando las células en cultivo provienen de aislamientos celulares a partir de un órgano de un animal sacrificado, mientras que cuando este cultivo primario se somete a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación recibe el nombre de línea celular. Los cultivos primarios conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. Si el cultivo celular crece adherido a una superficie, dichas células pueden crecer formando monocapa y si, en cambio, la línea celular no es capaz de anclarse a una superficie para su crecimiento, se habla de crecimiento en suspensión. Esta característica depende en gran medida del tipo celular del que derivan.

1.1 TÉCNICA DE TRABAJO *IN VITRO*

El crecimiento y la multiplicación de los cultivos implican la adopción de toda una serie de medidas con el fin de garantizar al máximo las condiciones de esterilidad. Es necesario trabajar en una cabina de flujo laminar, previamente esterilizada con radiaciones ultravioletas. Todas las superficies de trabajo, se desinfectan con etanol al 70% antes de iniciar el trabajo con el cultivo celular. Asimismo, todos los medios de cultivo, soluciones y materiales deben ser estériles.

Aparatos y material

- Campana de flujo laminar vertical, dotada de iluminación ultravioleta, sistema de aspiración de líquidos por vacío y mechero de Bunsen.
- Incubador de células con atmósfera controlada (5% CO₂, 95% O₂, 95% de humedad y 37°C de temperatura).
- Microscopio invertido (Olympus CK2).
- Contenedores criogénicos, que incluyen un contenedor de isopropanol (Nalgene) y un tanque de nitrógeno líquido.
- Equipamiento plástico de un sólo uso, especial para el crecimiento de células: frascos y placas de poliestireno, tubos de centrifuga y crigoenia (Corning)

1.2 CULTIVO PRIMARIO

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. El hecho de estar más cercanas a las células que las originaron se

refleja en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural. Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes.

1.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS NEURONALES DE CEREBELO Y DE HIPOCAMPO Y CORTEZA CEREBRAL.

1.3.1 Aislamiento y cultivo

Animales de experimentación

Los animales utilizados para este estudio han sido ratas albinas hembra de la cepa Wistar (Interfauna, Harlan Ibérica), mantenidas en el Servicio de Estabulario de la Facultad de Biología de la U.B. Los animales se adquieren con un peso de unos 200 gramos y tras someterlos a una semana de aclimatación en el estabulario, se cruzan durante una noche con una rata macho de la misma cepa pero de peso mayor. Al día siguiente se realiza un frotis vaginal a la hembra para comprobar si ha habido cópula. Si el resultado es positivo, se espera hasta los 17-18 días de gestación (contando como día 0 el día en que se realiza el frotis positivo) momento en el que se realiza el aislamiento celular para el cultivo de células de corteza cerebral e hipocampo, y hasta los 5-7 post-natales en el caso de cultivo de células granulares de cerebelo. Durante la estancia de los animales en el estabulario, éstos son mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura constante de 20-22°C y siguiendo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los animales tienen acceso a los piensos (Dieta de mantenimiento A04, Panlab) y al agua *ad libitum*.

Reactivos y material:

- Baño con termostato (Selecta).
- Lupa binocular.
- Material de cirugía (tijeras, pinzas, bisturíes...).
- Hemocitómetro de Neubauer.
- Solución Azul de tripán (Sigma).
- Solución de anestesia:
 - Ketamina (Imalgene, Bayer): 150 mg/Kg.
 - Xilacina (Rompun, Bayer): 10 mg/Kg.
- PBS.
- Solución de glucosa al 0,6% en PBS.
- Tripsina al 0,25% en PBS suplementada con 5mM de EDTA (Gibco, Life Technologies).
- DNasa I 10 U/µl (Roche).

- Suero de caballo: NHS (Gibco, Life Technologies), con sistema de complemento inactivado a 56°C durante 30 minutos.
- Solución de adhesión de poli-L-lisina (Sigma). La solución madre se prepara a 5 mg/ml.
- Medio de cultivo y suplementos:
 - Hipocampo y corteza cerebral:
 - 50 ml de medio Neurobasal (Gibco, Life Technologies).
 - 25 µl Glutamina 200mM (Gibco, Life Technologies).
 - 260 µl NaHCO₃ 7,5%
 - 660 µl Glucosa 45%
 - 0,5 ml Penicillina/Estreptomicina 10000 U/ml (Gibco, Life Technologies).
 - 5% NHS inactivado (Gibco, Life Technologies).
 - 1 ml B27 (suplemento hormonal) (Roche).

Cerebelo:

- 50 ml de medio DMEM (Gibco, Life Technologies).
- 25 µl Glutamina 200mM (Gibco, Life Technologies).
- 660 µl Glucosa 45%
- 0,5 ml Penicillina/Estreptomicina 10000 U/ml (Gibco, Life Technologies).
- 1 ml B27 (suplemento hormonal) (Roche).
- 1 ml N2 (suplemento hormonal) (Invitrogen)

Proceso del aislamiento celular

Nos hemos basado en el protocolo de aislamiento de células granulares de cerebelo de Fishell y Hatten (Fishell y Hatten, 1991).

(a) Disgregación del tejido: Se anestesia la rata gestante a los 17-18 días de gestación con una mezcla de ketamina/xilacina, por inyección intraperitoneal. Una vez comprobado que está dormida, se procede a abrir al animal para la extracción de los embriones. Éstos se colocan en placas con PBS-Glucosa y se diseccionan con ayuda de la lupa binocular con el objetivo de aislar los encéfalos, que se depositan en placas también con PBS-Glucosa en hielo. Se descartan los bulbos olfativos, se secciona la corteza para separar ambos hemisferios y se eliminan meninges y ganglios basales, así como tálamo e hipotálamo. Finalmente sólo nos quedamos con la corteza e hipocampo, que se trocea con un bisturí en una placa con PBS-glucosa sobre hielo, procurando hacer fragmentos del tamaño de 1mm³ aproximadamente. En el caso del aislamiento del cultivo de células granulares de cerebelo, las crías de rata de 5-7 días de edad se decapitan y se aísla el cerebelo que a esta edad ya es evidente.

(b) Aislamiento celular: Los fragmentos se incuban con una solución de tripsina 0.25%-EDTA a 37°C durante 15-20 minutos. La digestión se para añadiendo 1/3 del volumen de suero de caballo. Se retira el medio y se sustituye por 3 ml de PBS-glucosa suplementado con 300 µl de DNasa I. Los fragmentos se disocian mecánicamente con pipeta realizando de 15 a 20 entradas. Se deja sedimentar y se recoge el sobrenadante que contiene las células disociadas y se transfiere a un tubo nuevo que se centrifuga durante 6 minutos a 800-1000 g y se resuspende en un volumen conocido de medio de cultivo (unos 10 ml).

(c) Recuento celular: La viabilidad de la suspensión de células se mide mediante el método de exclusión de azul de tripán. Se mezclan 45µl de la solución de azul de tripán en 45 µl de medio y 10 µl de la preparación celular y se realiza el recuento celular de una alícuota que se deposita en un hemocitómetro o cámara de Neubauer a 10x10 aumentos. El número de células por mililitro se determina multiplicando el número de células vivas, por tanto no teñidas, en los 0.1mm³ de la cámara por el factor de dilución utilizado (1:10).

Proceso del cultivo celular

Se realiza la siembra de las células en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 200.000-250.000 células por pocillo y en placas de 6 cm de diámetro a una densidad de 3x10⁶-3.5x10⁶ células por placa. Las placas se han de cubrir previamente durante un mínimo de 30 minutos con una solución de adhesión de poli-L-lisina para favorecer la adhesión de las células. Justo antes de la siembra, se aspira la solución de adhesión y se siembran las células. El medio de cultivo utilizado es medio completo en el momento de la siembra, pero al día siguiente se cambia por uno libre de suero. En el caso del cultivo de células granulares de cerebelo, la primera siembra se realiza sobre placas no recubiertas de la solución y se dejan durante cuatro horas, realizando un cambio de placa a las 2 horas. Al final se siembran sobre placas cubiertas con poli-L-lisina. Estas siembras previas a la definitiva nos permiten limpiar el cultivo de células que no nos interesan y de restos celulares que se adhieren al plástico de las placas de cultivo.

1.4 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo tiene la característica de ser aneuploide, de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. Una transformación puede inducirse

fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos.

1.4.1 Congelación y descongelación de células

La congelación de células es importante para disponer de alícuotas congeladas de las líneas celulares y prevenir la pérdida de la línea celular por contaminaciones o senescencia.

Reactivos y material

- Medio de congelación: FBS (*Fetal bovine serum*), 10% DMSO estéril (Sigma)
- Tanque de isopropanol (Nalgene)
- Criotubos (Cultek)
- Tripsina-EDTA (Innogenetics)

Para realizar la congelación manteniendo la viabilidad de las células, es necesario el uso de crioprotectores, como el glicerol o el DMSO (dimetilsulfóxido). La composición del medio de congelación puede variar. Normalmente, se añade al medio de cultivo suplementado, un 10% de DMSO estéril, pero en nuestro caso, hemos congelado directamente en suero y un 10% de DMSO.

Procedimiento de congelación

Las células se dejan crecer hasta un 70-80% de confluencia en frascos de 75 cm². Se aspira el medio de cultivo y se lavan los frascos dos veces con PBS para eliminar los restos de suero. Se añade 1ml de tripsina y se deja incubar hasta que las células se empiezan a desenganchar de la placa. Si se trata de células fuertemente enganchadas a la superficie del frasco, se recomienda incubar los frascos con la tripsina a 37°C para favorecer la actividad de la enzima. El proceso de tripsinización se para añadiendo 10 ml de medio completo con el que se resuspenden las células. Se centrifugan 4 minutos a 1200 rpm para sedimentar las células. El medio se elimina por aspiración y se añade 1 ó 2 ml de medio de congelación. Se resuspenden bien las células y se alicuotan en uno o dos criotubos. Rápidamente se colocan en un tanque de congelación con isopropanol a -80°C y se dejan un mínimo de 4 horas y un máximo de 1 mes hasta que se trasladan a un tanque de nitrógeno líquido donde se almacenan hasta su uso.

Procedimiento de descongelación

Es aconsejable descongelar rápidamente las células, por ejemplo, sumergiendo los viales de congelación en un baño a 37°C hasta que las células empiecen a descongelarse. En ese momento el contenido del vial se vierte sobre un tubo de centrifugación que

contiene medio de cultivo y se centrifuga 4 minutos a 1200 rpm para eliminar el crioprotector, ya que es tóxico para las células a temperatura ambiente. Tras eliminar el sobrenadante por aspiración, las células se resuspenden en unos 12 ml de medio completo y se siembran.

1.4.2 Subcultivo celular

El cultivo de líneas celulares implica la propagación de células inmortalizadas y/o transformadas en superficies, principalmente de plástico, donde se adhieren y forman una monocapa, momento a partir del cual es necesario realizar el replaqueo con el fin de asegurar su viabilidad.

Procedimiento

El cultivo celular se deja crecer hasta un 75-80% de confluencia, que es cuando se realiza la tripsinización. El medio de cultivo de los frascos se aspira y las células se lavan dos veces con PBS y se añade tripsina-EDTA igual que en el protocolo de congelación. En este caso, las células se resuspenden después de la centrifugación con medio completo y se realiza una dilución dependiendo del tipo celular y del tiempo de duplicación de éste, de manera que el contenido de un frasco inicial se reparte en varios.

Cada vez que las células entran en contacto con el agente disgregante, en este caso la tripsina, se realiza lo que denominamos un “pase”. Es conveniente, en el caso de cada cultivo celular, contabilizarlos, ya que es posible que algunas características fenotípicas varíen con el número de “pases”. Por este motivo es necesario minimizarlos al máximo y multiplicar los viales descongelados con el fin de mantener una reserva de células con el menor número de pases.

1.4.3 Cultivos polarizados

Existen líneas celulares que pueden inducirse a polarizar. El uso de insertos especiales, en nuestro caso Transwell® (Cultek) y Thincerts™ (Greiner bio-on), permite utilizar superficies permeables para el estudio estas células polarizadas. Estos filtros de policarbonato permiten la diferenciación de las membranas apical y basolateral, lo que implica la formación de uniones estancas entre las células. En esta tesis se ha trabajado con la línea MDCK II de riñón de perro en cultivos polarizados sobre estos sistemas.

Reactivos y material

- Placas multipocillo *transwells* (12mm, 3mm por; Corning Costar, 3402) o insertos *Thincerts* (Greiner bio-on)
- Colágeno tipo I de cola de rata a 10 µg/ml en medio de cultivo sin suero. Se diluye a partir de una solución de 3.7 mg/ml (Upstate Biotechnology, 08-115).
- Medio de cultivo

Procedimiento

En el caso de los Transwell® es necesario tratarlos con colágeno previamente para que las células se adhieran a la superficie; en el caso de los Thincerts™, éstos ya se venden recubiertos. El colágeno se aplica en 200 µl de medio sin suero por cada inserto y se deja entre 16-20 horas en el incubador de células a 37°C. Se aspira el medio y se deja secar. Las células (400.000-420.000) se siembran en 200 µl de medio completo sobre las membranas permeables y al cabo de 1-2 horas se añade 1 ml de medio a ambos compartimentos, basal y apical. El medio de cultivo se renueva de forma regular cada 48 horas. Las MDCK son células que polarizan relativamente rápido y en 5-7 días tras la siembra ya se encuentran polarizadas.

Para controlar si las células se encuentran polarizadas se mide la resistencia o TEER (Trans Epithelial Electric Resistance) mediante el Millicell-Electrical Resistance System (Millipore) entre el compartimiento apical y basolateral, ya que ésta aumenta cuando el cultivo en monocapa se encuentra polarizado.

1.4.4 Líneas celulares con las que se ha trabajado

Neuro-2A: Línea derivada de neuroblastoma de ratón albino. Adherente de morfología neuronal-ameboide, alrededor del 30% de las células crecen como células neuronales y el 70% son redondeadas y se adhieren poco a la superficie. Crecimiento a 37°C. Se renueva el medio cada 48-72 h y se diluyen 1/3-1/6 para subcultivar. Esta línea produce grandes cantidades de proteína microtubular de la que se cree que interviene en un sistema contráctil responsable del flujo axoplásmico en células nerviosas. La línea celular se ha utilizado en estudios de mecanismos de la precipitación de vinblastina de la proteína microtubular, la cinética de la unión de GTP a proteína aislada, el movimiento de microtúbulos *in vivo*, y en la síntesis y ensamblaje de la proteína microtubular.

SH-SY5Y: Línea derivada de neuroblastoma humano. Adherente de morfología epitelial. Crecimiento a 37°C. SH-SY5Y es una sublínea de la línea celular SK-N-SH (SK-N-SH -> SH-SY -> SH-SY5 -> SH-SY5Y) que se estableció en 1970 a partir de un tumor óseo metastático. Las células crecen como *clusters* de células neuroblásticas con múltiples neuritas, cortas y finas. Se recomienda realizar una dilución 1/10 para subcultivarlas, son células de crecimiento lento y de adherencia pobre. Estas células reducen la velocidad de propagación adquiriendo un fenotipo neuronal cuando son estimuladas por diferentes sustancias tales como ácido retinoico o PMA. Durante la diferenciación, se han observado procesos como la *down*-regulación de c-myc y el aumento de c-fos, seguido de una disminución en afinidad y número de receptores colinérgicos muscarínicos, así como la aparición de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Fenotípicamente, las células diferenciadas desarrollan largas neuritas.

Línea Celular	Origen	Medio de Cultivo
Neuro 2A	Neuroblastoma de ratón	DMEM, FBS 10%, piruvato de sodio 200mM glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina/fungizona
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	DMEM, FBS 15%, glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina/ fungizona
PC 12	Feocromocitoma de rata	DMEM, NHS 5%, FBS 10%, penicilina/estreptomicina, glutamina 2mM
MDCK II (<i>Mabin-Darby canine kidney cells</i>)	Riñón de perro	DMEM, FBS inactivado 10%, glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina

Tabla 1: Resumen de las líneas celulares con las que se ha trabajado

PC-12: Línea derivada de feocromocitoma de rata. Se recomienda el uso de soluciones de adhesión ya que se adhieren poco al plástico. Las células responden de manera reversible a NGF hacia un fenotipo neuronal. Crecen formando *clusters* y se adhieren poco a las superficie de crecimiento. Se multiplican lentamente, con un tiempo de duplicación de 92 horas. Se recomienda una dilución $\frac{1}{4}$ para subcultivar y renovar el medio cada 2-3 días.

MDCK-II: Derivada de riñón de un coker spaniel adulto aparentemente sano. Adherentes de morfología epitelial. Se recomienda diluir $\frac{1}{5}$ para subcultivar y cambiar el medio cada 2-3 días. Línea polarizable. Las células MDCK II comparten características con células del túbulo proximal, mientras que las MDCK I recuerdan a las células epiteliales del túbulo distal renal. En esta tesis la hemos utilizado para la sobre-expresión de hCNT1 y MRP de forma estable y transitoria.

1.5 TRATAMIENTOS EN CULTIVOS CELULARES

1.5.1 Tratamiento de células con fármacos

Los cultivos en presencia de fármacos se realizan generalmente sembrando las células a una densidad adecuada dependiendo de la línea celular (para MDCK II, 15000 cels/cm²). Se incuban con las concentraciones escogidas del fármaco 5'DFUR (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1000 y 3000 μ M) por un tiempo determinado (normalmente 90 minutos) y al finalizar este tiempo, el medio es aspirado y substituido por medio estándar fresco. A partir de ese momento se mira la viabilidad celular al cabo de un cierto tiempo (normalmente, 24, 48 o 72 horas).

1.5.2 Agentes quimioterapéuticos

El 5'-desoxi-5-fluorouracilo (5'-DFUR) y el 5-fluorouracilo (5-FU) se venden en polvo (Sigma) y son estables a temperatura ambiente. La solución madre de 5'DFUR se prepara a una concentración de 100mM en agua. En el caso de 5-FU la solución madre se disuelve en DMSO y las soluciones posteriores en agua. Las alícuotas se guardan a congeladas a -20°C .

1.5.3 Curvas dosis-respuesta

El análisis de la citotoxicidad de un fármaco se basa en la valoración de la supervivencia después de la exposición a dicho fármaco. Existe una gran variedad de métodos para determinar la citotoxicidad que se basan en medir la proliferación celular (cuantificación de la síntesis de ADN mediante ^3H -timidina), la viabilidad celular (reducción de sales de tetrazolium o exclusión de azul de tripán) o la apoptosis (marcaje con anexina V). La elección del método depende del tipo de fármaco, del tipo celular y de la metodología disponible.

Las curvas dosis-respuesta se presentan como viabilidad relativa tomando como 100 % de viabilidad el número de células del cultivo control en ausencia de fármaco. Utilizando el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software) y partiendo de unos valores iniciales de los parámetros fijados arbitrariamente, cada conjunto de datos se ajusta a una curva dosis-respuesta sigmoideal, lo que permite obtener un valor de IC_{50} , que corresponde a la dosis de fármaco que reduce la viabilidad en un 50%.

1.5.4 Reducción de sales de tetrazolium: MTT

El estado reductor de las células proliferativas es superior al de las células no proliferativas y se puede medir utilizando aceptores de electrones como las sales de tetrazolium. Una de las más utilizadas es el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) que se basa en la formación de cristales de formazan de un color azul que son insolubles en agua después de la rotura de la sal de tetrazolium. La formación de los cristales sólo se puede producir en células viables mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Los cristales se solubilizan con un solvente orgánico y la densidad óptica de los cristales disueltos se puede medir espectrofotométricamente. El valor de absorbancia obtenido correlaciona de forma directa con el número de células metabólicamente activas presentes en el cultivo celular.

En este trabajo, se ha utilizado el ensayo con MTT en células MDCK II transfectadas y no transfectadas con MRP, CNT1 y pcDNA3.

Procedimiento

Las células se siembran a la confluencia adecuada, en nuestro caso, 15.000 células/cm², y se tratan con diferentes dosis del fármaco durante 90 minutos. A las 24, 48 o 72 horas después del tratamiento, se prepara una solución de 7,5 mg/ml de MTT en PBS. Hay que tener en cuenta que el MTT es fotosensible y se debe mantener envuelto en papel de aluminio a 4°C. Se mezcla la disolución de MTT con medio completo no estéril en una proporción 1:9. El medio de las células se aspira y se añaden 100 µl de la mezcla de MTT y medio. Se incuba de 30 minutos a 1 hora a 37°C. Al cabo de este tiempo se forma un precipitado violáceo que se encuentra en el interior de las células y que es visible a simple vista. Se aspira la placa y se añaden 100 µl de DMSO no estéril en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Se lee la absorbancia a 550 nm. Normalmente se dejan un par de columnas de la placa que no han sido tratadas con el fármaco como control, al que se le da el valor de 100% de viabilidad. El resto de muestras se relativiza a estos controles.

1.5.5 Transfecciones celulares

Las transfecciones celulares nos permiten expresar de forma transitoria o permanente un gen exógeno en una célula que no lo expresa o cuyo nivel de expresión es bajo. De esta forma, podemos estudiar proteínas que son difíciles de detectar en líneas celulares.

Bajo condiciones normales, las células de mamífero internalizan y expresan ADN exógeno con una eficiencia muy baja. Esto se debe mayoritariamente a la bicapa lipídica de la membrana celular. Se han desarrollado multitud de métodos para solucionar este problema y permitir el estudio de la expresión génica en cultivos celulares utilizando la transfección de ADN o ARN de una forma rutinaria. Dependiendo del método de transfección se pueden obtener diferentes niveles de expresión del gen de interés. Actualmente, los métodos más utilizados se pueden dividir en tres grupos dependiendo de la estrategia utilizada: 1) métodos basados en moléculas transportadoras, 2) métodos que liberan ácidos nucleicos directamente al citoplasma y 3) métodos que emplean vectores virales.

Los métodos utilizados en este trabajo se basan en la estrategia número 1, que utilizan el hecho que los ácidos nucleicos se encuentren cargados negativamente y pueden adherirse rápidamente a moléculas cargadas positivamente por interacción electrostática. Dependiendo del tipo de molécula transportadora que se utilice, este complejo es captado por las células y el ácido nucleico se libera en el citoplasma o en el núcleo.

Reactivos y material

- Medio de cultivo completo y medio sin suero.
- Sistema de transfección (Lipofectamina, Invitrogen o Metafectene, Biontex).
- Antibióticos de selección.

Procedimiento

Las células a transfectar se siembran en placas de 10 cm a una concentración de 1.000.000-2.000.000 de células por placa. A las ocho horas, cuando las células ya están adheridas se realiza el protocolo de transfección según la casa comercial: Se mezclan 400 µl de medio sin suero con 40 µl de liposomas y por otro lado 400 µl de medio sin suero con 10 µg de ADN. Estas mezclas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y después se juntan en un único tubo durante 25 minutos. Los 800 µl se añaden gota a gota sobre las células a transfectar a las que se les ha cambiado el medio previamente. Se deja toda la noche (12-15 horas) y al día siguiente las células se tripsinizan y se diluyen hasta repartirlas en 5 placas de 15 cm con el objetivo de obtener células aisladas. En este paso se añade el antibiótico de selección, geneticina en el caso de hCNT1 e higromicina en el caso de hMRP5. Las placas se dejan en el incubador una semana y se renueva el medio con el antibiótico de selección. A los pocos días se comienzan a distinguir las diferentes colonias. Una vez han crecido lo suficiente, las colonias se tripsinizan y se pasan a placas de mayor tamaño hasta obtener una cantidad suficiente para ser analizada.

Si lo que nos interesa es obtener transfectantes transitorios y no estables, no se le añade el antibiótico de selección ni se tripsinizan las células, sino que éstas se siembran a la confluencia adecuada y se realiza la transfección. Ésta es estable entre 16-72 horas dentro de las cuales se aconseja realizar el experimento.

2. EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

2.1 Animales

Para estos experimentos, se han utilizado ratas macho Wistar (250-275 g) que fueron mantenidas en las instalaciones del estabulario de la Universitat de Barcelona hasta su utilización. El mantenimiento y manipulación de los animales se ha realizado de manera que se ha intentado minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados y de acuerdo a la European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Igual que los animales de experimentación utilizados en los cultivos primarios de células neuronales, durante su estancia en el estabulario, éstos se han mantenido bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura constante de 20-22°C y siguiendo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los animales han tenido acceso a los piensos (Dieta de mantenimiento A04, Panlab) y al agua *ad libitum*.

2.2 Privación de sueño

En este experimento de privación de sueño se ha trabajado con nueve ratas machos que se han dividido en tres grupos: Control (C), privadas de sueño (SD) y recuperadas (SDR). Las tres primeras ratas (C) se sacrificaron por decapitación al inicio

del ciclo de oscuridad (20h). El resto de ratas fueron privadas de sueño durante 24 horas, empezando al inicio del ciclo de oscuridad (20h). Al final de este periodo (20h del día siguiente), tres ratas más fueron sacrificadas (SD) y a las otras tres se les permitió dormir durante 8 horas (SDR) antes de sacrificarlas (02 h). Se extrajeron los cerebros anteriores de cada rata y se procesaron para el aislamiento de ARN.

2.3 Ritmo circadiano

En este experimento de nivel de expresión de los transportadores de nucleósidos a lo largo de 24 horas, se han sacrificado dos ratas cada cuatro horas, empezando a las 20h. De esta manera se han obtenido 6 grupos de dos ratas a distintos tiempos. A las ratas sacrificadas por decapitación, se les ha extraído el cerebro del que se ha aislado el cerebro anterior, que se ha procesado para la obtención de ARN.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

3.1 OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES

Los lisados celulares se obtienen a partir de células en cultivo sembradas en placas individuales de 100 mm, en placas de 6 pocillos o bien a partir de la homogenización de muestras de tejidos.

Reactivos y material.

- Tampón PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.5 mM y NaHPO₄ 8.1 mM)
- Tampón de lisis para la obtención de lisados crudos a partir de células en cultivo
 - Tampón de lisis 1: Tris-HCl 10mM pH 7.4/ Triton x-100 0.5% (v/v).
 - Tampón de lisis 2: Fosfato de sodio 0.5mM, EDTA 0.1mM; pH 7.0
 - Tampón de lisis 3: Sacarosa 250 mM/ Hepes 25 mM/ EDTA 4mM.
- Inhibidores de proteasas: cocktail comercial “*Complete, MINI*” (Roche) a razón de una pastilla por cada 10 ml de tampón de extracción.
- Tubos de poliestireno de 10 ml (Nalgene)
- Politrón (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik).
- Rascadores estériles (Costar).
- Mortero.
- Nitrógeno líquido.
- Sonicador

3.1.1 Homogenización de muestras de tejidos

El tejido se trocea y se pesa el tejido. Se añade el tampón de homogenización en una relación 1/10 (p/v) al que previamente se le han añadido los inhibidores de proteasas. Las muestras se homogenizan en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y/o con un

politrón en tubos (Nalgene) de 10 ml. La homogenización con el politrón consta de tres ciclos de un minuto, donde cada ciclo consta de 30 segundos de homogenización y otros 30 segundos de descanso. Las paredes del tubo se tienen que mantener frías en un baño de hielo. La sonda del politrón se desmonta y se limpia con agua destilada y una mezcla de etanol y agua destilada varias veces.

Las suspensiones resultantes se centrifugan a baja velocidad (rotor SA600, Sorvall) con el objetivo de eliminar los restos de tejido mal disgregados que pueden alterar la determinación del contenido proteico de la muestra. Normalmente los homogenados de la mayoría de tejido se centrifugan a 10000 g durante 5 minutos a 4°C y los sobrenadantes pueden ser utilizados o bien directamente en un ensayo de *Western Blot* o bien almacenados a -20°C.

3.1.2 Extracción de proteínas a partir de cultivos de células en placa

En el caso de células, es necesario eliminar el medio de cultivo y lavar las placas un par de veces con PBS. Para proceder a la lisis, se añade un volumen variable del tampón suplementado, en función del diámetro de la placa y de la densidad celular (aproximadamente unos 150 µl por placa de 10 cm al 70% de confluencia). Las células se desenganchan con un rascador y la suspensión resultante se homogeniza con la ayuda de un agitador tipo *vortex*. Los lisados obtenidos se centrifugan 5 minutos a 5000 rpm en una minifuga, para precipitar posibles restos de material no homogenizado. Los sobrenadantes obtenidos pueden ser conservados a -20°C hasta el momento de su utilización. Este método de extracción ha sido utilizado en muestras que fueron procesadas para *western-blot* con los anticuerpos ENT1 y ENT2.

3.1.3 Obtención de homogenados crudos de membrana

Para la obtención de homogenados crudos de membrana, el medio de las células se elimina y se añade 1 ml de PBS a cada placa de 10 cm. Las células se desenganchan de la placa con ayuda de un rascador, se recogen y se centrifugan a 600 rpm durante 10 minutos para sedimentar las células. Este sedimento se puede guardar a -20°C o continuar con el proceso. Se añade 1 ml de tampón hipotónico (tampón de lisis 2) frío con inhibidores de proteasas y se resuspenden las células con ayuda de una pipeta automática. El homogenado se sonica 15 segundos al 40 % en hielo y se centrifuga a 14.000 rpm durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta y la fracción de proteínas de membrana se resuspende en el mismo tampón hipotónico con un volumen variable de entre 100-200µl por placa de 10 cm a un 80% de confluencia. Los homogenados se conservan a -20°C. Este protocolo se utilizó para la valoración de proteína mediante *western-blot* con el anticuerpo hCNT1.

3.2 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Reactivos y material

- Solución comercial "Bio-Rad protein Assay" (Bio-Rad)
- Solución acuosa al 0.1% de albúmina (BSA)
- Espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A)
- Cubetas de espectrofotómetro semimicro (Rubilabor)

Procedimiento

La valoración de la concentración de proteínas se realiza mediante el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de coloración de azul brillante de Coomassie respecto a diferentes concentraciones de proteína. En presencia de una disolución ácida, el máximo de absorbancia del reactivo pasa de 465 a 595 nm al unirse a estos sustratos.

El reactivo *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad) se diluye $\frac{1}{4}$ con agua destilada y se dispensa a razón de 1 ml por cubeta semimicro de plástico. En función del tipo y del estado de confluencia celular, se añade un volumen variable entre 5-10 μ l de muestra de lisado proteico y se homogeniza. Adicionalmente se prepara una recta patrón con albúmina al 0.1% a concentraciones de 0, 2, 5, 10 y 15 μ g/ μ l. Por extrapolación de los valores de absorbancia con la recta patrón de concentración conocida se puede calcular la concentración de la proteína de interés. La determinación de la absorbancia se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

3.3 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

La técnica de Western blot se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, además de proporcionar información acerca del tamaño de la proteína de interés. En esta tesis, la hemos utilizado para la puesta a punto de los diferentes anticuerpos contra los transportadores de nucleósidos y para el primer paso en la comprobación de la expresión de las proteínas de interés en la selección de clones transfectados estables (MRP5 y hCNT1).

Reactivos y material

- Geles de electroforesis
 - Gel concentrador: Permite que las proteínas se alineen. Contiene un 5% de acrilamida. Se prepara con 2.7 ml de agua destilada, 670 μ l de la mezcla comercial de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 500 μ l de Tris 1M a pH 6.8, 40 μ l de persulfato amónico al 10% en agua destilada, 40 μ l de SDS al 10% y 4 μ l de TEMED.
 - Gel separador: Permite dividir las proteínas según su tamaño. Normalmente contiene un 10% de acrilamida. Se prepara con 4 ml de agua destilada, 2.5 ml de la

mezcla comercial de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 2.5 µl de Tris 1.5M a pH 8.8, 100 µl de persulfato amónico al 10% en agua destilada, 100 µl de SDS al 10% y 4 µl de TEMED.

- Tampón de electroforesis : Tampón Tris base 250mM, glicina 1.91M, SDS 1% p./v. Se prepara concentrado diez veces y se mantiene a temperatura ambiente.

- Estándar de peso molecular: Se utiliza el estándar Rainbow RPN 800 (Amersham Biosciencias) con marcadores de pesos moleculares pre-teñidos entre 10 y 250 kDa.

- Tampón de carga: En nuestro caso se ha utilizado un tampón reductor y concentrado 5 veces. La composición para 100 ml es la siguiente: 32 ml de Tris-HCl 1M a pH 6.8, 10 g SDS, 10 mg de azul de bromofenol, 6 ml de 2-mercaptoetanol, 50 ml de glicerol y agua destilada hasta 100 ml. Una vez añadido el 2-mercaptoetanol se guarda congelado a -20°C, si no se puede mantener a temperatura ambiente.

- Agua destilada, minifuga y baño con termostato a 37 °C y/o placa calefactora para hervir las muestras

Procedimiento

(a) Preparación de muestras: Normalmente se cargan entre 10 y 50 µg de proteína dependiendo del anticuerpo y de la proteína a detectar, en un volumen que varía entre 20 y 40 µl. En un tubo de centrifugación de 1.5 ml se pipetea el volumen necesario de muestra para la cantidad de proteína que queramos cargar y se lleva hasta el volumen necesario con tampón de carga y agua destilada, con el objeto de pipetear el mismo volumen y la misma cantidad para todas las muestras. Las muestras se hierven 5 minutos y se hace un pulso en la minifuga para recuperar el volumen. Alternativamente, las muestras, dependiendo del anticuerpo utilizado, se incuban 30 minutos a 37°C en lugar de hervir.

(b) Preparación de los geles de acrilamida: se prepara el gel separador (10ml) como se ha indicado en el apartado de reactivos y materiales y se vierte entre los dos vidrios. Para que la superficie del gel quede plana, se añade agua destilada entre los vidrios. Una vez el gel ha polimerizado, se elimina el agua destilada, se vierte el gel concentrador (4 ml) y se introduce un peine para formar los pocillos que se retira una vez que el gel ha polimerizado. Seguidamente se monta el aparato de electroforesis y se llena la cubeta con tampón de electroforesis. Se cargan las muestras y el estándar de pesos moleculares con una jeringa Hamilton o una pipeta automática y se conecta el aparato a una fuente de voltaje. Se aplica una intensidad de 120 V durante una hora y media o hasta que el frente del gel llegue al extremo final.

3.4 WESTERN BLOTTING

Esta técnica permite transferir las proteínas que han quedado separadas según su peso molecular en el gel separador a una membrana donde quedarán retenidas por adsorción.

Reactivos y material

- Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v)
- Metanol
- Agua destilada
- Papel de filtro Whatman 3MM
- Membrana Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)
- Aparato de transferencia de geles a membranas. Sistema Mini Protean (Bio-Rad)

3.4.1 Procedimiento de transferencia de proteínas

Se recorta un rectángulo de membrana del mismo tamaño que el gel (5x9 cm) y se deja durante un minuto en metanol absoluto para activarla. Seguidamente se lava con agua destilada y se sumerge en tampón de transferencia. Además de la membrana de transferencia se cortan 6 trozos de papel Whatman también del mismo tamaño que el gel y se sumergen en tampón de transferencia. Se realiza el montaje de transferencia colocando tres papeles Whatman, el gel, la membrana y otros tres papeles Whatman entre dos esponjas, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana y asegurando una correcta transferencia. Este sándwich se coloca en la cubeta llena de tampón de transferencia, una barra magnética y una cubeta con hielo para evitar el calentamiento del tampón y del resto del montaje. Se conecta a una fuente de voltaje y se aplica una intensidad de 100 V durante 1 hora.

3.4.2 Inmunodetección

La inmunodetección se basa en un procedimiento en el que la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción de la peroxidasa de rábano que se encuentra ligada al anticuerpo secundario.

Reactivos y material

- Solución PBS-Tween 0.2%
- Solución de bloqueo y de dilución de anticuerpos: Leche desnatada en polvo al 10% (p/v) disuelta en PBS-Tween 0.2%.
- Agitador orbital
- Selladora
- Plástico para preparar las bolsas

Procedimiento

Una vez finalizada la transferencia y si se observa que el marcador de pesos moleculares se ha transferido correctamente del gel a la membrana, ésta se introduce en una bolsa de plástico, se sellan con la selladora tres de los cuatro lados y se introducen 10

ml de la solución de bloqueo. Se sella el cuarto lado de la bolsa y se deja incubando a 4°C toda la noche girando en un agitador orbital.

Una vez la membrana se ha bloqueado, ésta se incuba de la misma manera en otra bolsa de plástico donde se pipetea 5 ml del anticuerpo diluido y se deja durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Después de la incubación, se realizan tres lavados con PBS-tween de diez minutos cada uno.

El anticuerpo secundario es un anticuerpo dirigido contra el primario. Este anticuerpo es un anticuerpo de cabra dirigido contra conejo (Bio-Rad) y conjugado con peroxidasa de rábano y se prepara de la misma manera que el primario a una dilución 1/2000. La incubación en este caso también es de una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se lava de la misma manera que tras la incubación con el anticuerpo primario.

3.4.3 Revelado

El revelado mediante el método de ECL permite la visualización por detección luminiscente de antígenos específicos inmovilizados y conjugados con anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano.

Reactivos y material

- *Cassette* de exposición
- Films de alta sensibilidad (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech)
- Reactivo ECL (Biological Industries)

Procedimiento

La membrana se incuba un minuto con la solución de revelado. Esta solución es comercial y se prepara mezclando la solución 1 y la solución 2 en una proporción 1:1. Se seca la membrana del exceso de solución y se expone frente a papel fotográfico el tiempo necesario (habitualmente entre 20 segundos y 5 minutos) en un *cassete* en una habitación oscura.

3.5 PURIFICACIÓN DE IgGs POR COLUMNA DE PROTEÍNA A.

Se dispone de los sueros de los animales inmunizados (anticuerpos primarios) y de los no inmunizados (sueros pre-inmunes del mismo conejo que los anteriores antes de inmunizar al animal). Mediante la técnica descrita en este apartado, se purifica la fracción de IgG de los sueros utilizados. Este método se basa en la unión específica de estas IgG a la proteína A y aunque se trata de una purificación menos específica que la realizada mediante una columna de afinidad, no es necesario preparar una columna para cada anticuerpo.

Reactivos y material

- Proteína A – Sepharosa CL-4B (Pharmacia).
- Lana de vidrio.
- Columnas para purificación de anticuerpos (Pharmacia)
- Tampón Tris 100 mM, pH 8.
- Bolsas de diálisis para retención de moléculas de peso molecular igual o superior a 12.000 Daltons (Sigma).
- Solución EDTA 5mM - NaHCO₃ 200 mM.
- Aparato de autoclave.
- Azida sódica.
- Tampón Tris 1mM pH 9.
- Tampón Tris 100 mM.
- Tampón Tris 10 mM.
- Glicina 100 mM pH 2.7.

Procedimiento

La proteína A-sepharosa se resuspende con 2 ml de agua destilada (el rendimiento de unión es de 10-20 mg de IgG por cada ml de gel). Se pone un poco de lana de vidrio en la columna y se hace pasar la proteína A-sepharosa tres veces para asegurar su unión. Se equilibra la columna con tampón Tris 100 mM, pH 8 manteniendo un flujo constante de este tampón. La columna se guarda a 4 °C llena de agua destilada.

Las bolsas de diálisis se sumergen en una solución EDTA 5mM - NaHCO₃ 200 mM que se lleva a ebullición durante 5 minutos. Una vez pasado este tiempo se elimina la solución y se lavan las bolsas con agua MilliQ. Se hierven de nuevo las bolsas en la misma solución anterior y pasados los cinco minutos se vuelven a lavar con agua MilliQ. Se tira el agua del último lavado y se colocan las bolsas de diálisis en una botella autoclavable de cuello amplio que contenga agua MilliQ. Se autoclava y se añade azida sódica hasta una concentración final de 0.02%.

Todo el proceso de la cromatografía se realiza a 4 °C. El pH de la muestra (2 ml) se ajusta hasta 8.5 con Tris 1M pH 9 y se diluye tres veces con tampón Tris 100 mM. Se vacía la columna de agua destilada y se equilibra con 20 ml de Tris 100 mM. Se lee la absorbancia del eluido a 280 nm en una cubeta de cuarzo. Esta lectura corresponde a la columna limpia. Se añade la muestra ya diluida y se hace pasar tres veces a través de la columna para asegurarnos de que las IgGs se unen bien. Se lee el eluido de nuevo después de la última pasada. Esta lectura corresponde a todo aquello que no se ha unido a la columna. Se realizan dos lavados, el primero con 20 ml de Tris 100 mM y el segundo con 20 ml de Tris 10 mM. Se vuelve a leer el eluido después de los lavados. Esta lectura corresponde a la columna de nuevo limpia de manera que debe coincidir con la primera. En este punto, sólo las IgGs deben estar unidas a la columna.

Las IgGs se eluyen con 10 ml de Glicina pH 2.7 y se recogen en 10 fracciones de 1 ml en eppendorfs que contienen 50 μ l de Tris 1M pH 9. Se agita el eppendorf en cuanto caiga la muestra para estabilizar el pH. Las fracciones se valoran a 280 nm haciendo una dilución 1/20 en PBS. En las primeras cuatro o cinco fracciones se suele que observar un pico de elución de las IgG por lo que se seleccionan las fracciones que corresponden a este pico y se reúnen. Finalmente, se procede a la diálisis con las bolsas preparadas durante una noche frente a PBS pH 8.5. La fracción obtenida, se alícuota tras medir su concentración final y se conserva congelada.

3.6 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS CITOLÓGICAS

3.6.1 Preparaciones para criostato

Reactivos y material

- Paraformaldehído 16 % (solución stock). Esta solución stock se prepara siguiendo el siguiente protocolo:

Se disuelven 40 g de paraformaldehído en 200 ml de agua destilada agitando en una placa calefactora a 60°C bajo campana. Se añaden 0.06 μ l de NaOH 0.2M por cada miligramo de paraformaldehído. Se ajusta el pH a 7.4 con tiras reactivas y se enrasa hasta 250 ml con agua destilada. Se alícuota y se guarda congelado. A la hora de utilizar esta solución, se calienta en un baño a 60°C hasta que el paraformaldehído pase de una apariencia blanca a ser totalmente transparente y se diluye según la concentración necesaria en PBS, en nuestro caso entre el 2-4%.

- PBS.
- Sacarosa 30% en PBS.
- O.C.T. (Optimum cutting temperature compound medium)(Tissue-tek).
- Placa de cobre.
- Nieve carbónica.
- Papel de aluminio
- Cartulina

Procedimiento

Las muestras se cortan en bloques de forma piramidal y se fijan con paraformaldehído 3% en PBS de 6 a 24 horas, dependiendo del tamaño de la muestra, a 4 °C. La relación entre el fijador y la muestra ha de ser aproximadamente 40:1 (v:p). Una vez las muestras están fijadas, se lavan con PBS dos veces durante 10 minutos, se crioprotegen con sacarosa 30% y se dejan a 4°C hasta que se depositen en el fondo del tubo. Para congelarlas, se engloban en O.C.T. sobre rectángulos de cartulina en una placa de cobre mantenida sobre nieve carbónica. Las muestras estarán congeladas cuando el

color transparente del O.C.T. vire a blanco. Las muestras se conservan a -20°C hasta el momento de realizar los cortes.

En nuestro caso también se obtuvieron muestras congeladas procedentes del Institut Català d'Oncologia que no habían sido fijadas pero sí crioprotegidas, por lo que la fijación se realizó posteriormente sobre el portaobjetos.

3.6.2 Preparaciones embebidas en parafina

Reactivos y material

- Paraformaldehído 16%
- PBS.
- Etanol 70%.
- Etanol 90%.
- Etanol absoluto.
- Toluol
- Parafina
- Dispensador de parafina
- Estufa 65°C
- Moldes para bloques
- Papel absorbente o trapicel

Procedimiento

(a) Fijación: Las muestras se fijan con paraformaldehído 3% en PBS de 6 a 24 horas a 4°C , dependiendo del tamaño de la muestra. La relación entre el fijador y la muestra ha de ser aproximadamente 40:1 (v:v). Una vez fijadas se lavan con agua corriente de 3 a 6 horas.

(b) Deshidratación: La deshidratación se realiza mediante la incubación de la muestra en la siguiente secuencia de alcoholes: Un primer cambio de etanol 70% toda la noche y al día siguiente otro de 30 minutos; dos cambios de etanol 90% durante 2 horas y otros dos de etanol absoluto 1 hora; dos incubaciones con etanol y toluol a partes iguales (v:v) durante 15 minutos la primera y 30 minutos la segunda y finalmente incubar con toluol de 10 a 15 minutos sin dejar que la muestra llegue a transparentar. En el caso del riñón, 10 minutos parecen suficientes.

(c) Pre-inclusión: Se secan las muestras con trapicel para eliminar el exceso de toluol y se procede a realizar la pre-inclusión en parafina donde se dejan en la estufa a 65°C toda la noche. Al día siguiente se realiza un cambio con parafina nueva y se deja de 2 a 3 horas

(d) Bloques de parafina: Para realizar la inclusión en bloques, las muestras se colocan en los moldes y se llenan de parafina líquida a 60°C mediante el dispensador. Se colocan flotando en agua en un recipiente y se dejan enfriar hasta que la parafina se solidifica. Se sacan los moldes del agua y se dejan reposar hasta el día siguiente. Antes de cortar con el micrótopo se separa el bloque de parafina del molde.

3.6.3 Arrays de tejidos

Las matrices de tejidos o *tissue*-arrays consisten en bloques englobados en parafina o congelados que contienen desde decenas a varios cientos de diferentes muestras de tejidos que provienen de otros bloques de tejidos. Esto permite, tras el corte de secciones de estos nuevos bloques, montar portaobjetos que contengan, cada uno, multitud de muestras diferentes que se pueden analizar de una sola vez. Este sistema ofrece muchas ventajas como disponer de controles positivos y negativos internos, que la tinción sea homogénea y que se trate de un método eficiente y rápido.

(a) Pacientes y muestras de tumores ginecológicos

El grupo de Patología Molecular del CNIO, dirigido por el Dr. José Palacios, ha construido las matrices de tejidos y en colaboración con ellos se han realizado los estudios en tumores ginecológicos que se presentan en esta tesis. Para construir cada bloque de tejido del microarray, se utilizaron cilindros de cada muestra tumoral de 1mm de diámetro por duplicado de áreas previamente marcadas en el bloque donador. El array se construyó mediante un *tissue arrayer* manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).

Se seleccionaron un total de 288 biopsias de tejidos embebidos en parafina procedentes de tumores en diferentes estado FIGO y grado tumoral del Hospital La Paz (Madrid) y del Hospital Virgen del Camino (Pamplona). Las características particulares de grado y estado de los tumores son las siguientes: cancer endometrial 54.5% estado I, 29.5% estado II, and 16% estado III/IV, 49% grado 1, 32% grado 2 and 19% grado 3; cáncer de ovario, 43% estado I, 11% estado II, 42% estado III, and 4% estado IV, 31% grado 1, 24% grado 2, and 45% grado 3; cancer cervical, 60% estado I, 7% estado II, 33% estado III, 24% grado 1, 49% grado 2 and 27% grado 3.

Se han utilizado tres microarrays por separado. El primero contenía 88 casos de carcinoma endometrial (71 endometriode, 13 seroso y 4 célula clara; la edad oscilaba entre 30 y 89 años, con una media de 63 años). El segundo array contenía 90 casos de carcinoma de ovario (31 seroso, 14 mucinoso, 10 endometriode y 35 de célula clara; la edad oscilaba entre 24 a 88 años, con una media de 57 años). Se seleccionó un número elevado de carcinomas de célula clara debido a su agresividad e historia de tratamiento quimioterapéutico. Finalmente, el tercer array contenía 124 tejidos de cáncer de útero

cervical (67 adenocarcinomas y 57 carcinomas escamosos; la edad oscilaba entre 22 y 80 años de edad, con una media de 42 años).

(b) Pacientes y muestras de cáncer de mama

Las muestras de cáncer de mama que aparecen en este trabajo, fueron seleccionadas y procesadas en el Institute of Pathology, Kassel (Alemania) por la Dra. Gloeckner-Hofmann. Se seleccionaron noventa pacientes con cáncer de mama que comprendían una edad entre 28 y 72 años, con una media de 48 años de edad, que habían sido operadas entre los años 1992 y 1999 para posteriormente ser tratadas con CMF (Cyclophosphamide/methotrexate/5-FU) consistente en 6 ciclos hasta 1993, n=20 o 3 ciclos tras 1993, n=70. Cincuenta pacientes recibieron radioterapia local. Estas pacientes no se trataron por ablación. 25 pacientes fueron tratadas con hormonas (Tamoxifen n=20; GnRH-Analoga Goserelin, n=5 en las pacientes más jóvenes). Las pacientes fueron controladas durante 108 meses (58 ± 29 , media \pm SD). La supervivencia se registró respecto a la incidencia de recaídas locales y/o metástasis lejanas. El estado del tumor fue caracterizado según las guías internacionales (WHO 2002, UICC 1997). La mayoría de tumores fueron del tipo ductal (n=81) y todas las pacientes dieron su consentimiento.

3.6.4 Tinción hematoxilina-eosina

Se trata de una tinción que permite obtener información de la estructura tisular. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe de color azul aquellas estructuras ácidas como el núcleo de la célula. La eosina, en cambio, de carácter ácido, tiñe de color rosa o rojizo el citoplasma.

Reactivos y material

- Cortes desparafinados o congelados englobados en O.C.T.
- Hematoxilina de Mayer (Merck) diluida 1/5 en agua destilada.
- Agua corriente
- Eosina (Sigma).
- Etanol absoluto.
- Etanol 95%.
- Xileno.
- Medio de montaje permanente DPX (J.Sellas) o medio de montaje acuoso glicerol gelatina (Sigma)

Procedimiento

Los cortes que ya han sido previamente desparafinados e hidratados o las muestras englobadas en O.C.T se sumergen en hematoxilina durante 6-8 minutos y se lavan después 15 minutos bajo el agua del grifo para permitir el viraje de la hematoxilina

de un color rojizo a otro azulado. Este cambio de color es debido a las sales del agua. A continuación, se sumergen en eosina 6 minutos y se procede a la diferenciación y deshidratación con etanol absoluto durante 5 minutos tres veces, etanol 95% durante 5 minutos y xileno durante otros 5 minutos. Finalmente, se realiza el montaje con el medio permanente DPX. Si las muestras no se deshidratan, se puede utilizar un medio de montaje acuoso.

3.7 CORTE DE MUESTRAS

Las muestras se cortan en finas secciones (7-10 μm) mediante el micrótopo en el caso de muestras incluidas en parafina o mediante el criostato si se trata de muestras congeladas, que es necesario cortar a baja temperatura.

3.7.1 Criostato

Reactivos y material

- Portaobjetos gelatinizados:

Se prepara una solución de gelatina 1% y $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.05%. Los portaobjetos, que han sido desengrasados con etanol, se sumergen en la solución de gelatina fresca y se dejan secar en posición vertical durante 12, horas protegidos del polvo.

- Cuchilla para criostato (Reichert-Jung).
- Criostato (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E).
- Muestras congeladas y/o fijadas.

Procedimiento

Para utilizar el criostato es necesario atemperar el aparato y la cuchilla alrededor de una media hora antes de empezar a cortar. Una vez ha llegado a la temperatura adecuada, en este caso entre -20 y -22°C , se procede a cortar la muestra. Se intentan hacer cortes lo más finos posibles, entre 7 y 10 μm . Se recogen tres o cuatro secciones en cada portaobjeto gelatinizado dependiendo del tamaño de la muestra.

3.7.2 Micrótopo

Reactivos y material

- Portaobjetos con poli-L-lisina .

La solución de Poli-L-lisina 0.1% (Sigma) se diluye 1/10 en agua destilada. Los portaobjetos desengrasados se sumergen en esta solución y se dejan secar en posición vertical durante 12 horas.

- Micrótopo de rotación (Anglia Scientific).

- Cuchillas para micrótomo (Feather).
- Baño de agua a 40°C.
- Muestras incluídas en parafina.

Procedimiento

El proceso es muy parecido al del criostato pero se diferencia en que los cortes se realizan a temperatura ambiente. En este caso es más fácil realizar los cortes finos y lisos ya que las secciones se dejan flotando en un baño de agua a 40°C para que queden estiradas y sin arrugas. Las secciones se recogen con el portaobjetos y se dejan secar. Se han obtenido cortes de 7 µm.

3.8 INMUNOHISTOQUÍMICA

Pertenece a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten identificar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible cuando el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden conjugarse directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos secundarios o sustancias como biotina o proteína A. En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos de fluoresceína que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible.

3.8.1 Pre-tratamiento de muestras congeladas

Reactivos y material

- Estufa a 37°C
- Paraformaldehído 3%
- PBS.
- PBS-Gly 0.1M

Procedimiento

Se dejan los cortes congelados y englobados en O.C.T durante 30 minutos en una estufa a 37°C para que se adhieran al portaobjetos, pasado este tiempo se dejan atemperar diez minutos a temperatura ambiente. Si las preparaciones no han sido fijadas antes de congelarlas, es necesario incubarlas entonces 5 minutos con paraformaldehído al

3%. Se lavan con PBS tres veces durante 5 minutos. Tanto las muestras fijadas antes de la congelación como las fijadas después se hidratan 10 minutos en PBS-Glicina 0.1M.

3.8.2 Pre-tratamiento de los cortes en parafina

Reactivos y material

- Xileno.
- Etanol absoluto.
- Etanol 95%.
- Cestillas para portaobjetos.
- Vaporizador.
- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Tampón citrato pH 6 : Para 250 ml de tampón se necesitan 4.5 ml de ácido cítrico 0.1M, 20.5 ml de citrato sódico 0.1M y 200 ml de agua destilada. Se ajusta el pH con tiras reactivas o con el pHmetro hasta pH 6 con KOH 5N (unos 50 μ l) y se lleva hasta el volumen final de 250 ml con agua destilada.
- Cubeta Hellendhal de plástico resistente al calor.
- Placa calefactora

Procedimiento

(a) Adherencia de los cortes: Para favorecer la adherencia de las muestras al portaobjetos, éstas se incuban durante media hora a 60°C. De esta manera se impide, en parte, que las secciones se desprendan del cristal.

(b) Desparafinización e hidratación: El desparafinado e hidratación de las muestras se realiza con una sucesión de baños de 10 minutos en diferentes reactivos. Se introducen los portaobjetos en xileno, dos veces, luego en etanol absoluto, dos veces, en etanol al 95% también dos veces y el último paso en agua destilada.

(c) Desenmascaramiento del antígeno: Durante la fijación del tejido y principalmente cuando se utilizan fijadores cuyo mecanismo se basa en el entrecruzamiento proteico, puede ocurrir que los antígenos queden ocultos de manera que no puedan ser detectados. Para que sea posible la unión de antígeno y anticuerpo, es necesario realizar un tratamiento de desenmascaramiento del antígeno, mediante detergentes, enzimas proteolíticos o mediante calor. En nuestro caso se ha utilizado calor húmedo con un vaporizador. Se conecta la fuente de calor y se calienta el vaporizador con agua hasta que hierva. Mientras, se sumergen dos portaobjetos en el tampón citrato de desenmascaramiento del antígeno y se encaran de manera que las muestras queden enfrentadas y tocándose. A continuación, se colocan en una ranura de una cubeta Hellendhal o Coplin que contenga un pequeño volumen de tampón. Esta manera de

colocar los portaobjetos permite que el tampón suba por capilaridad entre ellos. Se tapa la cubeta y se coloca en la cesta de la olla que también se tapa y se mantiene hirviendo 20-25 minutos. Se retira de la fuente de calor y se deja atemperar como mínimo 20 minutos sin destapar la cubeta. Una vez pasado este tiempo se separan los portaobjetos con cuidado y se sumergen en agua destilada 1 minuto. (Figura 1)

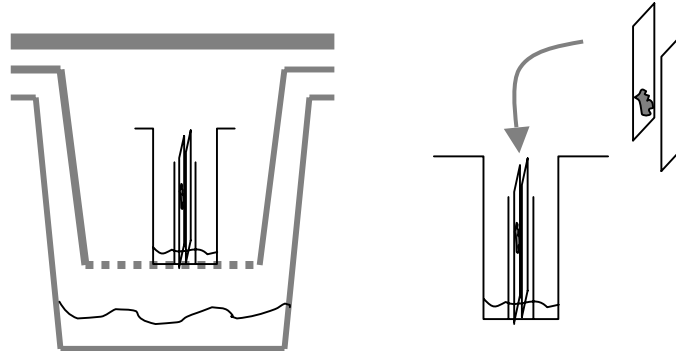


Figura 1: Esquema del proceso de colocación de las muestras antes de proceder al desenmascaramiento del antígeno.

3.8.3 Inmunolocalización enzimática con peroxidasa (LSAB)

Tras el pretratamiento de los cortes congelados o embebidos en parafina se puede proceder a la realización de la inmunolocalización

Reactivos y material

- Peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol.
- Solución de bloqueo formada por suero de cabra 5% y albúmina 1% en PBS.
- Anticuerpo primario (hCNT1, hCNT2, hENT1 y hENT2)
- Anticuerpo secundario "whole molecule" goat anti-rabbit biotinilado (Sigma).
- Conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano (Zymed).
- Tritón 0.1% en PBS.
- Aminoethyl carbazole substrate kit (Zymed, ver instrucciones del fabricante) o Diaminobenzidina (Sigma).
- Cubetas Hellendhal.
- Cámara húmeda.
- Hematoxilina de Mayer (Merck) diluída 1/5 con agua destilada.
- Avidina (Sigma) 50 µg/ml en PBS.
- Biotina (Sigma) 50 µg/ml en PBS.

Procedimiento (Figura 2)

(a) Bloqueo y permeabilización: Las preparaciones se incuban durante 30 minutos con H₂O₂ 0.3% en metanol absoluto o en PBS para bloquear la peroxidasa endógena del tejido. Una vez ha pasado este tiempo se lavan 3 veces con PBS, 5 minutos. A continuación, el tejido se permeabiliza durante 20 minutos con tritón 0.1% en PBS cuando el epítipo que queremos reconocer es intracelular. El siguiente paso consiste en los lavados, 3 veces con PBS durante 5 minutos. Durante estos lavados se prepara la solución de bloqueo y se incuban las preparaciones, 30 minutos en cámara húmeda. Se utilizan de 50 a 100 µl por portaobjeto.

En el caso de hCNT2b, parece necesario añadir un paso con una solución de 20 µg/ml de proteinasa k, incubando las muestras 15 minutos en la cámara húmeda tras los lavados posteriores al bloqueo de la peroxidasa endógena.

Si el tejido que se utiliza contiene biotina endógena (riñón, hígado o páncreas), es necesario incluir un bloqueo de 20 minutos con una solución de avidina de 50 µg/ml y luego con una solución de biotina de 50 µg/ml para que se una a los lugares libres de la avidina y así evitar falsos positivos. Este paso se realiza justo antes de la permeabilización.

(b) Anticuerpo primario: Se prepara el anticuerpo a la dilución deseada en solución de bloqueo diluida a la mitad con PBS y las preparaciones se incuban toda la noche a 4°C (cámara fría) en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizan los 3 lavados de 5 minutos con PBS teniendo en cuenta si se está trabajando con uno o varios anticuerpos. En caso que sean varios anticuerpos, es importante no usar la misma cubeta para estos lavados porque puede interferir en el resultado.

(c) Visualización: Se incuba el anticuerpo secundario a una dilución 1/800 en solución de bloqueo diluida a la mitad con PBS durante 30 minutos en cámara húmeda. Se lavan de nuevo las preparaciones tres veces con PBS durante 5 minutos y se aplica el conjugado HRP-Estreptavidina durante 30 minutos diluido 1/250 en PBS. Se vuelven a realizar los lavados y ya se pueden incubar las muestras con el sustrato de la peroxidasa, que puede ser aminoethyl carbazole o diaminobenzidina. Se deja actuar vigilando bajo el microscopio hasta que el color empiece a subir. La reacción se para con agua destilada. Se contrasta con hematoxilina de Mayer

(d) Montaje: Las preparaciones se pueden montar con un medio acuoso directamente o con un medio de montaje permanente. Si se utiliza el medio DPX permanente es necesario deshidratar las muestras previamente: Etanol absoluto, 5 minutos, tres veces; etanol 95%, 5 minutos; xileno, 5 minutos .

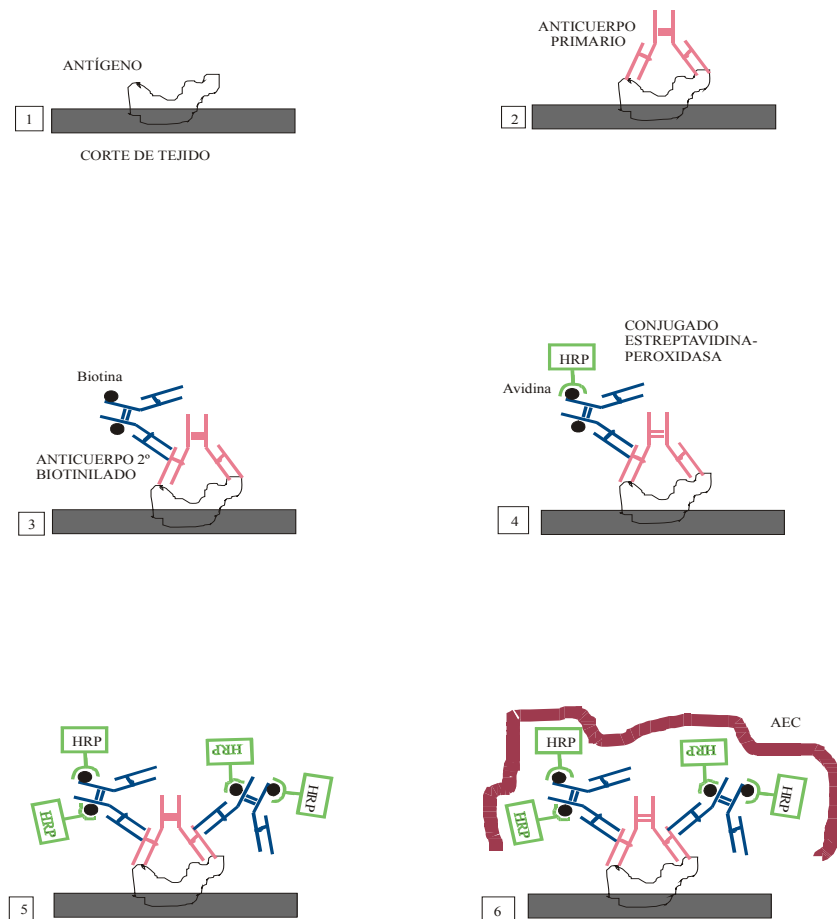


Figura 2 : Esquema de la técnica de LSAB (Labelled Streptavidin Biotinilated)

3.8.4 Inmunofluorescencia indirecta

Reactivos y material

- Cortes congelados y/o fijados.
- Paraformaldehído 3% en PBS: Se prepara fresco o a partir de una solución almacenada a -20°C al 16%.
- PBS-Glicina 0.1M.
- PBS-Glicina 0.1M-tritón 0.1%.
- Solución de bloqueo: PBS-Glicina 0.1M-Suero de cabra 5%-BSA 1%.
- Diluyente de anticuerpos primario y secundario: Se trata de la solución del bloqueo diluida a la mitad con PBS-Glicina 0.1M.
- Anticuerpo secundario-FITC (Boehringer) o AlexaFluor (Molecular Probes).
- Medio de montaje Immunofluore (ICN).

Procedimiento

(a) Bloqueo y permeabilización : La permeabilización dura 15 minutos y se realiza en una solución de tritón 0.1% en PBS-Glicina 0.1M. Después es necesario lavar con PBS-Glicina 0.1M 7 minutos, dos veces. Se procede al bloqueo de radicales inespecíficos en

cámara húmeda 20 minutos con la solución de bloqueo. Se utilizan de 50 a 100 μ l por portaobjetos. Sólo se permeabilizará en el caso de que se vaya a utilizar un anticuerpo contra un epítipo intracelular.

(b) Anticuerpo primario: Se incuba el anticuerpo primario diluido en cámara húmeda y se deja a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lava como en el paso anterior.

(c) Visualización: Se aplica el anticuerpo secundario diluido, 1/50 para el secundario unido a FITC o 1/300 para el anticuerpos de AlexaFluor, en la cámara húmeda 45 minutos a 37°C protegido de la luz. Se lavan de nuevo los portaobjetos y se aplica el medio para realizar el montaje de las preparaciones. Se dejan media hora a temperatura ambiente para que el medio se solidifique y se guardan a 4°C hasta el momento de mirar bajo el microscopio.

3.8.5 Inmunocitoquímica

Reactivos y material

- Cubre-objetos de 12 mm de vidrio.
- Poly-D-lisina (Sigma).
- PBS pH 7.4.
- Solución de fijación: paraformaldehído 2%.
- Anticuerpos primarios: hCNT1a y MRP5
- Anticuerpo secundario *goat-anti rabbit* conjugado a fluorocromo: AlexaFluor 488 (Molecular Probes)
- Medio de montaje específico para fluorescencia (ICN)

Procedimiento

Las células se siembran sobre cubre-objetos circulares en placas de 24 pocillos a los que se les ha añadido una solución de adhesión, como es la poli-D-lisina. Se dejan 2-3 días en crecimiento hasta que llegan a un 65-75% de confluencia.

Se lavan las células con PBS y se fijan con la solución de fijación durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se incuban en triton-x100 1% en PBS otros 30 minutos. Se vuelven a lavar las células dos veces con PBS (10 minutos por cada lavado) y se empieza la incubación con el anticuerpo primario, diluido en PBS, 90 minutos en un ambiente húmedo para evitar la evaporación. También es importante colocar las muestras sobre una superficie plana. El anticuerpo secundario unido al fluorocromo se incuba durante una hora, a temperatura ambiente y protegiéndolo de la luz.

Se realiza el montaje con un medio adecuado a muestras fluorescentes.

3.8.6 Inmunocompetencia

Se han realizado pruebas de desplazamiento de péptido tanto en la técnica de *Western* como en inmunohistoquímica

Reactivos y material

- Péptido con el que se inmunizó al animal para fabricar el anticuerpo primario de interés.
- Anticuerpo primario.
- -Diluyente (solución de bloqueo diluida a la mitad en el caso de Inmunohistoquímica o PBS-tween 0.2%-leche en polvo desnatada 5% para Western).
- Orbital.

Procedimiento

El anticuerpo primario se incubaba previamente con un exceso de péptido correspondiente al utilizado para inmunizar el animal durante toda la noche a temperatura ambiente girando en un orbital. A la mañana siguiente se utiliza esta mezcla como anticuerpo primario, ya sea en la técnica de inmunohistoquímica como en la de *Western-blot*. Si el anticuerpo reconoce el péptido, se unirá a él de manera que la señal que se debería observar en el tejido o membrana quedará disminuida o será inexistente. Es necesario realizar un control positivo en el que el anticuerpo se haya incubado toda la noche en el orbital pero sin añadir el péptido.

3.8.7 Captación de imágenes

Después de analizar las preparaciones procesadas por inmunolocalización enzimática en un microscopio óptico de campo claro (Zeiss), se fotografiaron con una cámara (Yashica 108) acoplada al microscopio óptico (Polyvar 2, Reichert-Jung) del Departament de Biologia Cel.lular de la Universitat de Barcelona. La película utilizada fue Elitechrome 160T, para diapositivas (Kodak).

Las imágenes por fluorescencia se obtuvieron en la Unitat de Microscòpia Confocal i Micromanipulació Cel.lular de los Serveis Científicotècnics de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona con un microscopio confocal (Leica, modelo TSS-NT) y un objetivo de 40X (PL-fluotar). Este modelo de microscopio lleva acoplado el software necesario para la captación y procesamiento de imágenes. También se ha utilizado el Servicio de Microscopía Confocal de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona en el Parc Científic de Barcelona, con un microscopio Olympus de fluorescencia invertida (IX, 70).

3.9 ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpo	Secuencia del epítipo / Posición	Western-blot	Inmunohistoquímica/ Inmunocitoquímica
hENT1a	S-N-S-Q-P-T-N-E-S-H-S (aa 271-281). Intracelular	Dilución 1/2000 Peso: ~ 50 kDa	Dil. 1/100 (IHQ/ P & C) 1/50 (ICC)
hENT2a	P-E-S-E-P-D-E-P-Q-K-P-G-K-P-S (aa 268-282). Intracelular	Dilución 1/2000 Peso: ~ 60 kDa	Dil. 1/125-/150 (IHQ/ P & C) 1/50 (ICC)
hCNT1a	R-E-A-F-Q-S-V-N-P-E-F-S-P-E-A-L-D (aa 621-637). Extracelular	Dilución 1/2000 Peso: ~ 60 kDa	Dil. 1/100 (IHQ/ P & C) 1/50 (ICC)
hCNT2b	Secuencia del anticuerpo pendiente de patente	Dilución 1/2000 Peso: ~ 70 kDa	Dil. 1/50 (IHC/ C)
AMF (MRP5)	A-M-F-A-A-A-E-N-K-V-A-V-K-G (aa 4466 –4479). Intracelular	Dilución 1/2000 Peso: ~ 180 kDa	Dil. 1/50 (ICC)

Tabla 2: Tabla resumen con los anticuerpos primarios utilizados

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN

4.1 PURIFICACIÓN DE ARN

Actualmente existen diferentes alternativas para la purificación de ARN a partir de cualquier tipo de muestras de partida. En nuestro grupo por ejemplo se están utilizando *kits* comerciales, con los que se obtienen buenos rendimientos y el tiempo empleado en ellos es mínimo. En estos momentos se usa el kit SV Total RNA Isolation System (Promega) basado en el método del tiocianato de guanidina (GTC) y el β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos celulares.

4.1.1 Purificación de ARN a partir de células en cultivo y tejidos.

El tiocianato de guanidina disgrega los complejos nucleoproteicos en asociación con el SDS, de manera que se aísla el ARN libre de proteínas. Una vez se han lisado las células, el ARN se precipita y se purifica mediante una columna de sílice a la que se une rápidamente. Tras diferentes lavados el ARN es eluido con agua libre de nucleasas y se guarda a -80°C . (Ver protocolo comercial).

Este *kit* incluye un paso de tratamiento del ARN con DNasa I con el fin de eliminar el ADN que pueda haber en la muestra.

4.1.2 Purificación de ARN mensajero a partir de ARN total

Para sintetizar la copia en DNA de los transcritos celulares se puede partir de ARN total o bien aislar primeramente los ARN mensajeros. Para ello se utilizó un *kit* de aislamiento de ARNm de Promega (*PolyA⁺ tract mRNA isolation kit*, Promega). Este *kit* aprovecha la presencia de la cola de poliadeninas de los ARN mensajeros para aislarlos

del ARN total. Se diluyen 100-300 μg de ARN total con agua-DEPC y se incuban a 65 °C durante 10 minutos para permitir la hibridación con una sonda de Oligo-dT biotinilado suministrada con el *kit*. Esta sonda se unirá a las colas poliA del ARNm de la muestra en un tampón SSC adecuado suministrado también con el *kit*. A partir de aquí, se incuban la mezcla de ARNm-biotinilado con unas bolas magnéticas (*magnetic beads*) del *kit* que están unidas a estreptavidina. De esta forma, y utilizando un soporte para tubos imantado, se separan las bolas magnéticas y se aíslan los ARNm del ARN total. Tras unos lavados con tampones de diferente fuerza iónica, finalmente se eluyen incubando con agua-DEPC. Típicamente, y considerando un rendimiento alto de este procedimiento se obtiene entre un 0,5-2% del ARN total, que correspondería a unos 1-3 μg de ARN mensajero.

4.1.3 Tratamiento del ARN con DNasa I

Algunos métodos de extracción de ARN no incluyen un tratamiento con DNasa I para eliminar el ADN contaminante de la muestra y más adelante inactivar la actividad de la enzima para evitar la degradación del ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de dicho ARN. En nuestro grupo de investigación se utiliza el *kit* comercial DNA-free (Ambion 1906). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realiza la digestión del ADN con enzima y a continuación, se elimina ésta de la preparación mediante una resina que une específicamente el enzima. Este tratamiento se ha utilizado en aquellas muestras de ARN que han sido cedidas.

4.2 VALORACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.2.1 Valoración espectrofotométrica

Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas lo presentan a 280 nm. La relación entre las absorbancias a las dos longitudes de onda de una muestra nos da cierta información respecto a su estado y posible contaminación con proteínas. La relación óptima DO 260/DO 280 se encuentra entre 1.8-2.0. Si es superior, puede haber un problema de degradación, mientras que si es inferior, nos indica una presencia excesiva de proteínas en la muestra.

Procedimiento

La muestra se diluye entre 0.5 y 3 μl en un mínimo de 400 μl de agua tratada con DEPC. Es necesario utilizar cubetas de cuarzo para espectrofotómetro. Tras realizar la lectura a las diferentes longitudes de onda, se realizan los cálculos pertinentes detallados a continuación:

$$[\text{ácido nucleico}] = \frac{\text{DO (260)}}{\varepsilon} \cdot \frac{(400 + x) \mu\text{l en la cubeta}}{X \mu\text{l muestra}}$$

ARN y ADN de cadena sencilla: $\varepsilon = 25 \mu\text{l}/\mu\text{g}$

ADN de cadena doble: $\varepsilon = 20 \mu\text{l}/\mu\text{g}$

4.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DESNATURALIZANTE

Reactivos y material

- Tampón MOPS 10X: Formado por MOPS 0.2 M, acetato sódico anhidro 80mM y EDTA 10 mM (a partir de EDTA 0.5 M, pH 8). Se disuelven todos los componentes en agua bidestilada y se ajusta el pH a 7 con NaOH.
- Tampón de carga desnaturizante: Formado por formamida desionizada al 48%, formaldehído al 6.4%, azul de bromofenol al 0.53%, MOPS 1X y bromuro de etilidio ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
- Agarosa (FMC Bioproducts).
- Formaldehído.
- Cubeta de electroforesis.
- Tubos eppendorf.
- Baño a 65°C .
- Transiluminador de UV TFW-20M (Vilber Lourmat).

Procedimiento

Para la preparación de 30 ml de gel de agarosa al 1% se disuelven 0.3 g de agarosa en 21.4 ml de agua bidestilada y 3 ml de MOPS 10X. Se disuelve la agarosa calentando la solución vigilando en todo momento que no hierva para no reducir el volumen de agua. Cuando disminuya la temperatura de la solución se añaden 5.6 ml de formaldehído y se aplica la mezcla sobre el soporte, colocando el peine para formar los pocillos. El formaldehído es altamente irritante para las mucosas y es necesario trabajar en una campana de extracción de gases.

Las muestras se preparan añadiendo 3 veces su volumen de tampón de carga desnaturizante. En un gel de agarosa al 1% es aconsejable no cargar más de $20 \mu\text{g}$ de ARN, ya que es probable que se pierda resolución. Una vez preparadas las muestras, se incuban durante 5 minutos a 65°C para desnaturizar el ARN, se enfrían en hielo y se cargan en el gel. La electroforesis se corre a 50 V durante 4-5 horas, transcurridas las cuales se observa el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se realiza una fotografía.

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y TÉCNICAS AFINES

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de ADN. Se utilizan dos oligonucleótidos que se hibridan con cada una de las dos cadenas complementarias y que flanquean la secuencia a amplificar.

La PCR se divide en tres partes, la primera se trata de la separación entre las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, por lo que son necesarias temperaturas altas cercanas al punto de ebullición. En un segundo paso, los cebadores se unen a su región específica a temperaturas más bajas. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa.

5.1 SÍNTESIS DE ADN_c (RETROTRANSCRIPCIÓN)

Para poder analizar la expresión de un determinado gen, es útil la detección de su ARN transcrito, pero debido a que el ARN no sirve como molde para la PCR, es necesario realizar la retrotranscripción y obtener el ADN_c, lo que se puede hacer a partir tanto de ARN total como de ARN mensajero. En nuestro caso la mayor parte de veces se ha partido de ARN total, aunque la utilización de ARN mensajero permite la amplificación de ARNs mensajeros poco abundantes, ya que la proporción de ARNm respecto al ARN total es de un 1%.

La retrotranscripción se lleva a cabo con un enzima, la retrotranscriptasa reversa, generalmente la del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) o del virus de la mieloblastosis aviar (AMV).

Procedimiento

Se parte de 1µg de ARN total utilizando oligo (dT) como *primers* de la reacción de la M-MLV. Primero se produce una desnaturalización del ARN a 65°C durante 5 minutos, tras los que el ARN se guarda inmediatamente en hielo y se añade la mezcla de reacción que contiene el tampón del enzima, DTT 10mM, dNTPs 500µM cada uno, 10 µg/ml de *random hexamer* (Promega), 0.75 U/ µl de RNAsin (Promega) y 7.2 U/µl de M-MLVRT (Gibco). La reacción se incuba 2 horas a 37°C y se acaba con la inactivación del enzima durante 10 minutos a 65°C.

5.2 PCR A TIEMPO REAL.

La PCR a tiempo real permite medir por fluorescencia la cantidad de ADN sintetizada en cada momento durante la amplificación, de forma que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble cadena. En este caso, la optimización del proceso es rápida y fácil, aunque los agentes intercalantes tienen una baja especificidad, ya que se unen a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores.

En cuanto a sondas específicas, unas de las más utilizadas son las sondas de hidrólisis. Se trata de oligonucleótidos marcados con un marcador fluorescente o *reporter* en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un reductor de la emisión o *quencher* en 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Durante la amplificación de ADN, la sonda se hibrida con la cadena complementaria y al desplazarse a lo largo de la cadena, la polimerasa hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, separando *reporter* de *quencher* y emitiéndose la fluorescencia que se capta por el lector. En cada ciclo, se libera progresivamente más moléculas del donador o *quencher*, produciéndose un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido. Una de las ventajas de este tipo de tecnología es la necesidad de una hibridación específica entre la sonda y la diana para generar señal fluorescente, por lo que la amplificación específica producida por uniones incorrectas de los *primers* o la formación de dímeros de *primers* no genera ningún tipo de señal.

En nuestro caso se ha utilizado la tecnología TaqMan que se basa en sondas fluorogénicas o de hidrólisis, ya que es muy específica y proporciona unos resultados más fiables y reproducibles si se compara con otros sistemas. Esta tecnología la comercializa la casa Applied Biosystems y se puede visitar su página web donde se puede encontrar soporte técnico acerca de esta técnica (<http://www.appliedbiosystems.com/techsupp/>),.

5.2.1 Cuantificación relativa de la expresión génica

En este trabajo, se ha utilizado la PCR a tiempo real para comparar la expresión de los genes de los transportadores de nucleósidos en las siguientes condiciones experimentales.

- (a) Análisis de la expresión de las isoformas de rata de los transportadores de nucleósidos en diferentes regiones del cerebro de rata.
- (b) Comparación de la expresión de los transportadores de nucleósidos en una situación donde los niveles de adenosina extracelular se encuentran elevados como es la privación prolongada de sueño.
- (c) Estudio del ritmo circadiano de los transportadores de nucleósidos a lo largo de 24 h en corteza cerebral de rata.

La cuantificación relativa nos permite comparar los niveles de expresión de un mismo gen en diferentes muestras, pero no podemos comparar los diferentes niveles de expresión entre genes distintos. De esta manera, las reacciones son caracterizadas por el ciclo en el que la amplificación de un determinado producto se detecta por primera vez, y

no por la cantidad de producto acumulado después de un determinado número de ciclos. Cuantas más copias de una determinada diana existan al inicio, antes se detectará un incremento significativo en la fluorescencia observada. En los primeros ciclos de la PCR prácticamente no se observan cambios en la fluorescencia, este hecho define la línea base (*baseline*) para la representación. Un incremento de la fluorescencia por encima de esta línea indica la detección de producto de PCR acumulado. Es posible fijar un valor umbral (*threshold*) de fluorescencia por encima de la línea base. El parámetro denominado C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*) se define como el ciclo de fluorescencia en el que se supera el umbral fijado. La cuantificación relativa se basa en la comparación de este valor de C_T mediante un control endógeno que sirve de elemento normalizador y que debe mantenerse invariable entre las diferentes condiciones experimentales. En este trabajo se ha utilizado el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La relación entre el C_T de la diana y el del control endógeno proporciona un valor de C_T normalizado (C_{TN}) de la diana, que sirve para estandarizar la cantidad de ARN o ADN añadido a la reacción. A una de las muestras se le asigna el valor de 1 o de 100 (porcentaje) respecto a la que se compararan el resto de resultados.

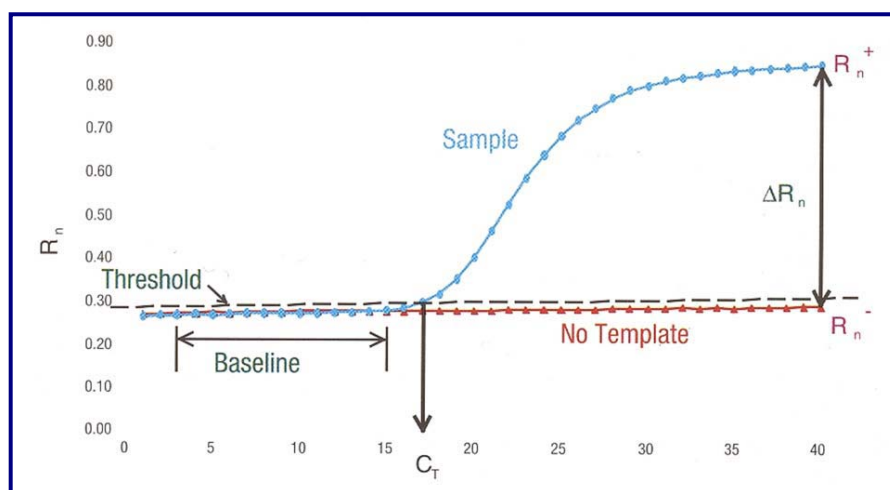


Figura 3 : Representación de una amplificación única modelo, mostrando los términos

5.2.2 Validación del método comparativo

En primer lugar, antes de utilizar el método de cuantificación relativa por comparación de C_T , es necesario realizar un experimento de validación con el objetivo de demostrar que las eficiencias de amplificación de la diana y el control endógeno son equivalentes. Uno de los métodos más sensibles consiste en estudiar la manera en que varía la diferencia entre los C_T de la diana y del control endógeno (ΔC_T) con la dilución del molde (en nuestro caso el cDNA). Es necesario que las rectas estándar correspondientes

a ambos amplicones sean paralelas, entendiendo como recta estándar aquella que relaciona la concentración inicial del molde con el valor de C_T . Si las eficiencias de los dos sistemas no fueran equivalentes no sería posible realizar una comparación de este tipo y sería necesario trabajar con rectas estándar en cada placa.

5.2.3 Diseño de primers y sonda

El diseño de los primers y sondas necesarios para realizar los ensayos TaqMan se realizan mediante el software Primer Express de Applied Biosystems. Una vez diseñados es necesario optimizar sus concentraciones mediante la realización de un banco de concentraciones. La siguiente tabla muestra los diferentes juegos de primers y sondas utilizados en los ensayos de PCR a Tiempo Real (se indican los residuos entre los que se une cada elemento, indicando la cadena a la que se une en función de si el orden es creciente o decreciente).

Actualmente, la casa comercial Applied Biosystems cuenta con un gran banco de ensayos ya puestos a punto que permiten comprar los oligonucleótidos y la sonda de multitud de genes, de manera que se ahorra tiempo en el diseño de éstos. Otra opción reciente para aquellos genes que no se encuentran en el banco de ensayos permite enviar a la casa comercial la secuencia de la región de interés del gen que se va a estudiar y el servicio técnico diseña los oligos y la sonda más apropiada.

5.2.4 Sondas y oligonucleótidos utilizados

Gen	Código Genebank	Sonda	Oligonucleótidos
rENT1	NM031684	807-789 accccagattcctctctc	Fw765-785 gtgaaggagaggagccaagag Rv 836-817 tgtggcgggtagagagttg
rENT2	NM031738	Assay on demand*	Assay on demand*
rCNT2	AY029302	805-831atcctcatcctcttgctgctcaaa	Fw: 785-803 tgcgggaatctgcatgtt Rv: 854-836 ctccagctcaccgcactgt
rGAPDH	M17701	70-89 cgcctggtcaccagggtgc	Fw: 30-50 gatggtgaaggctggtgtaa Rv:115-91 aaatgtccactttgtcacaagagaa

* Sonda y oligonucleótidos comprados a Applied Biosystems

Tabla 3: Resumen de las sondas y oligonucleótidos utilizados en la PCR a tiempo real.

5.2.5 Parámetros universales de PCR a Tiempo Real.

Reactivos y material

Todos los materiales y reactivos utilizados son de Applied Biosystems.

- Aparato ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.
- Sondas TaqMan y primers.
- TaqMan Universal PCR Master Mix.
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Pack.

- ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate with Barcode

Procedimiento

Los ensayos diseñados utilizando el software y los reactivos Master Mix de Applied Biosystems pueden ser realizados utilizando unos parámetros de PCR universales.

Pre-PCR	Tiempo	Temperatura
ÁmpErase UNG	2 min.	50°C
<i>Hot Start</i>	10 min.	95°C

PCR (40 ciclos)	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	15 seg.	95°C
Unión/Extensión	1 min.	60°C

5.2.6 Análisis de resultados por el método de comparación de C_T .

En los siguientes puntos se detalla como se han calculado los resultados de los experimentos realizados mediante esta técnica:

- 1.- Calcular la C_T media de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (a cada placa se dispone cada muestra por duplicado).
- 2.- Calcular ΔC_T como C_T diana - C_T control endógeno.
- 3.- El error estándar (SE) de ΔC_T puede ser calculado como $\sqrt{(SE_{diana})^2 + (SE_{control})^2}$, siempre que el número de réplicas sea el mismo para los dos elementos.
- 4.- Calcular $\Delta \Delta C_T$ como ΔC_T muestra - ΔC_T muestra control.
- 5.- El cálculo de $\Delta \Delta C_T$ no es más que la substracción de una constante arbitraria, por lo que la SE de $\Delta \Delta C_T$ es la misma que la de ΔC_T diana.
- 6.- Calcular $2^{-\Delta \Delta C_T}$ que representa la expresión de la muestra relativa a la muestra control escogida. La SE es la misma que la de $\Delta \Delta C_T$.

6. OTRAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

6.1 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

La técnica de transformación de bacterias con plásmidos consiste en introducir fragmentos de ADN en la bacteria donde se replicarán y así aumentar el número de copias para conseguir su aislamiento y purificación. El método utilizado para la transformación es el choque térmico, donde el ADN se mezcla con las bacterias en frío y se someten a un cambio de temperatura rápido a calor para seguir con una incubación de nuevo en hielo.

Es necesario que las bacterias sean competentes para que sean capaces de incorporar el ADN y aunque existen casas comerciales que venden las células competentes, en nuestro laboratorio utilizamos bacterias competentes preparadas por nosotros. Todo el material y reactivos utilizados ha de ser estéril.

Reactivos y material

- Stock de bacterias (*E.coli*) congeladas en glicerol 20 % a -80 °C.
- Medio líquido Luria-Broth (LB): Formado por 1 % triptona (p/v), 0,5 % extracto de levadura (p/v), un 1 % de NaCl (p/v) y NaOH 2 mM, comprobado el pH a 7,0. Autoclavar y almacenar a 4 °C.
- Mechero Bunsen para trabajar en un ambiente de esterilidad.
- Medio SOB: Formado por triptona al 2 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v), NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM. Se autoclava y se suplementa con 2,5 mL de MgCl₂·6H₂O 2 M y 2,5 mL de MgSO₄·7H₂O 2 M, previamente esterilizados por filtración.
- Medio RF1 estéril por filtración (1 L): RbCl 12 g; MnCl₂·4H₂O 9,9 g; KAc 1M pH 7,5 30 mL; CaCl₂ 1,11 g; Glicerol 150 g. Se ajusta el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M.
- Medio RF2 estéril por filtración (1 L): MOPS 0,5 M pH 6,8 20 mL; RbCl 1,2 g; CaCl₂ 8,32 g; Glicerol 172,4 mL al 87% (Merk). Ajustar el pH a 6,8 con ácido acético 0,2M.

Procedimiento

Se inoculan células *Escherichia coli*, en nuestro caso, de la cepa *XL1-Blue*, en 3 ml de medio líquido LB a partir del stock congelado con glicerol a -80 °C en tubos de polipropileno rascando con un punta de pipeta estéril. Se dejan agitando a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se inocula 1 ml del medio anterior en 50 ml de medio SOB en un *Erlenmeyer* estéril de 500 ml y se mantiene en agitación a 37 °C midiendo la absorbancia a 550 nm cada 15 ó 30 minutos para controlar el crecimiento a partir de las dos primeras horas. Cuando la densidad óptica alcanza valores entre 0,375-0,4 es el momento en el que el cultivo está en crecimiento exponencial y óptimo para hacer células competentes. Si la densidad óptica supera el valor de 0.4, las células dejan de ser aptas para hacerlas competentes. Una vez alcanzado el crecimiento exponencial se dejan en hielo 15 minutos y se centrifugan a 3.000 r.p.m. (Sorvall SA-600) 15 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento de células suavemente en un tercio del volumen inicial con medio RF1. Se incuban los tubos 20 minutos en hielo, aunque se trata de un tiempo variable, que depende de la cepa de bacterias. Se sedimentan las células de nuevo con otra centrifugación de 15 minutos a 3.000 r.p.m. a 4 °C y se descarta el sobrenadante para resuspender el precipitado en un volumen 1/12,5 del valor inicial con medio RF2. Se incuban finalmente en hielo 15 minutos más y ya están

listas para congelar o bien para utilizarlas y ser transformadas. Para congelarlas, se alicuotan en tubos *Eppendorf* en volúmenes pequeños, de 100-200 μ l y se congelan directamente en N₂ líquido para luego almacenar a -80 °C. No es necesario añadir glicerol pues el medio RF2 ya lo contiene.

6.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.

Reactivos y material

- Bacterias competentes.
- Plásmido o producto de ligación.
- Glucosa 1M.
- Medio SOB.
- Medio SOC: Formado por SOB autoclavado y suplementado con glucosa estéril a una concentración final 20 mM.
- Medio LB líquido.
- Placas de agar / LB con ampicilina (50-100 μ g/ml): Si se quiere tener medio sólido para placas de petri, se añaden al medio LB líquido un 1,5 % de agar bacteriológico americano (Pronadisa) (p/v), se autoclava la solución final, se deja enfriar hasta 60 °C y se añade el antibiótico. El medio obtenido de esta manera se vuelca en las placas y se deja solidificar, conservándolas a 4 °C boca abajo hasta su utilización.

Procedimiento

Se utilizan unos 50 μ l de células competentes por cada reacción que se pasan del congelador de -80°C a un baño de hielo a 4°C y se dejan 10 minutos una vez que se han repartido en los tubos de crecimiento de bacterias. Si se quiere transformar un plásmido, es necesario una cantidad de 50-200 ng, pero si lo que se quiere hacer es transformar con un producto de ligación, se hace con la totalidad de la reacción, entre 5-10 μ l. Se mezclan las células y el ADN y se dejan en hielo entre 10 y 30 minutos. Para el choque térmico, los tubos se incuban a 42°C durante 45-50 segundos. Inmediatamente los tubos se transfieren al baño de hielo durante 2 minutos, entonces se añaden 900 μ l de medio SOC y se incuban en agitación a 37°C durante 1 hora. La siembra se realiza en medio sólido agar-LB con el antibiótico de selección para aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido.

6.3 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

Los protocolos de aislamiento de DNA plasmídico pueden clasificarse en relación a la cantidad y pureza del plásmido que se obtiene. Cuando el protocolo es rápido pero se obtiene una cantidad pequeña e impura de plásmido se denomina mini-prep. Cuando intentamos obtener una cantidad mayor, mucho más pura, midi o maxi-prep. La mini-prep

se utiliza para comprobar la existencia del plásmido en nuestra bacteria, o para comprobar la clonación de un inserto determinado en una colonia producto de una ligación. Se inocula un tubo con 3 mL de medio LB estéril con bacterias de la colonia, o de un *stock* en glicerol utilizando un asa de siembra o una punta de pipeta estéril y se deja crecer durante la noche en agitación a 37 °C. Por la mañana se sigue el protocolo de mini-prep de Promega (www.promega.com) a partir de 1 mL de crecimiento y se guarda a 4 °C el resto, que utilizaremos como inóculo para un crecimiento mayor con el fin de purificar una cantidad mayor de plásmido y de mayor pureza utilizando el *kit* de midi-maxi prep de QIAGEN (www.qiagen.com), tras comprobar la identidad del plásmido utilizando el ADN de la mini-prep. Los protocolos de Qiagen y Promega se basan en resuspender el precipitado de bacterias, una lisis alcalina y una neutralización en la que se descartan los restos celulares, seguidas por la unión a una resina de intercambio aniónico bajo condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica. El ARN, proteínas y otras impurezas desaparecen en lavados de diversa fuerza iónica y pH adecuados, seguidos de una elución. Aparte, para obtener el plásmido concentrado se precipita el ADN con isopropanol y luego se resuspende en agua o tampón Tris-EDTA pH=8,0 en un volumen adecuado.

6.4 DIGESTIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA CON ENDONUCLEASAS

La digestión con enzimas de restricción permite la escisión de fragmentos de ADN necesaria para las técnicas de ADN recombinante. En esta tesis ha sido utilizada para el subclonaje y comprobación de las sondas de rENT1 y rCNT2 utilizadas en la técnica de hibridación *in situ* en *pBluescript I* y *pGEM*. Además, el corte con enzimas de digestión permite la identificación de plásmidos, una vez conocida su secuencia y/o el mapa de restricción.

Reactivos y material

- Enzima de restricción (2-12 U/ μ l) de Roche, Promega o New England Biolabs.
- Tampón de reacción 10X.
- Incubador a 37 °C.

Procedimiento

En todos los casos se han seguido los protocolos suministrados por las casas comerciales. De manera general, una reacción de digestión necesita de un ADN en una cantidad variable dependiendo de la finalidad de la digestión. Si lo que se quiere es únicamente comprobar la identidad del plásmido, basta con 5 μ l de producto de una mini-prep para poder visualizar las bandas resultantes de la digestión. Si lo que se quiere es escindir un fragmento para posteriormente ligarlo en otro vector, o bien linealizar, abrir un vector para recibir un fragmento, entonces se debe utilizar una cantidad mayor, entre 5-10 μ g de plásmido. El volumen en el que tenemos estas cantidades es importante, e

intentaremos minimizarlo. Las enzimas de restricción se suministran con un tampón propio normalmente concentrado diez veces, que se diluye con agua destilada. La enzima viene en una solución de almacenaje que contiene glicerol, y se conserva a -20 °C. Es importante mantener la enzima siempre a una temperatura cercana a -20 °C para conservar al máximo su actividad. La concentración a la que vienen las enzimas se suele dar en UI (Unidad Internacional). Se define una UI como la cantidad de enzima necesaria para digerir un microgramo de DNA a 37 °C en una hora. Se ajustará, pues, el volumen de enzima en base al tipo de reacción que estemos realizando. Para digerir 5 µl provenientes de una mini-prep, por tanto una cantidad no mayor de 1 µg de DNA, bastará con 1-3 unidades durante una hora. Normalmente se realiza una incubación de 1 hora a 37°C, aunque hay enzimas que requieren otras temperaturas.

6.5 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS

6.5.1 Ligación de fragmentos con DNA ligasa.

La DNA ligasa es una enzima que utilizando ATP como fuente de energía cataliza la unión de dos cadenas de ADN entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de los nucleótidos adyacentes en extremos protuberantes o romos resultado de la digestión con enzimas de restricción. Se recomienda probar diferentes relaciones molares entre vector e inserto, 1:1, 1:3, 1:10 e incluso a veces 3:1. Para calcular las cantidades de inserto y vector teniendo en cuenta los diferentes tamaños se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb del inserto}}{\text{kb del vector}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Reactivos y Material

- T4 DNA ligasa 3U/µl (Promega).
- Tampón de ligación 10X (Promega).
- Termociclador MiniCycler (MJ Research) a 16 °C.
- Fosfatasa alcalina (CIAP) Amersham Pharmacia Biotech.
- *Kit de purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa: "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN).*

Procedimiento

El procedimiento de ligación es muy sencillo. Es aconsejable reducir al máximo el volumen de reacción, siendo muy recomendado trabajar con volúmenes menores de 10 µl. Para ello es conveniente trabajar con un material de partida muy concentrado. Dependiendo del tipo de extremos a ligar, el tiempo y temperatura de reacción puede variar entre, temperatura ambiente durante 3 horas, 4 °C durante toda la noche o 15 °C de

4 a 18 horas. Se debe tener en consideración que la temperatura óptima para la ligación surge de un equilibrio entre la temperatura óptima para la actividad de la DNA ligasa (25 °C) y la temperatura necesaria para asegurarse el *annealing* o hibridación de los extremos de los fragmentos, que puede variar con la longitud y la composición de los extremos libres. Los extremos más cortos requieren temperaturas más bajas y por tanto, por regla general requieren tiempos de ligación más largos. La ligación de extremos romos es eficiente normalmente en temperaturas de 15-20 °C 4-18 horas, mientras que los extremos cohesivos se ligan eficientemente a temperatura ambiente (22 °C) unas 3 horas o a 4 °C durante toda una noche.

Si los extremos del vector a ligar han sido digeridos con la misma enzima, se debe evitar la posible recircularización del vector ya que daría falsos positivos al transformar las bacterias competentes. Con este fin, se trata el vector digerido con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP*). De esta manera se eliminan los grupos fosfato de los extremos 5'-P de los fragmentos de DNA haciendo imposible la religación del vector. Una vez digerido el vector es aconsejable purificarlo por extracción de la banda en un gel de agarosa utilizando el *Kit* de extracción de bandas de QIAGEN. Una vez purificado el vector digerido se incuba con 20 unidades de fosfatasa alcalina (CIAP), en un volumen de 20 µl utilizando el tampón 10x suministrado junto a la enzima, durante 1,5 horas a 37 °C. Para finalizar se incuba 25 minutos en un baño a 65 °C para inactivar la enzima.

6.5.2 Ligación de fragmentos con el kit pGEM-T Easy vector System

El vector pGEM-T Easy se trata de un vector que viene junto a un *kit* (pGEM-T Easy vector system, Promega) con el que es muy sencillo ligar fragmentos. Normalmente se utiliza como sistema intermedio entre la restricción con endonucleasas del fragmento que nos interesa y la ligación con DNA ligasa en un vector de expresión. Se puede omitir este paso, pero si un fragmento de ADN lo tenemos incluido en el vector pGEM, esto nos permitirá amplificarlo fácilmente sin necesidad de empezar desde el principio con una PCR, en el caso que la ligación en el vector de expresión no sea satisfactoria y la tengamos que repetir varias veces.

Este vector circular viene escindido por un punto de forma que no es necesario linealizarlo. Contiene un promotor de la ARN polimerasa T7 y otro de la SP6 y una región *multicloning*.

Se hace un pulso de centrifuga del vector antes de pipetear y también se vortea el tampón 2x de ligación rápida que viene con el *kit*. Para calcular la cantidad de inserto se aplica la misma fórmula que en el apartado anterior. En este caso, se parte de 50 ng de vector, que se mezclan con el tampón de ligación, el producto de PCR o fragmento a ligar, la T4 ligasa y agua hasta un volumen de 10 µl totales. Esta reacción se deja actuar toda la noche a 16°C.

6.6 ELECTROFORESIS EN GEL NO DESNATURALIZANTE DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN se separan en función de su tamaño utilizando la electroforesis en geles de agarosa. Normalmente se usa una concentración de agarosa del 1 % en tampón TAE 1X o TBE 0,5X.

Reactivos y material

- Agarosa *SeaKem* (FMC *BioProducts*) al 1 % en tampón TAE o TBE.
- Tampón TAE 1X a partir de una solución 10X formada por: Tris Base 0,4 M, ácido acético glacial 0,2 M, EDTA 0,01 M.
- Tampón TBE 0,5X a partir de una solución 5X formada por: Tris Base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M.
- *Loading dye* ND, formado por: Sacarosa (SIGMA) 40 % (p/v), Cianol Xileno 0,25 %, azul de bromofenol 0,25 %. Se guarda a 4 °C.
- Aparato de electroforesis horizontal de GIBCO-BRL, mini-gel modelo 200, y H5 conectadas a fuente de voltaje.
- Bromuro de Etidio solución acuosa 10 mg/mL (SIGMA).
- Transiluminador de UV TFX-20M (Vilber Lourmat).

Procedimiento

Para un mini-gel, se disuelven 0,3 g de agarosa en 30 ml de tampón TAE 1X o TBE 0,5X y se calienta en un *Erlenmeyer* de 250 ml con un microondas 2 minutos, evitando que hierva y procurando que la agarosa se disuelva completamente. Se deja enfriar unos segundos bajo el grifo y se añade 1,5 µl de bromuro de etidio a 10 mg/mL. Previamente se prepara la cubeta porta-geles con un peine adecuado para introducir las muestras. El bromuro de etidio es altamente cancerígeno y será manipulado con sumo cuidado y siempre utilizando guantes. Las puntas y tubos se desechan y el *Erlenmeyer* se lava inmediatamente con abundante agua. Se deja polimerizar la agarosa en la cubeta porta-geles con el peine durante 20-30 minutos. Posteriormente se extrae el peine dejando a la vista los pocillos donde se cargaran las muestras. Mientras polimeriza la agarosa, se preparan las muestras añadiéndoles un 10 % de volumen de *Loading Dye* ND y se hace una centrifugación rápida para mezclarlos. Una vez ha polimerizado, se cubre la cubeta con el gel con tampón TAE 1x o TBE 0,5x y se procede a cargar las muestras en los pocillos con una micro-pipeta. Se conecta la cubeta a una fuente de voltaje. Se selecciona el voltaje 50-75 para TAE y hasta 150 para TBE y se deja correr el tiempo suficiente para que los colorantes del *Loading Dye* ND se separen lo suficiente. Para ver las bandas se transilumina el gel con luz ultravioleta y el DNA producirá una fluorescencia rosada ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases de los nucleótidos.

6.7 SECUENCIACIÓN POR PCR

La técnica de secuenciación utilizada es la secuenciación por PCR. Utilizando cebadores específicos, sea en la dirección 5'-3' (*Forward*), como en la dirección 3'-5' (*Reverse*) se sintetizan fragmentos de todas las longitudes en el sentido 5'-3' tanto de una cadena como de su complementaria gracias a los terminadores del *kit ABIPRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* de *Applied Biosystems*. Luego las secuencias son resueltas utilizando un secuenciador de DNA por electroforesis capilar *ABIPRISM 3700* de *Applied Biosystems* en el servicio de secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona (Parc Científic).

Reactivos y material

- *ABIPRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 2.0* (*Applied BioSystems*).
- Termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).
- Tubos de PCR (Perkin Elmer).
- Oligonucleótidos específicos sintetizados por *Roche Molecular Biology*.
- Etanol 95% y 70%.

Procedimiento

Primero se añade el ADN molde sobre el que se va a secuenciar que suele ser un plásmido circular que provenga de una mini o midi-prep o de un producto de PCR. La cantidad de plásmido varía entre 200 y 500 ng. Se añaden 3,2 pmol de oligonucleótido, 8 µl de *Reaction Mix* del *Kit* de secuenciación y una cantidad suficiente de agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. El programa de secuenciación en el termociclador es el siguiente: 96 °C 10 segundos; 50 °C 5 segundos; 60 °C 4 minutos y repetir 25 ciclos. A la reacción se añaden 16 µl de agua destilada y 64 µl de etanol 95%, se agita y se deja precipitar el ADN entre 15 minutos y 24 horas a temperatura ambiente. Se centrifuga 20 minutos en una minifuga al máximo y se elimina con cuidado el sobrenadante sin perturbar el precipitado de ADN ya que puede ser invisible. Se añaden 250 µl de etanol 70 % para lavar el precipitado y se agita brevemente. Se vuelve a centrifugar 10 minutos en la minifuga, se elimina el sobrenadante y se deja evaporar el resto del etanol. Las muestras así purificadas son analizadas por el servicio de secuenciación de los servicios científico-técnicos de la Universitat de Barcelona.

7. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FRÍAS SOBRE CORTES FLOTANTES

La hibridación *in situ* es una técnica que se basa en la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos como filtros de nylon o nitrocelulosa, en

solución (*in vitro*) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (*in situ*). Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulaciones especiales, no las hemos elegido para este trabajo. Las técnicas colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas. Las que hemos utilizado en nuestro caso se trata de sondas marcadas con digoxigenina, aunque hay de otros tipos, como las marcadas con biotina. En nuestro caso hemos realizado la hibridación *in situ* sobre cortes flotantes, basándonos en técnicas ya descritas (Alcántara y col., 1998; Alvarez-Dolado y col., 1999).

7.1 PREPARACIÓN DE LAS SONDAS FRÍAS

Básicamente existen cuatro tipos de sondas que se utilizan en la técnica de la hibridación *in situ*, como son las sondas de oligonucleótidos, las de cadena sencilla de ADN, las de doble cadena de ADN y las de ARN, llamadas sondas de ARNc o ribosondas. Son estas últimas con las que hemos trabajado, ya que los híbridos ARN-ARN son muy termoestables y son resistentes a la digestión con RNasas, lo que permite la posibilidad de tratar las muestras, tras la hibridación, con RNasa, de forma que se reduce el ruido de fondo de las preparaciones.

7.1.1 Sondas utilizadas

Tras amplificar las sondas por RT-PCR, éstas fueron clonadas en pBluescript y/o pGEM para su transcripción.

Sonda	Tamaño	Oligonucleótidos	Posición
rCNT2	1716 pb	Fw: 5'-gctcaaaggccagagcagctgac-3'	746-769
		Rv: 5'-cccttagctacattcccacc-3'	2462-2443
rENT1	1370 pb	Fw: 5'-tgacaaccagtcaccagcctcag-3'	6-28
		Rv: 5'-cacaagtgccctaacaagaagga-3'	1374-1351

7.1.2 Transcripción con NTPs marcados con digoxigenina.

Para realizar esta transcripción, se parte de ADN molde que en nuestro caso consiste en los vectores más los insertos de rCNT2 y rENT1, que han sido previamente linealizados con enzimas de restricción, de forma que para cada muestra se obtienen 2 ADN, uno correspondiente a la sonda *antisentido* que será la que hibridará con el ARN del tejido y una segunda sonda *sentido*, que servirá de control negativo.

Reactivos y material:

- ADN molde (en nuestro caso de rCNT2 y rENT1 en vector linealizados)
- NTPs marcados con digoxigenina (Roche)
- Kit de transcripción *in vitro* (Ambion)
- RNA guard (Roche)

- Acetato potásico 3M
- Etanol absoluto y al 70%
- EDTA 0.5M
- Agua DEPC

Procedimiento

Se realiza una mezcla que contiene de 1 a 2 µg del ADN molde (en nuestro caso vector e inserto linealizados), 2 µl de la mezcla de NTPs marcados con digoxigenina, 2µl del tampón de transcripción y 2 µl de la ARN polimerasa, los dos últimos del kit de transcripción *in vitro*. Se añade agua DEPC hasta un volumen final de 20 µl. Se agita suavemente y se añade 1 µl de RNA guard. Esta mezcla se deja de 2 a 4 horas a 37°C y entonces se añaden 2 µl de DNasa I del kit de transcripción y se incuba durante 15 minutos. Para parar la reacción se añade una décima parte del volumen total de acetato potásico 3M, 3 volúmenes de etanol absoluto y 1 µl de EDTA 0.5M. Se deja como mínimo 30 minutos a -20 °C para provocar la precipitación del ARN. Se centrifuga 15 minutos a 4°C y se aspira. Se lava con unos 100µl de etanol al 70%, se centrifuga 5 minutos y se aspira de nuevo. Finalmente se resuspende en Agua DEPC y se deja 10 minutos a 70°C. Se guarda congelado.

7.1.3 Valoración por Dot-blot

Reactivos y material

- Patrón de ARN.
- Membrana de nylon cargada positivamente.
- PBS.
- PBS-BSA 4%.
- Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina.
- NTMT: Para 50 ml: 1 ml de NaCl 5M, 5 ml de Tris-HCl 1M pH 9.5, 2.5 ml de MgCl₂ 1M y 50 µl de Tween 20.
- Solución de revelado: Por cada ml de NTMT : 4.4 µl de NBT y 3.3 µl de BCIP.
- Muestra de ARN a valorar con NTPs marcados con digoxigenina.

Procedimiento

Se parte de un ARN de concentración conocida y se realiza una serie de diluciones. En nuestro caso 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/10000. El patrón se encuentra a una concentración inicial de 100 ng/µl. Las muestras de ARN marcadas con digoxigenina-UTP se diluyen de la misma manera. Se deposita 1 µl de cada dilución en una membrana de nylon cargada positivamente y se marca con un lápiz. Es aconsejable fijar el ARN a la membrana mediante UV durante 1 minuto (*Gene linker*) La membrana se

sumerge en PBS y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente con PBS-BSA 4%. Tras esta incubación, se añade anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) a una dilución 1/5000 en PBS y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizan dos primeros lavados con PBS de 15 minutos cada uno y uno último con NTMT durante 2 minutos. Por último se añade la solución de revelado y se controla el tiempo tomando como referencia las muestras del patrón. Normalmente media hora es suficiente. La concentración de las muestras se determina comparando la intensidad de la marca con la del patrón.

7.2 PERFUSIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Reactivos y material

- Paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2-7.4)
- Solución de crioprotección : PFA 4%-sacarosa 30% en PFA 4%
- Isopentano o hielo seco
- Criostato para cortes flotantes

Procedimiento

El animal se anestesia y perfunde con PFA 4% en tampón fosfato durante 40-50 minutos mediante una cánula introducida por el corazón y sujeta mediante unos fórceps, de esta manera se fija el cerebro y el resto de órganos en menor grado. Pasado este tiempo se le extrae el cerebro con cuidado y se realiza una post-fijación de 24-48 horas en el mismo fijador. Para realizar la crioprotección, los cerebros se dejan 48 horas en la solución de crioprotección y se congelan con isopentano o hielo seco. Los cerebros se guardan a -80°C hasta el momento de cortar.

Los cerebros se cortan mediante un criostato a un grosor de 30 μm en el caso de rata adulta y de un grosor superior cuando se trabaja con animales más jóvenes.

7.3 PRE-TRATAMIENTOS

Reactivos y material:

- PBS.
- Etanol al 50%, 70%, 90% y absoluto.
- PBS-tritón 0.5%.
- H_2O_2 al 2% en PBS.
- PBS-Tween al 0.1 % (PBS-Tw).
- HCl 0.2N.
- Trietanolamina o TEA 0.1M pH 8.0.
- Paraformaldehído al 4% en PBS.

- Glicina 2 mg/ml en PBS-Tw

Procedimiento:

Los tejidos ya cortados se pasan a los botes adecuados con ayuda de una pipeta *pasteur* de plástico estéril. Hay que tener en cuenta que durante todo el proceso los botes se mantienen en agitación constante y que hay que evitar que los cortes de tejido se adhieran a las paredes del tubo.

El primer paso consiste en realizar dos lavados con PBS de cinco minutos tras los que se realizan incubaciones rápidas en etanol a distintas concentraciones de la siguiente manera: etanol 50% 5 minutos, 70 % 5 minutos, 90% 30 segundos, absoluto 30 segundos, 90% 30 segundos, 70% 5 minutos, y etanol al 50% 5 minutos. Después es necesario permeabilizar los tejidos con PBS-tritón 0.5% durante 10 minutos y bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 2% en PBS. Tras incubar las preparaciones con HCl 0.2N durante 10 minutos, las muestras se lavan en PBS-Tw tres veces durante cinco minutos. La incubación con TEA se realiza añadiendo 10 ml en cada bote para luego añadir 25 µl de anhídrido acético agitando ligeramente cada vez. Finalmente los cerebros cortados se incuban en PFA 4% diez minutos y en glicina en PBS-Tw.

7.4 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Reactivos y material:

- Tampón de hibridación:
 - Formamida desionizada 50%
 - Dextran sulfato 10%
 - Denhardt's 5x
 - NaCl 0.62M
 - EDTA 10mM (a partir de una solución concentrada 0.5M pH 8.0)
 - PIPES-Na 10mM (a partir de una solución concentrada 1M pH 6.8)
 - SDS 0.2%
 - Agua

Este tampón se precalienta a 60°C y se añade ssDNA (250 µg/ml) y ytrNA (250 µg/ml) previamente desnaturalizados a 80°C, 5 minutos y enfriar rápidamente en hielo.

- Paraformaldehído 4%.
- Agua mQ autoclavada.
- Sonda marcada con digoxigenina.
- SSC.
- Formamida.
- TEN:

- Tris-HCl 10 mM pH 7.5
- NaCl 0.5M
- EDTA 5mM
- Rnasa A.
- Sodim N-lauroyl-sarcosinato

Procedimiento:

(a) Prehibridación: Esta parte del protocolo se realiza en placas de 12 pocillos. El primer paso consiste en añadir 1.5 ml de tampón de hibridación, que contenga ya el ssDNA y el yRNA, precalentado. Si hay mucha cantidad de tejido se aconseja añadir 2 ml. El tejido se pasa de los botes a los pocillos, mediante un pincel que previamente haya estado en solución de paraformaldehído 4% y luego bien aclarado con agua mQ autoclavada. Se tiene que intentar pasar el mínimo de líquido posible a cada pocillo. Con el fin de evitar la evaporación se envuelve la placa con papel de aluminio. Se deja en agitación 3 horas a 60°C.

(b) Hibridación: La sonda se desnaturaliza a 80°C, 5 minutos y se enfría en hielo. Si la cantidad de sonda es muy pequeña se puede desnaturalizar con el tampón de hibridación. Se necesita un volumen de sonda para que se encuentre en el pocillo a una concentración de 500-1000 ng/ml. La sonda se mezcla con un volumen de tampón de hibridación que permita luego añadir un volumen de unos 50-100 µl para que se reparta bien en el pocillo. Se añade y se remueve bien con la misma punta. Se deja incubar de 14 a 16 horas a 60°C en agitación.

(c) Lavados: El tejido se vuelve a pasar a los botes con una pipeta pasteur de plástico estéril. Se incuba con 5x SSC+ 50% formamida dos veces durante media hora y después se hacen tres cambios de 5 minutos con 2x SSC. Se precalienta el TEN a 37°C y se añade la Rnasa A a 20µg/ml y se deja una hora a 37°C. Finalmente se realizan varios lavados, los primeros cuatro de 30 minutos con 0.5x SSC+ 50% formamida y los dos últimos de 30 minutos con 0.1x SSC + 0.5% de N-lauril-sarcosinato.

7.5 INMUNO Y REVELADO

Reactivos y material:

- | | |
|----------------------|--------------------|
| - TBST 10x: | <u>Para 100 ml</u> |
| ▪ NaCl 5M | 27 ml |
| ▪ KCl 0.3M | 10 ml |
| ▪ Tris-HCl 1M pH 7.5 | 25 ml |
| ▪ Tween 20 | 1 ml |

Diluir 1x y añadir levamisole a 0.48g/l el mismo día de uso.

- Solución de bloqueo: *Normal Goat Serum* (NGS) 10% en TBST 1x

- Anticuerpo anti-digoxigenina (Dako) preabsorbido 1/2000:
Para la preabsorción del anticuerpo se necesita polvo de cerebro, que se obtiene a partir de la homogenización de embriones y algunos cerebros de distintas edades en un volumen mínimo de PBS, entonces se añaden 4 volúmenes de acetona enfriada en hielo, se mezcla y se incuba en hielo durante 30 minutos. Se centrifuga a 10.000 g durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante. El precipitado se lava con acetona enfriada y se centrifuga de nuevo. El sedimento se seca y se pulveriza sobre un trozo de papel de filtro para dejar secar al aire. Se guarda a 4°C. Para la preabsorción del anticuerpo se necesita por cada μl de anticuerpo: 3 mg de polvo de cerebro con 0.5 ml de TBST 1x. Se deja 30 minutos a 70°C y se enfría en hielo. Se añaden 5 μl de NGS y 1 μl de antidigoxigenina y se deja agitando suavemente al menos 1 hora a 4°C. Se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm para tubos de centrífuga de 15 ml u 8000 rpm para eppendorfs. Se recoge el sobrenadante al que se le añade TBST con un 1% de NGS hasta un volumen final de 2 ml.
- NTMT: Para 1 l: 20 ml de NaCl 5M, 100 ml de Tris-HCl 1M pH 9.5, 50 ml de MgCl_2 1M y 1ml de Tween 20 y 0.48 g de levamisole.
- Solución de revelado: Por cada ml de NTMT : 4.4 μl de NBT y 3.3 μl de BCIP.
- Medio de montaje acuoso (Mowiol).

Procedimiento:

Se realizan tres lavados de 5 minutos con TBST 1x y se procede a realizar el bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente, con unos 4 ml de solución de bloqueo por cada bote. El anticuerpo secundario preabsorbido se añade a una dilución 1/2000 durante toda la noche a 4°C. El último día se dejan los botes que se atemperen 1 hora a temperatura ambiente y se realizan 7 lavados de 10 minutos con TBST 1x y otros tres lavados con NTMT. En el momento de revelar, se prepara la solución de revelado protegiéndola de la luz. Se incuba en la oscuridad controlando el revelado al cabo de una hora y si entonces no se aprecia ningún marcaje se puede subir la temperatura de revelado a 30-37°C. Se cambia el revelador cada 2-3 horas. Para parar la reacción se deja en PBS-tween durante 1 hora como mínimo durante la que se han de realizar varios cambios. En este estado se puede dejar un máximo de dos días antes de montar con el medio de montaje sin deshidratar.

8. TRANSPORTE DE NUCLEÓSIDOS EN MONOCAPA

El método utilizado para la medida de la captación de nucleósidos en cultivos celulares en monocapa es una variación del ya descrito por Quamme y colaboradores (Quamme *et al.*, 1989) y adaptado por nuestro grupo (Ruiz-Montasell y col., 1994), consistente en la incubación de las células en presencia de una concentración conocida de

substrato no radioactivo (frío) y de una proporción adecuada del mismo substrato marcado radioactivamente (caliente). La radioactividad incorporada por las células, indicativa de la cantidad de substrato total captada por ellas, se analiza por parada del transporte y posterior lisis y solubilización en un líquido de centelleo.

Reactivos y material:

- Medio de transporte con sodio: NaCl 137,0 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Hepes 10,0 mM.; pH 7,4.
- Medio de transporte con colina o NMDG: La composición es idéntica a la del medio anterior, si bien se substituye el cloruro de sodio por cloruro de colina o N-metil-d-glucosamina (NMDG) 137,0 mM.; pH a 7,4.
- Solución de parada: NaCl 137,0 mM, Hepes 10,0 mM; pH 7,4
- Medio de transporte: Substrato frío 1 μM; 1-3 μCi/mL; Inhibidores 1 mM; NBTI .
- Tritón-X100 al 0,5 % NaOH 100 mM.
- Líquido de centelleo Ecolite (ICN)
- Contador de radioactividad β (Packard 1500 Tri-Carb).
- *Stocks* de citidina, guanosina, uridina, hipoxantina y NBTI, a concentraciones 1-100 mM.
- Nucleósidos y análogos marcados con tritio (Moravek y Amersham)

8.1 MEDIOS DE TRANSPORTE

Para la medida de la captación de uridina, citidina o guanosina, se suplementan paralelamente los medios con sodio y/o colina/NMDG con el nucleósido o análogo no radioactivo, de manera que la concentración final de substrato (frío más caliente) se sitúe en el rango de la Km del transportador. La proporción entre ambos vendrá pues determinada por la actividad específica del substrato radioactivo. Hará falta disponer de suficiente marcaje para que pueda ser detectado, y la cantidad de substrato restante hasta obtener la concentración deseada se completará con substrato frío. En los ensayos de transporte realizados en este trabajo se ha utilizado medio colina cuando se ha trabajado con la línea MDCK II, mientras que en las líneas neuronales el medio libre de sodio utilizado ha sido el NMDG, ya que la colina interfería en la actividad de transporte de estas líneas y cultivos primarios.

Para la realización del ensayo, los medios sodio y/o colina/NMDG así como los medios de transporte han de encontrarse atemperados y para ello se mantienen a 37 °C en un baño termostatzado, mientras que el medio de parada del transporte se mantiene en hielo a 4 °C.

8.2 ENSAYO DE TRANSPORTE.

Las células se lavan dos veces con medio sodio, colina o NMDG para eliminar restos de medio de cultivo. Se elimina al máximo el medio y se procede a la incubación con medio de transporte durante el tiempo determinado (1 minuto normalmente). A continuación se elimina rápidamente el medio de transporte y se procede con dos lavados rápidos con solución de parada que se ha mantenido en hielo. De esta manera el transporte se detiene por bajada brusca de la temperatura y por dilución. Se pueden congelar las células en este momento o proceder inmediatamente añadiendo la solución de lisis Tritón X-100 al 0,5 % NaOH 100 mM. Se mantiene 20-30 minutos en agitación vigorosa a temperatura ambiente. Posteriormente se extrae una alícuota para medir la concentración de proteína en la muestra y el resto se utiliza para medir la radioactividad en presencia de líquido de centelleo. La valoración de proteína es importante, ya que el número de células por pocillo puede no ser el mismo y la diferencia se tiene que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados y poder comparar los resultados del transporte.

8.3 CÁLCULOS

Las medidas realizadas en presencia de sodio son indicativas de la tasa total de transporte que incluye el transporte dependiente de sodio y el transporte independiente de sodio. Las medidas determinadas en el medio con colina proporcionan exclusivamente el transporte independiente de sodio. Así pues, la componente dependiente de sodio se determina como la diferencia entre las dos medidas. La componente independiente de sodio sensible a NBTI (**es**) se determina restando la tasa de transporte en medio conteniendo NBTI de la tasa de transporte en medio libre de sodio únicamente. El resto se considera transporte independiente de sodio insensible a NBTI (**ei**).

Los datos se muestran en picomoles de sustrato por miligramo de proteína y por minuto de transporte. Para realizar el cálculo se incluye siempre en el ensayo una alícuota del medio de transporte para calcular la actividad específica (A.E.) del medio, que se da en dpm/pmol (desintegraciones por minuto por picomol). Sabiendo las concentraciones de sustrato y la actividad específica, así como la concentración de proteína el cálculo resulta en:

$$\text{Actividad (pmol/mg prot)} = \text{DPMmuestra} \times 10^3 / (\text{A.E.} \times \text{Vol.muestra} \times [\text{proteína } \mu\text{g}/\mu\text{L}])$$

Es importante tener en cuenta que las medidas de transporte se deben realizar en condiciones de velocidad inicial. Esto implica la caracterización previa del sistema, mediante el seguimiento a lo largo del tiempo de la incorporación de una concentración fija de sustrato. Una vez definido el intervalo de tiempo en el que la captación de soluto se mantiene lineal en función del tiempo, se está en condiciones de poder escoger el tiempo de trabajo.

9. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS TRANSFECTADAS.

Reactivos y material

- PBS.
- Tampón hipotónico: Fosfato de sodio 0.5mM, EDTA 0.1mM; pH 7.0.
- Solución de sacarosa al 38% en 5 mM Hepes-KOH, pH 7,4.
- Tampón de incubación: sacarosa 250mM en Tris-HCl 10mM; pH 7.4.
- Homogenizador Potter-Elvehjen
- Homogenizador Dounce manual vidrio/vidrio y vidrio/teflón.

Procedimiento:

Se siembran unas 3×10^9 células, lo que significa alrededor de 80 placas de cultivo de 15 cm. Las células se hacen saltar de la placa con ayuda de un raspador y se vierten sobre tubos de centrifugación. Las placas se lavan con PBS una vez para recoger las células que han podido quedar en la placa. Se centrifugan 10 minutos a 1200 g a 4°C. El sobrenadante se descarta y el sedimento se resuspende en PBS frío y se vuelve a centrifugar como en el paso anterior. Este paso se repite otra vez. Los sedimentos se lavan con 200 ml de tampón hipotónico con inhibidores de proteasas y se deja en agitación muy suave durante una hora y media a 4°C. Pasado este tiempo se comprueba bajo el microscopio con una pequeña alícuota con azul de tripán si las células están rotas, si es así se continúa el proceso y si no se deja un rato más en agitación. El lisado se centrifuga 45 minutos a 100.000 g a 4°C y el precipitado se resuspende en 20-30 ml de tampón hipotónico y se homogeniza con un homogenizador Potter-Elvehjen a 500 r.p.m, 2 golpes / minuto. Se realizan un total de 30 golpes, descansando dos minutos cada 10 golpes. El homogenado se diluye con tampón de incubación y se centrifuga 10 minutos a 12.000g a 4°C. El sobrenadante se guarda en hielo y el sedimento se resuspende en un volumen final de 30 ml con el tampón de incubación e inhibidores de proteasas, se homogeniza igual que antes, pero sólo 20 golpes en lugar de 30 y se centrifuga de nuevo 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Se juntan ambos sobrenadantes y se centrifugan 45 minutos a 100.000 g a 4°C.

El sedimento se resuspende en 20 ml del tampón de incubación y se homogeniza manualmente con 50 golpes con un homogenizador Dounce vidrio/vidrio en hielo. Se añaden 10 ml del mismo tampón hasta completar los 30 ml finales. Esta solución se coloca con mucho cuidado sobre una solución de sacarosa al 38% en 5 mM Hepes-KOH, pH 7,4 y se centrifuga 1,5 – 2 horas a 280.000 g a 4°C en un rotor basculante. Se recoge la interfase turbia donde se encuentran las vesículas y se diluye en 20-30 ml con el tampón de incubación, se resuspende y se homogeniza con 20 golpes del Dounce B en hielo. Se centrifuga 50 minutos a 100.000 g a 4°C y el precipitado se resuspende en 1 ml del buffer de incubación sin inhibidores de proteasas. Las membranas se hacen pasar 20 veces por

una aguja de calibre 27 para provocar su vesiculación. Se alicuotan y se guardan en nitrógeno líquido. Se separan 15 μ l para la valoración de la proteína.

1. LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO

Hasta la fecha se dispone de muy poca información acerca de los transportadores de nucleósidos en el sistema nervioso. Mediante RT-PCR, northern blot e hibridación in situ se han detectado los transcritos de rENT1 y rENT2 en muchas regiones cerebrales. Para ENT1, se detectaron niveles de transcrito en las neuronas piramidales del hipocampo, en neuronas granulares del giro dentado, Purkinje y neuronas granulares del cerebelo, así como neuronas corticales y del estriado. En cuanto a ENT2 la localización que está descrita incluye hipocampo, corteza, estriado y cerebelo (Anderson y col., 1999a, b). Más recientemente, y mediante anticuerpos específicos contra las isoformas humanas de ENT1 y ENT2, se ha realizado un barrido de muestras cerebrales mediante western blot que indica que la expresión de ENT1 es más abundante en la corteza cerebral, tálamo, cerebro medio y ganglios basales, mientras que ENT2 se encontró en el cerebelo y en el tronco encefálico, particularmente en el *pons* (Jennings y col., 2001). También hay que tener en cuenta que la distribución de ENT1 se correlaciona con la del receptor de adenosina A₁, lo que en principio sugería un papel importante del transportador es en el control de acciones neuromoduladoras mediadas por los receptores A₁ de adenosina en el cerebro. Respecto a los transportadores de nucleósidos concentrativos, apenas se tenía ninguna información al comenzar esta tesis. En un estudio de Valdés y colaboradores, se realizó un barrido de muestras de diferentes tejidos de rata mediante anticuerpos dirigidos contra CNT1 y CNT2. Ambas proteínas se expresaban en muchos tejidos, pero en el caso de cerebro no se pudo detectar la presencia de CNT1, aunque sí la de CNT2 (Valdés y col., 2000).

1.1 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO DE RATA.

Para comprobar los pocos datos que se tenían sobre la expresión de los transportadores concentrativos, realizamos un western blot de diferentes secciones del cerebro de la rata y no encontramos ninguna señal en la membrana incubada con el anticuerpo de CNT1 para ninguna de las regiones cerebrales estudiadas; en cambio, se detectó una banda de un peso de unos 35 kDa, que no corresponde con el peso esperado y que consideramos inespecífica, pero que nos ha servido de control de carga. Por contra, para CNT2, en todas las regiones estudiadas se localizó la banda correspondiente a 60-65 kDa, siendo de mayor intensidad para el mesencéfalo y cerebelo (figura 1).

El hecho de no localizar la proteína CNT1 en ninguna de las regiones del cerebro analizadas por western blot nos ha llevado a centrarnos en el estudio del transportador de nucleósidos CNT2, ya que no se disponía de datos sobre su expresión o regulación en cerebro y se comparó con ENT1, uno de los transportadores de los que sí se conoce su

expresión en el sistema nervioso central. Además, la adenosina puede ser transportada hacia el interior de las células por la mayoría de transportadores de nucleósidos, pero parece ser que los transportadores principales serían ENT1 y CNT2, y entre ambos, este último sería un mejor candidato para el transporte eficiente en células de mamífero (Mackey y col., 1999).

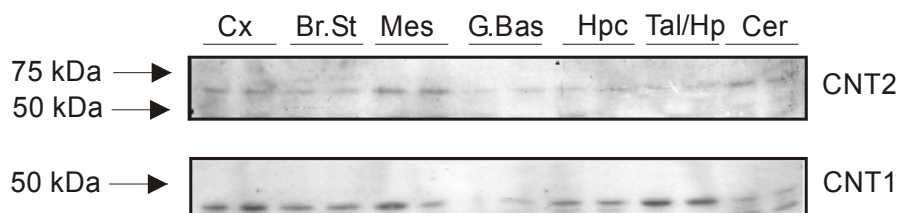


Figura 1: Western blot de CNT1 y CNT2 en diferentes regiones cerebrales. Para ambas proteínas se espera una banda de 60-65 kDa. Para CNT1 no se ha podido detectar en ninguna de las muestras analizadas, mientras que en el caso de CNT2, todas las regiones son positivas. Se cargaron 20 µg de proteína y se realizó una dilución 1/1000 del anticuerpo primario. Cx, corteza cerebral; Br. St., tronco encefálico; Mes, mesencéfalo; G.bas, ganglios basales; Hpc, hipocampo; Tal/Hp, tálamo e hipotálamo; Cer, cerebelo.

Se realizó una PCR a tiempo real para analizar y comparar los niveles de expresión del ARNm en las diferentes regiones del cerebro. Todas las regiones amplificaron tanto CNT2 como ENT1 aunque con diferentes grados de expresión. En la figura 2 se muestra la media y el error estándar de los duplicados de dos animales diferentes.

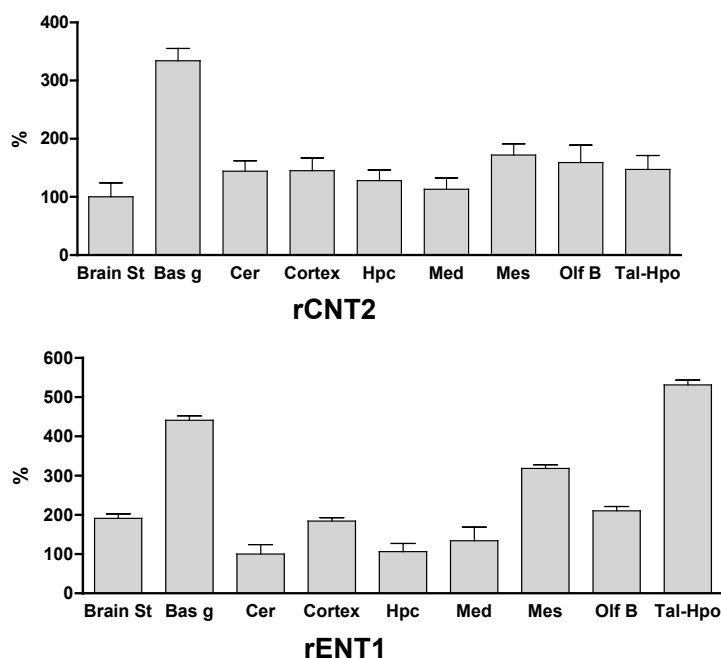


Figura 2: Distribución de los ARNm de CNT2 y ENT1 en diferentes regiones del cerebro de rata por PCR a tiempo real (valores arbitrarios). Abreviaturas: Bas g, ganglios basales; Brain St, tronco encefálico; Cer, cerebelo; Cortex, Neocortex; Hpc, hipocampo; Med, médula espinal; Mes, mesencéfalo; Olf B, Bulbo olfativo; Tal-Hpo, tálamo e hipotálamo. Se muestra la media ± el error estándar de los duplicados de dos animales diferentes.

Debido a que el tronco encefálico fue la zona de menor expresión de CNT2, se le asignó el valor arbitrario de 100 y el resto de regiones se relativizaron a ésta. Los ganglios basales (incluyendo caudado putamen, septum, globus pallidus, nucleus accumbens y

núcleos hipotalámicos preópticos) fueron los que mostraron un nivel más elevado de transcrito de CNT2. En el caso de ENT1, se asignó el valor de 100 al cerebelo. La amplificación más elevada se correspondió al tálamo/hipotálamo, siendo también elevada en los ganglios basales y el mesencéfalo. Las cantidades fueron menores en hipocampo y cerebelo.

Para localizar los tipos celulares y las regiones concretas donde se expresan estos transportadores de adenosina, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* (ISH) con ribosondas de ambas proteínas en cerebro de rata adulta.

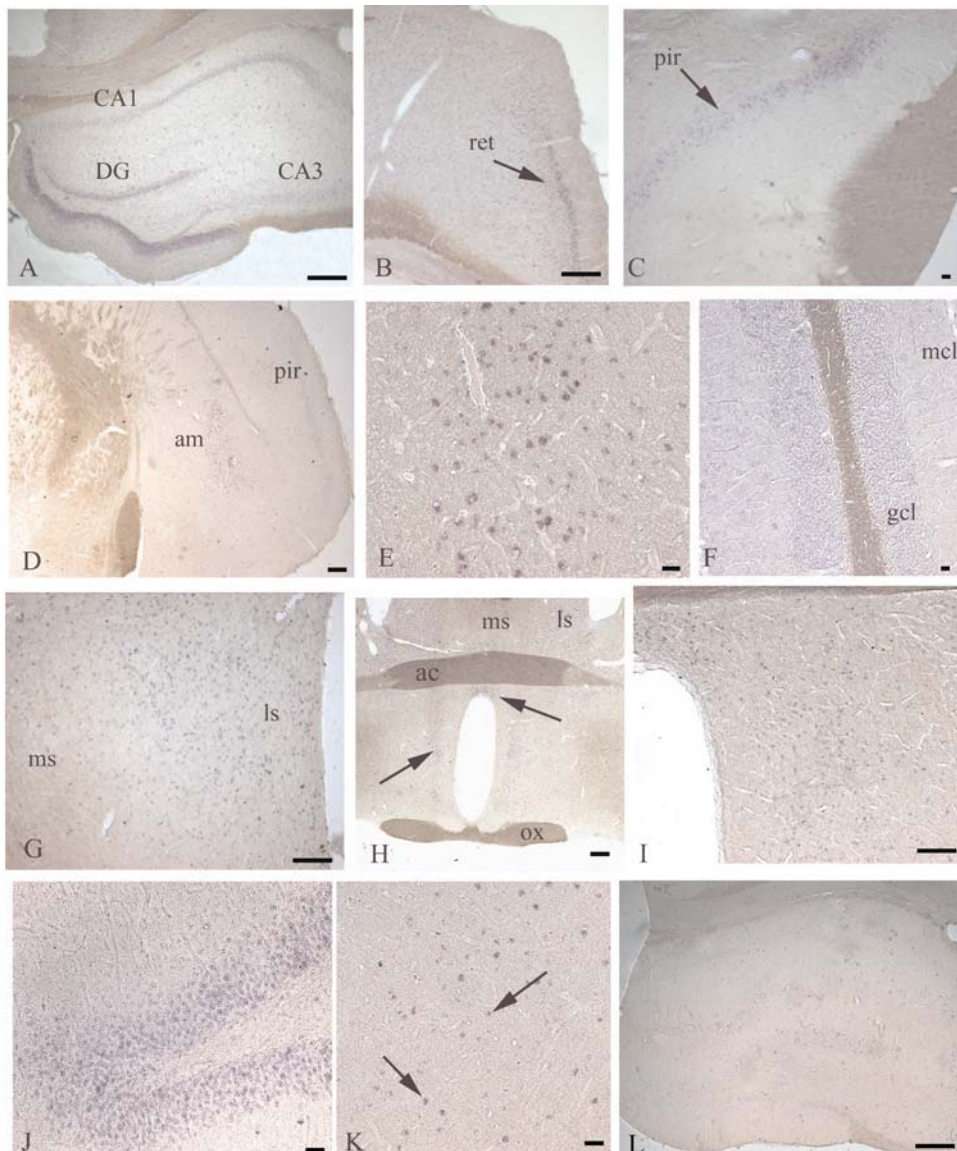


Figura 3: Expresión de CNT2 en diferentes zonas del cerebro de rata mediante hibridación *in situ*.: Se aprecia señal de la ribosonda en las células piramidales y giro dentado del hipocampo (A y J), corteza retrosplenial (B), corteza piriforme (C), amígdala (D y E), células granulares del cerebelo (F), septum medial y lateral (G), núcleos de las áreas preóptica y periventricular (H e I) y corteza profunda (K), control negativo (L). Escala: 400 μ m en A, B, D, G, H I, y L; 40 μ m en C, E, F, J y K.

La sonda antisentido de rCNT2 hibridó con moderada intensidad en las células granulares del hipocampo, la parte granular del cerebelo y la amígdala. En la corteza cerebral, la hibridación fue mínima excepto en las capas II/III de las cortezas retrosplenial y cingular, así como en la corteza piriforme. En el caso de los ganglios basales, el septum lateral, los núcleos preópticos hipotalámicos y los periventriculares fueron los de mayor tinción (figura 3).

Mediante los experimentos de hibridación ISH, complementados por los resultados de la PCR a tiempo real, se muestra la distribución del ARNm de rCNT2 en el cerebro de la rata adulta. Los resultados muestran la presencia del transportador en todas las regiones del cerebro, mientras que el ensayo de ISH no tiñe todas estas regiones lo que puede deberse a la baja expresión o estabilidad del ARNm o a una menor sensibilidad de la ISH respecto a la PCR.

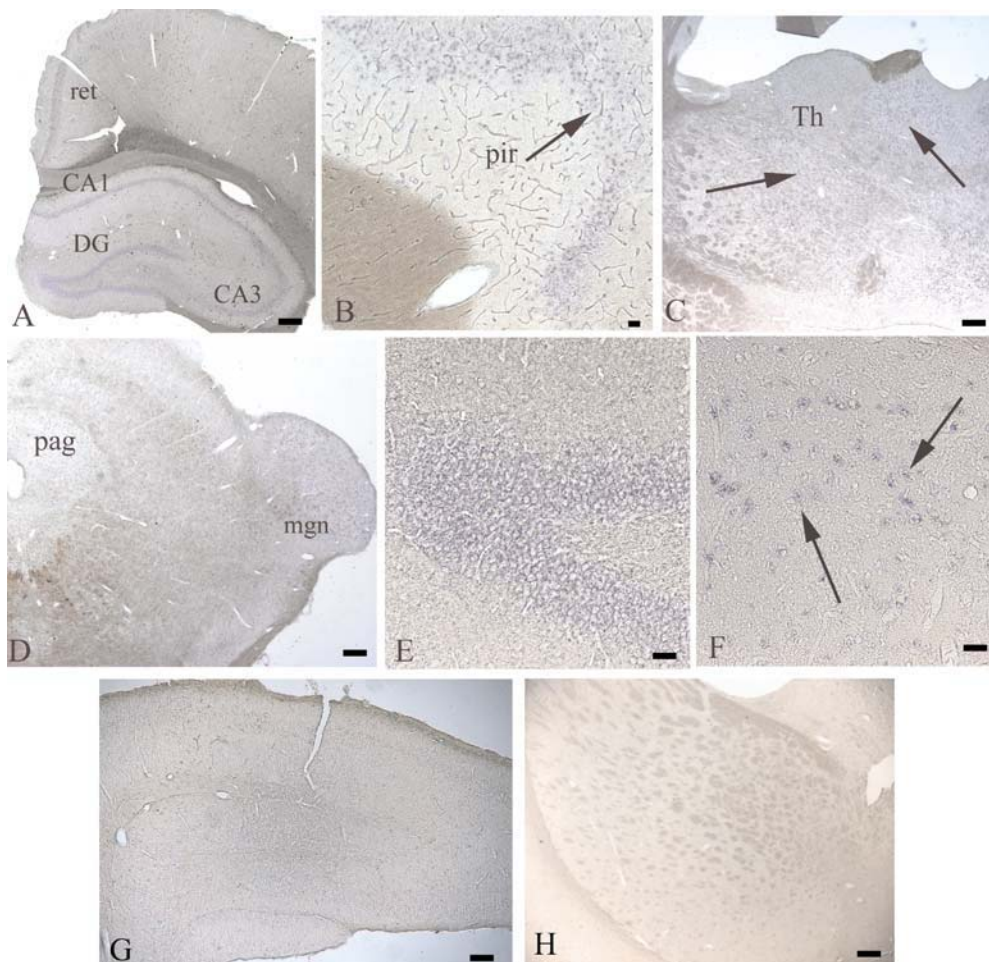


Figura 4: Expresión de ENT1 en diferentes zonas del cerebro de rata mediante hibridación *in situ*. El ARNm de esta proteína se localizó en las siguientes áreas del cerebro: corteza retrosplenial (A), células granulares y piramidales del hipocampo (A, E), corteza piriforme (B), tálamo dorsal (C), área periacueductal y núcleo medio geniculado del mesencéfalo (D), células gliales de la fimbria (F). Controles negativos correspondientes a hipocampo (G) y tálamo (H). Escala: 400 µm en A, C y D; 100 µm en G y 40 µm en B, E, F y H

En el caso de rENT1, la sonda hibridó con muchas áreas del cerebro de la rata, de las que bastantes mostraron patrones de expresión comunes para ambos transportadores. La expresión de rENT1 fue elevada en hipocampo, y en las cortezas parietal, retrosplenial y piriforme. También la intensidad fue muy marcada en el área periacueductal, el núcleo geniculado medial y el estriado, así como en los núcleos talámicos, especialmente en la región media (figura 4).

Brain Region	Staining Intensity		Brain Region	Staining Intensity	
	CNT2	ENT1		CNT2	ENT1
<i>Olfactory areas</i>			<i>Thalamus</i>		
Anterior olfactory nucleus	++	+	Dorsal-medial	+/-	+++
Piriform cortex	++	++	Lateral	+/-	+
<i>Basal ganglia</i>			Paraventricular nuclei	++	+/-
Globus pallidus	+/-	-	<i>Hypothalamus</i>		
Nucleus accumbens/ Stria terminalis	++	+/-	Periventricular nuclei	+	++
Amygdaloid complex	++	+/-	Preoptic area	++	+
Lateral septal nuclei	++	+	Ventromedial nuclei	++	+/-
Medial septal nuclei	+/-	+/-	Ventrolateral nuclei	+/-	+/-
<i>Cerebral cortex</i>			Dorsal nuclei	++	+/-
Layer I	+/-	+/-	<i>Epithalamus</i>		
Layer II/III	+	+/-	Medial habenular nucleus	+	+/-
Layer IV	-	+/-	Lateral habenular nucleus	+	+/-
Layer V	+	+/-	<i>Midbrain</i>		
Layer VI	++	+/-	Periaqueductal gray area	+++	++
Cingulate and Retrosplenial cortex	++	+	Colliculi	++	+
Endopiriform nucleus	++	+	Red nucleus	+	+/-
Entorhinal cortex	+	+	Geniculate nuclei	-	+++
<i>Cerebral white matter</i>			Tegmental nuclei	+	+/-
Corpus callosum	+	+/-	Raphe nucleus	-	+/-
Anterior commissure	+	+/-	<i>Cerebellum</i>		
<i>Hippocampal formation</i>			Molecular cell layer	+/-	+/-
CA1	++	++	Purkinje cell layer	-	+
CA2	+	++	Granular cell layer	++	+
CA3	+	++	<i>Hindbrain</i>		
Dentate gyrus	+++	++	Pontine nuclei	-	+/-
Hilus	+	+	Vestibular nuclei	+	+/-
Fimbria fornix	+	+	Spinal nuclei	++	+
			Ganglionar cells of medulla	++	+
			Motoneurons of medulla	++	+

Tabla 1: Expresión de rCNT2 y rENT1 en cerebro de rata adulta. Se muestra el nivel de expresión de ARNm según sea muy bajo (+/-), bajo (+), moderado (++) o elevado (+++). También se indica la no detección de expresión (-).

Algunas de las zonas de alto contenido en A1 y que no dan señal con la sonda de CNT2 corresponden a regiones con una alta intensidad de marcaje para la sonda de ENT1, como por ejemplo el tálamo. La intensidad de los resultados obtenidos mediante la ISH no concuerda exactamente con la PCR a tiempo real, aunque para explicar esta discrepancia se tendría que tener en cuenta el número relativo de células no marcadas de cada compartimiento o el grado de diversidad de los ARNm.

En la tabla 1 se muestra el estudio comparativo de los niveles de expresión de ambos transportadores tras el análisis de las muestras hibridadas con las ribosondas donde se indican las zonas de mayor expresión para cada proteína. Las regiones de mayor intensidad para CNT2 correspondieron al giro dentado del hipocampo y el área periacueductal del cerebro medio, mientras que las zonas con una señal más acentuada para ENT1 incluyeron partes del tálamo y los núcleos geniculados del cerebro medio.

El ensayo de ISH ha permitido observar las zonas con niveles de expresión más elevados para ambos transportadores y que, además, concuerdan con regiones ricas en el receptor de adenosina A1 (Dunwiddie y Masino, 2001), por lo que pueden ser susceptibles de ser reguladas por la adenosina.

1.1.1 Expresión de rCNT2 y rENT1 en neuronas y glía

Las ribosondas de ambos transportadores hibridaron principalmente con poblaciones neuronales, aunque también se han encontrado células marcadas en zonas sin neuronas. Así, utilizando las mismas secciones que se habían hibridado para la ISH, se realizó un ensayo inmunohistoquímico que revelara el filamento intermedio GFAP específico de astrocitos y la glía cerebelar de Bergmann (figura 5).

En el caso de ENT1, las neuronas son el único tipo celular positivo en la mayoría de regiones, como el giro dentado o los núcleos geniculados. En el cerebelo se marcaron tanto células granulares como células de Purkinje. No se localizó hibridación en astrocitos o glía de Bergmann. A pesar de esto, se encontró marca en zonas sin neuronas, como la fimbria. Ya que estas células son negativas para anti-GFAP, no se trata de astrocitos, por lo que deben corresponder a oligodendrocitos o células microgliales.

La sonda de CNT2 solamente hibridó con neuronas en el giro dentado, en la corteza profunda, la amígdala y el área periacueductal. En el cerebelo, se marcaron las neuronas granulares, aunque las células de Purkinje fueron negativas. En este caso no se puede descartar una ligera marca en astrocitos y la glía de Bergmann (figura 5B, 5E).

Según estos datos, la localización de los transcritos de estos transportadores de adenosina se encuentra principalmente en poblaciones neuronales, aunque no se puede descartar la presencia de estas proteínas en células gliales. La fuente de ATP en neuronas y astrocitos proviene del metabolismo oxidativo y de la glicólisis, respectivamente, y las neuronas activas son las células del cerebro que más nucleótidos consumen (Deitmer,

2001), por lo que es posible que las neuronas necesiten más aporte de adenosina que los astrocitos.

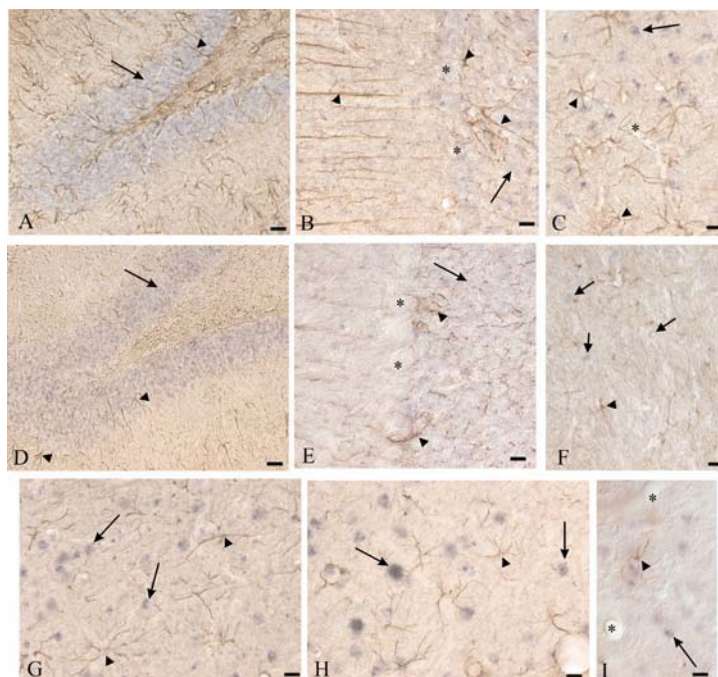


Figura 5: Detección inmunocitoquímica de células GFAP positivas en cortes revelados para rENT1 (A-C, F) y rCNT2 (D, E, G-I). A, giro dentado, los astrocitos revelados con DAB no colocalizan con rENT1; B, cerebelo, los asteriscos indican células de Purkinje y las puntas de flecha astrocitos y glía de Bergmann positivos para GFAP; C, núcleo geniculado, se indica con un asterisco un vaso negativo tanto para la iCC como la ISH; D giro dentado, donde se observan las neuronas granulares positivas y los astrocitos negativos; E, cerebelo, al contrario que ENT1, las células de Purkinje son negativas; F, fimbria del hipocampo; G corteza profunda; H, amígdala; I, área periacueductal. Las flechas largas indican neuronas, las puntas de flecha astrocitos, las flechas cortas señalan células ni neuronales ni astrocitarias. Los asteriscos muestran células de Purkinje en B y E, y vasos sanguíneos en C e I. Las células positivas para los transportadores de nucleósidos se observan en azul y las positivas para GFAP en marrón. Escala: 40 μ m en A y D, y 20 μ m en B, C, E-I.

1.2 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE ADENOSINA CNT2 EN CEREBRO DE RATA ADULTA.

En el cerebro, donde los niveles de expresión de los receptores de adenosina son elevados, la adenosina actúa tanto en procesos normales como patológicos, de manera que se encuentra implicada en la regulación del sueño, la neuroprotección o la epilepsia.

Estudios muy recientes en nuestro grupo, muestran que a través del agonista rPIA se provoca un rápido incremento en la actividad de transporte de CNT2 en la línea de hepatoma de rata FAO y en el cultivo primario de hepatocitos. Incubaciones con diferentes agonistas de los receptores de adenosina y el hecho que este efecto se bloquee completamente con DPCPX, un antagonista preferente de A_1 , indican que dicho incremento está mediado por el receptor A_1 . Se trata de la primera evidencia en la relación entre el receptor de adenosina A_1 y el transportador concentrativo de alta afinidad CNT2. Además, esta interacción depende completamente de los canales K_{ATP} , lo que hace pensar

que la actividad de CNT2 puede estar relacionada con el estado energético de la célula (Dufloy y col., 2004).

Estudios muy recientes también en nuestro laboratorio han revelado que la adenosina activa la AMPK en la línea IEC-6 de intestino de rata. Este efecto, que es muy rápido y se mantiene hasta 30 min tras la adición del nucleósido, se bloquea de forma significativa cuando las células se tratan con 5'-yodotubercidina, un inhibidor de la adenosina quinasa. El transporte de adenosina hacia el interior de la célula es necesario para esta activación de la AMPK y está mediado principalmente por CNT2, ya que, al inhibir este transportador con formicina B, el efecto se bloquea. Estos resultados nos indican un posible papel de CNT2 en procesos de señalización celular y no sólo en aquellos implicados en la recuperación de nucleósidos, con lo que CNT2 podría considerarse como posible diana farmacológica (Aymerich y col., enviado).

1.2.1 Análisis de la expresión de CNT2 durante la privación del sueño

La adenosina se encuentra ligada al metabolismo energético de las células. En el sistema nervioso central un aumento de la actividad neuronal provoca un incremento del consumo de energía y de las concentraciones de adenosina. A través del receptor A₁, la adenosina reduce la actividad neuronal y las necesidades energéticas. En el caso de la regulación del sueño, en áreas del cerebro que regulan la vigilancia cortical, los niveles de adenosina extracelular se incrementan debido a un estado de vigilia prolongado, lo que provoca la disminución de la actividad y entrada en fase de sueño (Porkka-Heiskanen y col., 1997, 2000)

En esta tesis se ha elegido la corteza cerebral para estudiar los cambios del transcrito de CNT2 y ENT1 en ratas privadas de sueño, ya que se ha visto que los cambios de adenosina son paralelos a aquellos del cerebro anterior basal (Porkka-Heiskanen y col., 2002) incluyendo los niveles más elevados durante el periodo activo (Huston y col., 1996). El valor arbitrario de 100 se le otorgó a la corteza cerebral de los animales control. Después de 24 horas de privación de sueño, la expresión del transcrito de CNT2 se redujo hasta un 25% sobre los animales control y tras 8 horas de sueño, esta disminución se recuperó parcialmente (Figura 6, izquierda). Por otro lado, cuando se observaron los niveles de expresión del ARNm de ENT1, no se observaron cambios significativos, ya que los niveles de amplificación en todos los casos fueron muy similares (Figura 6, derecha).

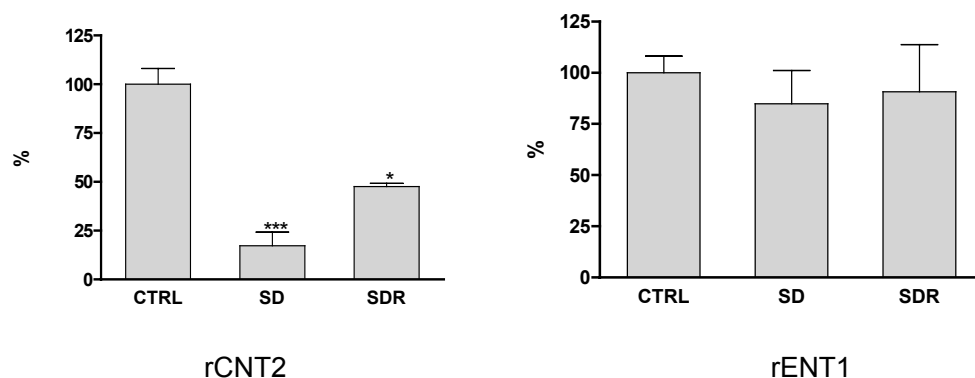


Figura 6: Efecto de la privación de sueño sobre CNT2 y ENT1 en muestras de cortezas cerebrales (valores arbitrarios). Los resultados se muestran como las medias \pm el error estándar de medidas por duplicado de tres animales diferentes. El valor relativo de 100 fue asignado al animal control.

Nuestros resultados respecto a la privación de sueño apuntan hacia una regulación reversible en los niveles de CNT2, lo que sugiere una función para este transportador representando una mayor eficiencia para el transporte de adenosina que en el caso de ENT1. Estos resultados cobran más interés si se tiene en cuenta la modulación del transporte de CNT2 a través de la activación del receptor A1 (Duflot y col., 2004).

Los niveles de adenosina intracelular son muy bajos debido a la elevada actividad del enzima adenosina quinasa (McNally y col., 1997), pero la adenosina intracelular se puede acumular en los axones mediante la acción de la 5'-nucleotidasa sobre el AMP, o la SAH hidrolasa (Dunwiddie y Masino, 2001; Latini y Pedata, 2001) y ser liberada de las terminales sinápticas por los ENT (Gu y col., 1995). La eliminación de la adenosina puede implicar catabolismo o transporte. Algunos enzimas metabólicos, como la adenosina desaminasa o la adenosina quinasa, se han propuesto como enzimas que modulan los niveles de adenosina extracelular (Mackiewicz y col., 2003). Nuestros resultados sugieren, además, una contribución de un transportador concentrativo como es rCNT2.

Los niveles de adenosina se incrementan en seis horas de privación de sueño. Este incremento se aprecia especialmente en el cerebro anterior basal y también es importante en la corteza (Porkka-Heiskanen y col., 1997, 2000). Existen datos que indican que la adenosina es un mediador endógeno de la expresión del sueño y que el aumento de la liberación de adenosina reproduce la acumulación de las necesidades de sueño (Benington y col., 1995; Thakkar y col., 2003). Los cambios en la expresión de CNT2 que observamos en las ratas privadas de sueño concuerdan con estos datos y sugieren una regulación transcripcional de CNT2 mediada por el sueño. Respecto a ENT1, no se observan cambios, lo que sugiere que la transcripción de este transportador no se regula por la misma vía. Incluso si no se descarta una participación de los ENTs en la recaptación de adenosina (Sweeney, 1996), la elevada afinidad de CNT2 (6 μ M respecto 40 μ M en el

caso de ENT1, ver Pastor-Anglada y col., 1998a) puede proporcionar una mayor eficiencia en su eliminación.

El hecho de que se requieran seis horas de privación de sueño para alterar la expresión de los factores de transcripción en la corteza cerebral (Terao y col., 2003) hizo que eligiéramos periodos más largos de privación para permitir los cambios de los genes susceptibles de ser regulados por estos factores de transcripción. La influencia del ritmo circadiano sobre el sueño (Boberly y Achermann, 1999) hace que se recomiende un periodo de 24h para detener la privación en el mismo punto del ritmo circadiano y así evitar interferencias. La modulación de la transmisión sináptica, así como la sensibilidad a la adenosina, cambia durante el día (Liu y col., 2000), por lo que la recuperación parcial de los animales podría deberse a esta intervención del ritmo circadiano. A pesar de estos datos, decidimos analizar la expresión de ambos transportadores a lo largo de 24 horas y valorar los posibles cambios debidos al ritmo circadiano. Como se observa en la figura 7, los niveles de expresión del ARNm de rCNT2 no varían en el periodo de 24 horas analizado, por lo que nuestros resultados no se han visto influenciados por el ritmo circadiano. Por otro lado, los niveles de rENT1 sí que son variables, pero en los tiempos en los que se han recogido las muestras, estas diferencias no son significativas.

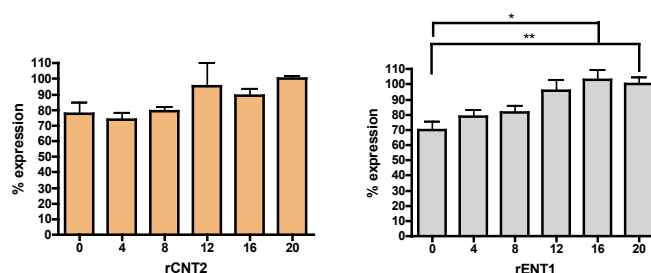


Figura 7: Niveles de ARNm de los transportadores rCNT2 y rENT1 a lo largo de 24 horas. Se ha tomado las 20 h como valor de referencia. No parece que rCNT2 sufra cambios significativos, en cambio ENT1 tiende a unos valores más bajos durante el periodo de actividad de la rata respecto al periodo de sueño, donde su expresión aumenta.

1.2.2 Análisis de la expresión de CNT2 en ratas tratadas con ácido kaínico.

Normalmente la concentración de adenosina extracelular en el cerebro se encuentra dentro del rango nanomolar, aunque los niveles pueden aumentar extraordinariamente durante situaciones de hipoxia o isquemia hasta concentraciones del rango micromolar (Mendonça y col., 2000; Rudolphi y col., 1992); por otro lado, la adenosina tiene un papel neuroprotector en situaciones de estrés, principalmente por la estimulación neuronal de los receptores A₁ y A₃ (Mubagwa y Flameng, 2001; Rudolphi y col., 1992), de manera que la estimulación de estos receptores puede proteger a las células neuronales que los expresen en dichas situaciones de estrés.

Estudios muy recientes apuntan a una regulación de los transportadores equilibrativos mediada por el receptor A_{2A} (Pinto-Duarte y col., 2005) y tal como hemos indicado anteriormente, existe una relación entre el receptor A_1 y el transportador CNT2 en tejidos periféricos (Duflo y col., 2004). Parece que la fuente de adenosina extracelular determina la preferencia por uno u otro tipo de receptor que será activado. Así, la adenosina que proviene de los nucleótidos de adenina actúa principalmente sobre los receptores A_{2A} , mientras que la adenosina liberada como tal prefiere los receptores A_1 (Cunha y col., 1996).

Para comprobar si el transportador CNT2 tiene alguna implicación en una situación patológica, utilizamos un modelo de corteza cerebral e hipocampo de ratas a las que se les había administrado kainato. El kainato se utiliza como un inductor de convulsiones (Ben-Ari, 1985; Buckmaster and Dudek, 1997), por ejemplo, para producir epilepsia crónica con ataques epilépticos espontáneos y recurrentes. Se utilizaron muestras de ARNm recogidas a las 6, 24 y 72 horas posteriores al tratamiento con kainato que fueron cedidas por la Dra. Marta Calbet. Realizamos un análisis de los niveles de expresión de CNT2 y observamos como su transcrito aumenta de forma significativa a lo largo de este periodo de tiempo (figura 8).

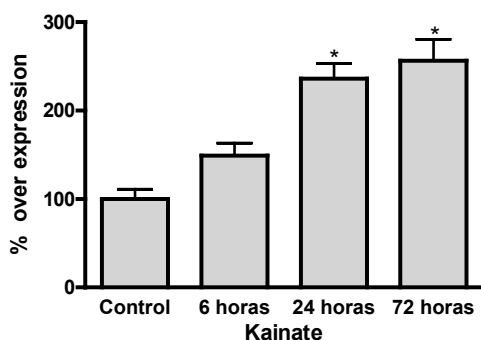


Figura 8: Análisis de los niveles de transcrito de CNT2 en corteza e hipocampo de ratas a las que se les había administrado ácido kaínico como modelo de epilepsia. Se observa como el ARNm de este transportador va aumentando a lo largo del tiempo post-tratamiento respecto al control. Se muestra la media de tres ratas \pm error estándar.

Una de las primeras funciones propuestas de la adenosina en situaciones patológicas, fue un efecto anticonvulsivo (Dragunow, 1986), de forma que el daño celular aumentaría los niveles de adenosina extracelular y estas propiedades anti-epilépticas parecen ser debidas a acciones inhibitoras mediadas por los receptores A_1 principalmente en el hipocampo (Zhang y col., 1994). De hecho, se ha encontrado una reducción crónica de los receptores A_1 en el tejido epiléptico (Ochiishi y col., 1999), lo que contribuye a la hiperexcitabilidad que caracteriza la epilepsia. El ácido kaínico administrado a las ratas utilizadas en este experimento consistió en una dosis única de 10-15 mg/kg, lo que produce crisis epilépticas durante las tres primeras horas y provoca que el animal presente signos de hiperexcitabilidad durante varios días.

Si bien nuestros resultados con el ácido kaínico son preliminares, nos indican un rol de CNT2 en situaciones patológicas donde la adenosina tiene un papel prioritario en la neuroprotección vía el receptor A_1 . Actualmente se han realizado nuevos tratamientos con

ácido kaínico en ratas para, próximamente, realizar estudios más detallados acerca del papel de este transportador, tanto del ARNm como de la expresión de proteína.

1.3 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD DE TRANSPORTE EN LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES.

Debido a los resultados obtenidos con los experimentos de hibridación *in situ* y los experimentos de regulación transcripcional descritos anteriormente que sugieren la implicación del transportador rCNT2 en una regulación purinérgica en el sistema nervioso central, nos propusimos estudiar la actividad de este transportador en líneas celulares neuronales.

La primera línea celular estudiada fue la línea derivada de neuroblastoma de ratón Neuro 2A. En unos primeros ensayos se detectó una actividad dependiente de sodio tanto de guanosina (figura 9) como de citidina que no se saturaba al menos hasta los 10 minutos de transporte. Estos resultados no se repitieron en experimentos posteriores y la interpretación se hacía difícil, por lo que dejamos de trabajar con esta línea que consideramos poco estable.

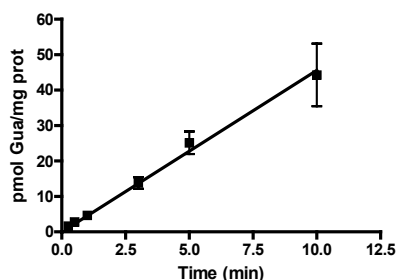


Figura 9: Transporte dependiente de sodio en función del tiempo de guanosina en la línea Neuro 2A. Los resultados son la media de medidas en cuatuplicado \pm el error estándar.

Por otro lado, mediante PCR no se pudo detectar CNT2 en la línea neuronal N2A ni tampoco CNT1 por western. Esto nos indicaría que el transporte dependiente de sodio que se había detectado puede corresponder a CNT3 (figura 10).

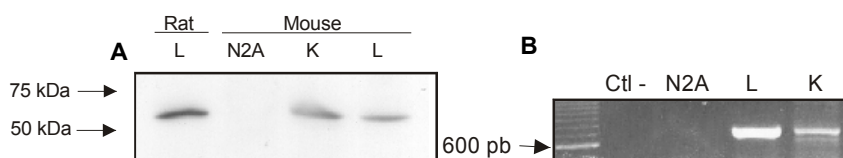


Figura 10: Resultado de una PCR (B) para CNT2 y un western (A) para CNT1. Ctl -, control negativo; N2A, línea celular; L, hígado; K, riñón. No se detecta ninguno de los dos transportadores de nucleósidos en la línea celular Neuro 2A.

La segunda línea celular utilizada fue la línea SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano, pero desafortunadamente no mostraba actividad dependiente de sodio (figura 11).

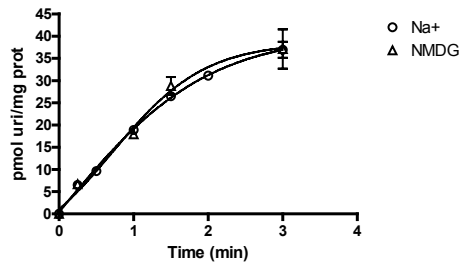


Figura 11: Transporte en función del tiempo de 1 μ M de uridina en la línea SH-SY5Y. Los resultados son la media de medidas en cuadruplicado \pm el error estándar. Se observó una actividad de transporte equilibrativa.

La tercera y última de las líneas neuronales utilizadas fue la línea PC12 derivada de feocromocitoma de rata. Aunque en este caso sí se observó una actividad dependiente de sodio que no era saturable hasta los 10 minutos, la mayoría de transporte se encontraba mediado por CNT3 y no por CNT2, cuya contribución era muy pequeña y de difícil detección. Esta conclusión deriva del hecho que el transporte de guanosina dependiente de sodio en una célula puede estar mediado por CNT2, CNT3 o por ambos. La utilización de concentraciones crecientes de citidina, un sustrato de CNT3 pero no de CNT2, en un ensayo de transporte con guanosina radiactiva da lugar a una competencia de ambos sustratos por CNT3, hasta llegar a una concentración de citidina donde todo el transporte radiactivo de guanosina está mediado por CNT2. Nuestras observaciones apuntan a un transporte mayoritario por CNT3 (figura 12).

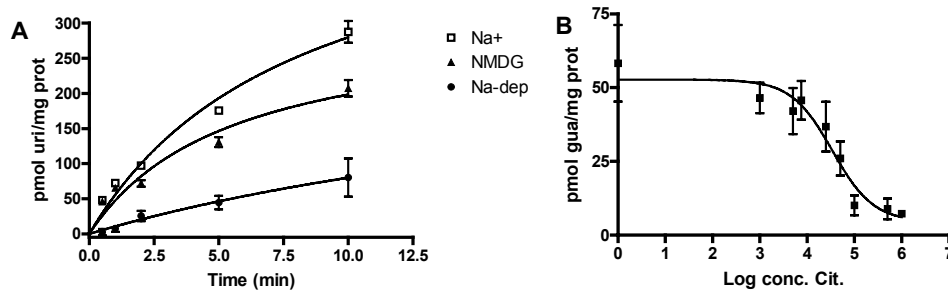


Figura 12: Transporte en función del tiempo de 1 μ M de uridina (A) y transporte en función de la concentración de citidina de guanosina (B) en la línea PC12. Los resultados son la media de medidas en cuadruplicado \pm el error estándar. En A se muestra el transporte dependiente de sodio, mientras que en B se utilizaron concentraciones crecientes de citidina para inhibir el transporte posiblemente mediado por CNT3.

En este punto decidimos probar con cultivos primarios de neuronas para ver si la actividad de este transportador se conserva en estas células ya que se encuentran más cercanas a la biología del animal. Para elegir la zona del cerebro de la que aislar las células, nos basamos en los resultados de la hibridación *in situ*, por lo que en un primer momento nos decidimos por el cultivo de células de corteza cerebral e hipocampo (figura 13) a pesar de que los cultivos primarios se tienen que hacer con células embrionarias o postnatales recientes y la ISH corresponde a rata adulta.

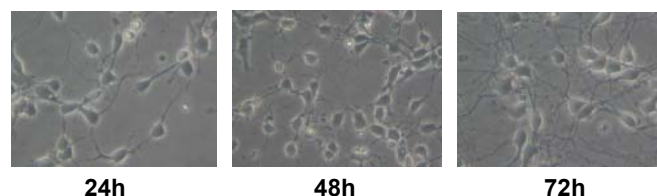


Figura 13: Imágenes a 24, 48 y 72 horas de un cultivo primario de neuronas de hipocampo y corteza cerebral. Con los días de cultivo se aprecian el aumento de prolongaciones similares a las neuritas que van formando redes entre las células.

Lo primero que hicimos fue detectar por PCR los transcritos del transportador CNT2 y además también detectamos los de los transportadores equilibrativos ENT1 y ENT2 en preparaciones de ADNc de embriones de rata de 17 días de gestación, con los mismos que realizamos los cultivos primarios (figura 14).

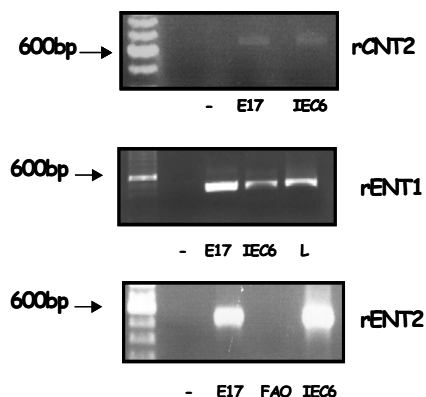


Figura 14: Detección por PCR de los transcritos de CNT2, ENT1 y ENT2. Se observa la banda esperada para los tres transportadores. -, control negativo; E17, embrión de rata de 17 días de gestación; IEC6, línea celular de intestino IEC6; L, hígado de rata; FAO, línea celular de hepatoma de rata.

Se realizaron ensayos de transporte a diferentes días, pero no se observó ninguna actividad de transporte dependiente de sodio. En la figura 15 se muestran dos ensayos a 2 y 4 días de cultivo *in vitro* para los sustratos citidina y guanósina. A pesar de no observar ninguna actividad de transporte dependiente de sodio sí observamos que a medida que las células estaban más tiempo en cultivo, la actividad total detectada era cada vez menor.

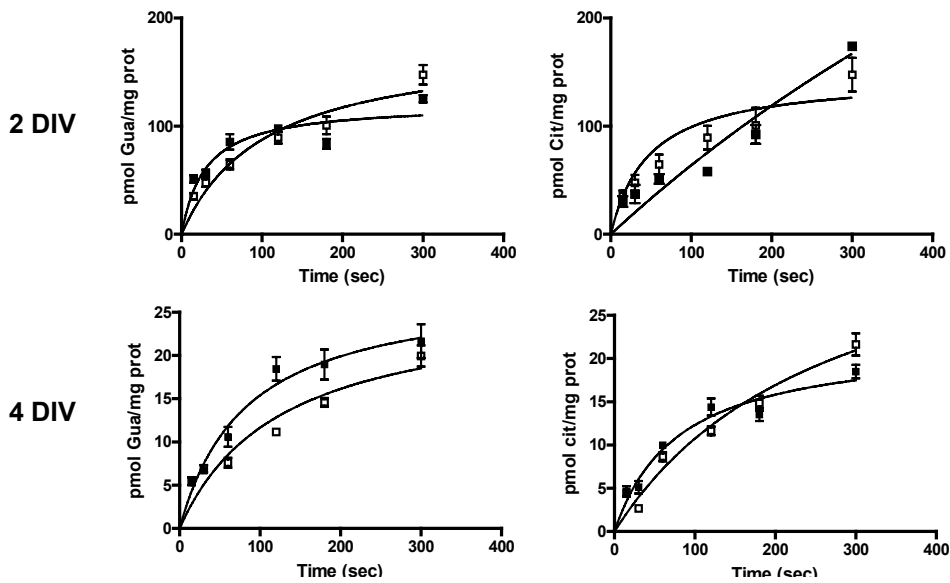


Figura 15: Ensayos de transporte de guanosina y citidina a 2 y 4 días en cultivo. No se observa actividad dependiente de sodio, pero sí se puede apreciar como los valores de actividad detectada en picomoles son inferiores contra mayor es el tiempo en cultivo.

En la figura 16, se muestra la contribución de los tres transportadores (ENT1, ENT2 y CNT2) al transporte total de guanosina y citidina. Esto nos ha servido para comprobar qué transportador es el responsable de mayor parte de actividad de transporte de estas células y parece que ENT2 es la proteína mayoritaria, mientras que la actividad asociada a ENT1 y a los CNT es negligible.

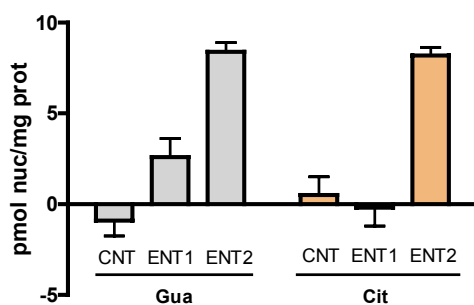


Figura 16: Representación de la medida de las actividades de transporte equilibrativas y concentrativas presentes en el cultivo primario de hipocampo y corteza cerebral. La proteína responsable de la mayoría del transporte es ENT2, mientras que ENT1 y los transportadores concentrativos apenas contribuyen al transporte total.

Para comprobar estos resultados realizamos una PCR a tiempo real y comparamos así los niveles de transcrito a diferentes días de cultivo. Tomando como control células aisladas de hipocampo y corteza cerebral el mismo día del aislamiento pero antes de sembrar, observamos cómo los niveles del transcrito del transportador de nucleósidos rCNT2 van decayendo con los días de cultivo. Con los transportadores equilibrativos ocurre algo parecido, aunque ENT2 parece ser el más estable (figura 17).

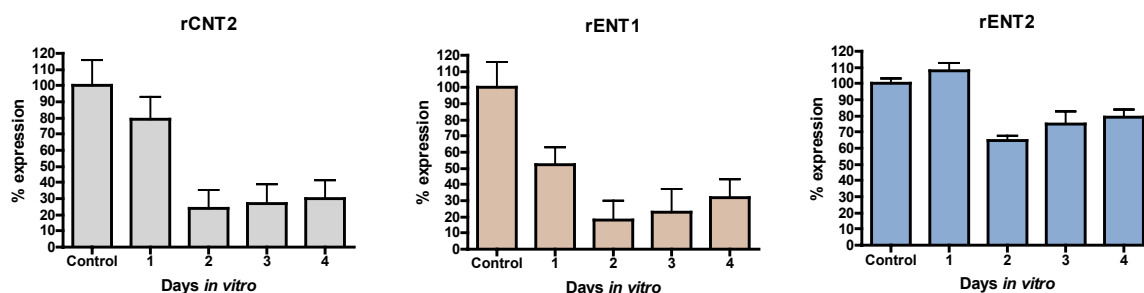


Figura 17: PCRs a tiempo real de los niveles de expresión de los transportadores rCNT2, rENT1 y rENT2 a diferentes días de siembra tras el aislamiento del cultivo primario. El control corresponde al ARN obtenido de las mismas células antes de la siembra. El resto de muestras se ha relativizado a esta muestra control. Esta figura se trata de una imagen representativa de diferentes experimentos.

Estos resultados nos aclaraban por qué no conseguíamos detectar la actividad de CNT2 en el cultivo primario. En ese momento nos planteamos la duda de si podría haber diferencias de expresión de estas proteínas transportadoras entre la rata adulta, con la que habíamos realizado la hibridación *in situ* y los fetos utilizados en el aislamiento del cultivo primario. Por este motivo realizamos una nueva PCR a tiempo real. En el caso de los transportadores equilibrativos, los niveles de transcrito parecen ser muy superiores en el feto respecto a la rata adulta, a la que consideramos como muestra de referencia, y si además lo comparamos con las neuronas aisladas, este incremento es todavía más marcado. En cambio, en el caso de CNT2 no parece que haya diferencias significativas entre la rata adulta y el feto, pero sí con las neuronas aisladas donde los niveles disminuyen de forma radical hasta un 80% respecto al control (figura 18).

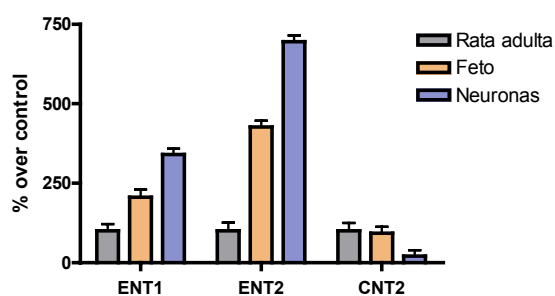


Figura 18: PCR a tiempo real correspondiente a los niveles de expresión de los transcritos de ENT1, ENT2 y CNT2 comparando cerebro de rata adulta, cerebro de embrión de 17 días de edad y células aisladas de embriones de la misma edad. Los valores se han relativizado a la rata adulta para cada gen. Parece que el transportador CNT2 disminuye su expresión cuando las células se encuentran aisladas mientras que para los transportadores equilibrativos ocurre lo contrario.

Estos resultados nos indican que este cultivo primario no es un buen modelo para el estudio de CNT2, mientras que los transportadores equilibrativos, y concretamente ENT2, sí presentan una elevada actividad en estas células. Paralelamente a estos experimentos, se ha publicado un trabajo en el que estudian la actividad de transporte de nucleósidos en cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos de rata con

observaciones similares a las nuestras. Así, estos autores deducen que el transporte de uridina y adenosina en estos modelos celulares se encuentra mediado principalmente por ENT2 (Nagai y col., 2005).

Existen trabajos que muestran que el receptor de adenosina A_{2a} se encuentra expresado en más zonas del cerebro de las que se pensaba, ya que un principio se había limitado al estriado y el bulbo olfativo, de forma que mediante ensayos de unión a ligando con su agonista CGS, se han localizado regiones que incluyen hipocampo, tálamo y corteza cerebral donde este receptor también se expresa, aunque en menor grado (Latini y col., 1996; Sebastiao y Ribeiro, 1996; Ribeiro y col., 2003). Publicaciones recientes apuntan a una regulación de los transportadores equilibrativos en cerebro por el receptor A_{2a} (Pinto-Duarte y col., 2005), mientras que estudios en nuestro laboratorio muestran una activación del transportador CNT2 a través del agonista PIA vía el receptor A₁ en tejidos periféricos (Dufлот y col., 2004). Estos datos y el hecho de la difícil detección de transporte dependiente de sodio en líneas neuronales y en el cultivo primario de neuronas de hipocampo y corteza cerebral, nos indican que los transportadores equilibrativos, y principalmente ENT2, se encuentran ampliamente expresados en neuronas corticales y de hipocampo de estos cultivos primarios y que seguramente además pueden estar regulados por el receptor de adenosina A_{2a}.

En la figura 19, se muestra una PCR a partir de ADNc del cultivo primario de neuronas de hipocampo y corteza cerebral donde se muestran los receptores de adenosina detectados en estas células. Se incluye además una muestra de corteza e hipocampo de rata adulta. Según estos datos, los receptores A₁ y A_{2A} serían los que se encuentran más expresados en estas células, mientras que el receptor A₃ sólo se expresaría en adulto, ya que en las muestras de células embrionarias no hemos podido detectarlo o los niveles de expresión serían muy bajos. El receptor A_{2B} no se ha conseguido amplificar en ninguna de las tres muestras.

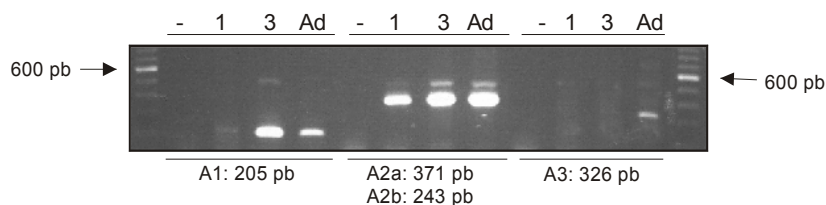


Figura 19: PCR de los receptores de adenosina en corteza cerebral de rata adulta y en cultivos primarios de estas regiones de fetos de 17 días de gestación tras 1 y 3 días de cultivo. En las muestras embrionarias se amplificó tanto el receptor A₁ como el receptor A_{2A}, mientras que los receptores de adenosina de baja afinidad A_{2b} y A₃ no se llegaron a detectar. -, control negativo; 1 y 3, cultivo primario de células del hipocampo y corticales de embriones a 1 y 3 días tras la siembra; Ad, corteza cerebral e hipocampo de rata adulta.

Parece que los receptores de adenosina de alta afinidad son los que más importancia pueden tener en este cultivo primario. Estos datos corroboran los estudios anteriormente descritos donde la presencia del receptor A_{2A} no se encuentra limitada al estriado o tubérculo olfativo, sino que también se puede localizar en hipocampo y/o corteza cerebral. Por estos motivos nos decidimos a realizar cultivos primarios de células granulares de cerebelo, una región donde habíamos localizado de forma moderada el transcrito de CNT2 por hibridación *in situ* y donde apenas se encuentra expresado el receptor A_{2a} y sí el receptor A_1 (Ribeiro y col., 2003).

Se realizaron cultivos primarios de cerebelo entre los primeros 5-8 días tras el parto (P5-P8). Las primeras pruebas con estos cultivos primarios de cerebelo indican una actividad de transporte dependiente de sodio muy elevada. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos a 1, 2 y 5 minutos de transporte de guanosina y, como se puede apreciar en la gráfica, la actividad mediada por los transportadores equilibrativos es muy baja comparada con la actividad dependiente de sodio.

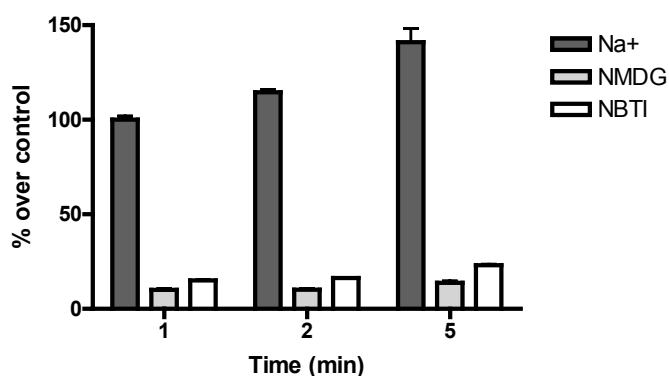


Figura 20: Representación de la medida de las actividades de transporte equilibrativas y concentrativas presentes en el cultivo primario de cerebelo. El transporte se realizó con guanosina $1\mu\text{M}$ a los diferentes tiempos indicados. El transporte dependiente de sodio en este caso es muy superior al equilibrativo.

Estos resultados son muy recientes y actualmente se están realizando nuevos ensayos para comprobar estos datos de actividad dependiente de sodio en estos cultivos de cerebelo y realizar pruebas de regulación purinérgica con agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina para comprobar si en este modelo neuronal existe una relación directa o indirecta de los receptores de adenosina con el transportador CNT2.

2. DISEÑO Y GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES MONOESPECÍFICOS CONTRA LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

Nuestro grupo de investigación fue el primero en generar anticuerpos contra las isoformas de rata de los transportadores concentrativos de nucleósidos (Felipe y col. 1998). Se sabe que los transportadores equilibrativos están ampliamente distribuidos, casi de forma ubicua, mientras que, en un principio, se pensó que las actividades concentrativas mostraban un patrón de expresión muy concreto, localizado en epitelios especializados en absorción, como riñón, intestino e hígado (Baldwin y col., 1999). Una vez que se identificaron las entidades moleculares de estos transportadores concentrativos, se pudo demostrar la presencia de su ARN mensajero en tejidos menos especializados (Valdés y col., 2000; Ritzel y col., 2001a). Estas herramientas permitieron el estudio de la expresión de estas proteínas y mediante un barrido de muestras demostrar que estos transportadores no sólo se expresan en tejidos especializados sino que su distribución es mucho más amplia de lo que se creía en un principio (Valdés y col., 2000). Estas evidencias promovieron en nuestro grupo de investigación la generación y caracterización de anticuerpos que podrían reconocer aquellas isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos clonados.

Las estructuras primarias de hENT1, hENT2, hCNT1 y hCNT2 fueron analizadas por el Dr. Jordi Lloberas y miembros de nuestro grupo de investigación mediante una combinación de métodos que incluyeron la predicción de dominios transmembrana y estructuras secundarias de hélice α utilizando un programa que combina los algoritmos de Chou-Fasman y Rose. Estos autores asumen que la estructura secundaria de una proteína está en estado de hélice α , lámina β o giro. Con esta clasificación analizaron la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) y encontraron la distribución de residuos en cada una de estas estructuras. De estas distribuciones derivaron “propensiones” que representan la tendencia intrínseca de un aminoácido a estar en una determinada estructura secundaria. Estas propensiones se insertan como reglas matemáticas para predecir la estructura secundaria en “ventanas” de un número determinado de residuos promediando las propensiones en cada ventana. Las secuencias primarias de los transportadores de nucleósidos también se valoraron según sus picos de hidrofobicidad utilizando el método Kyte-Doolittle con un tamaño de ventana de 9 aminoácidos, además de los índices de flexibilidad de acuerdo con los algoritmos de Boger y Karplus y Shulz. En la determinación de los picos de hidrofobicidad la técnica que se ha utilizado calcula en unas ventanas, de un número de residuos determinado, cuál es la hidrofobicidad media en cada residuo a partir de los coeficientes de partición (por ejemplo, octanol/agua o cloroformo/agua) de los aminoácidos, lo que es muy útil en la determinación de regiones internas (típicamente

hidrofóbicas) o externas (típicamente hidrofílicas) de las proteínas. Estos perfiles sirven también de base para calcular aproximadamente la localización, externa o interna, de un determinado residuo y, como ocurre en nuestro caso, predecir determinantes antigénicos.

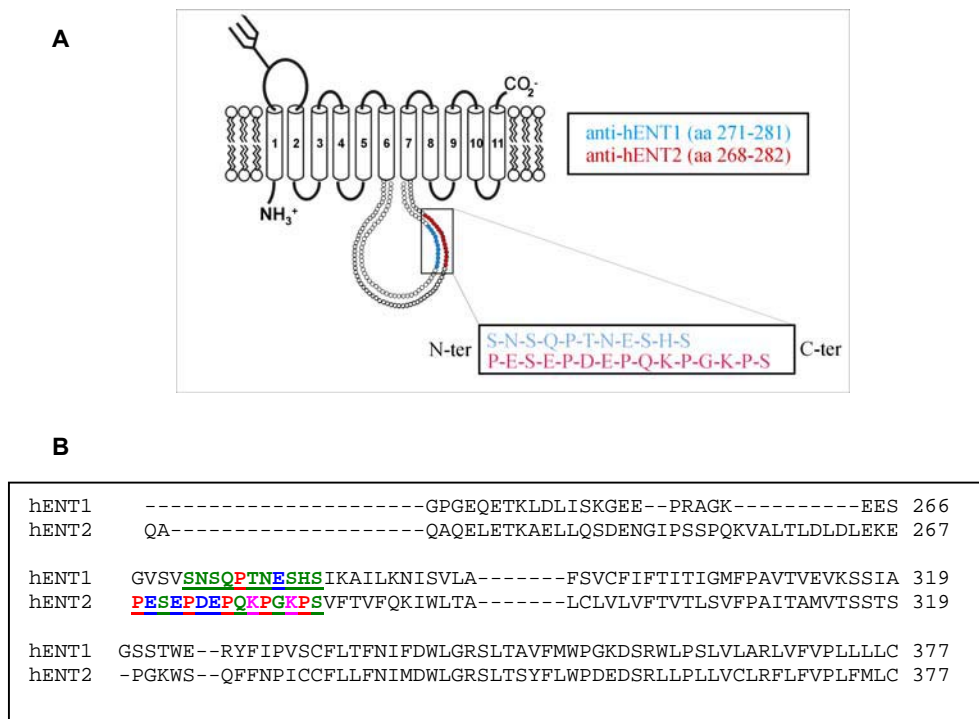


Figura 21: A) Topología propuesta de 11 dominios transmembrana para los transportadores equilibrativos. Se destacan las secuencias de los péptidos utilizados en la generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos dirigidos contra estos transportadores. **B)** Análisis del alineamiento de secuencias de hENT1 y hENT2. Las diferencias entre péptidos generados indican la posible falta de reactividad cruzada entre ambos anticuerpos

Como se ha descrito recientemente (Mackey y col., 2002), el *loop* intracelular entre los dominios transmembrana 6 y 7 de los transportadores equilibrativos incluye secuencias de oligopéptidos candidatas para la producción de anticuerpos policlonales monoespecíficos. De hecho, la presencia de 11 aminoácidos en la secuencia elegida en hENT2 y no en hENT1 explicaría la falta de reacción cruzada entre ambas isoformas (figura 21).

Los oligopéptidos que se muestran en la figura 21 y 22 fueron sintetizados y conjugados a KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) con un mismo volumen de adyuvante de Freund para luego ser inyectados en los conejos. La proteína KLH se utiliza de forma generalizada para la conjugación de péptidos en la producción de anticuerpos. Es una proteína que contiene cobre y que pertenece a un grupo de proteínas llamadas hemocianinas que se encuentran en artrópodos y moluscos. La KLH, en tampón Tris, pH 7,4, se encuentra en cinco estados diferentes de agregación. Con cambios moderados de pH, puede disociarse de forma reversible en diferentes subunidades y, a pH 8,9, se disocia

completamente. Cada subunidad contiene lugares de unión a oxígeno y, por cada dos átomos de cobre de la KLH, se encuentra una molécula de oxígeno. Debido al número elevado de lugares antigénicos, se espera un aumento de la unión del anticuerpo cuando la KLH se disocia en las diferentes subunidades. La síntesis de anticuerpos, una vez se han diseñado los péptidos, fue llevada a cabo por la empresa Invitrogen, que fue la encargada de la síntesis del péptido, la conjugación con la KLH, la recolección del anticuerpo a partir del suero de conejo y el análisis de antigenicidad por ELISA. Para más información acerca del protocolo realizado se puede visitar su página web (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=3987>).

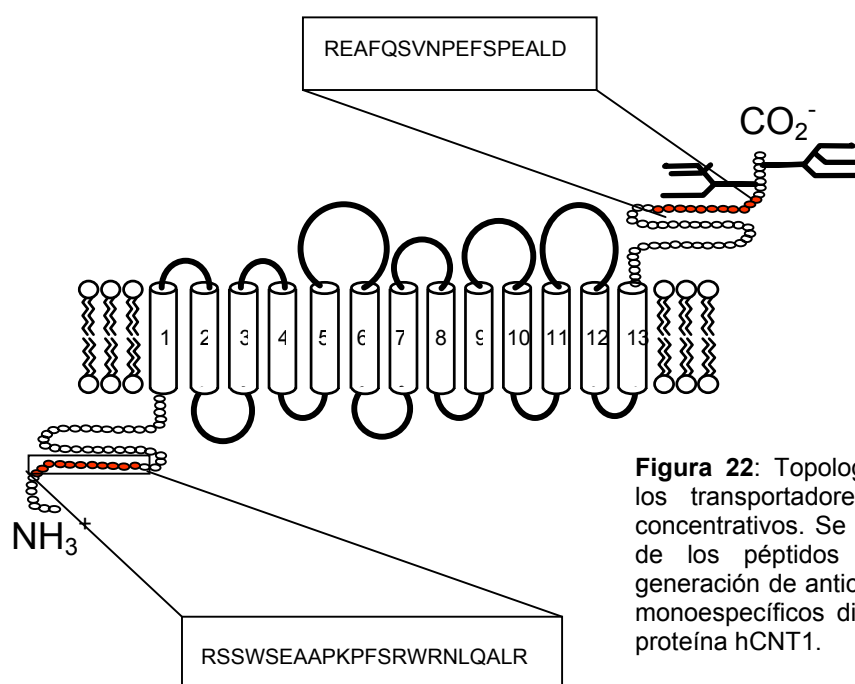


Figura 22: Topología propuesta para los transportadores de nucleósidos concentrativos. Se indica la secuencia de los péptidos elegidos para la generación de anticuerpos policlonales mono-específicos dirigidos contra la proteína hCNT1.

En el caso de hCNT1 se eligieron dos oligopéptidos correspondientes a los residuos 48-69 y 621-637 en base a su supuesta antigenicidad y la naturaleza única de las secuencias (figura 22). La inmunoreactividad de los sueros inmunizados contra el antígeno se comprobó por ELISA.

Anticuerpo	Secuencia del epítipo / Posición
hENT1a	S-N-S-Q-P-T-N-E-S-H-S (aa 271-281). Intracelular.
hENT2a	P-E-S-E-P-D-E-P-Q-K-P-G-K-P-S (aa 268-282). Intracelular.
hCNT1a	R-E-A-F-Q-S-V-N-P-E-F-S-P-E-A-L-D (aa 621-637). Extracelular.
hCNT1b	R-S-S-W-S-E-A-A-P-K-P-F-S-R-W-R-N-L-Q-A-L-R (aa 48-69). Intracelular.
hCNT2b	Secuencia del anticuerpo pendiente de patente. Intracelular.

Tabla 2: Resumen de los anticuerpos generados contra los transportadores de nucleósidos utilizados en esta tesis. Se indican las secuencias de los epítipos y su posición.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS

3.1 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO CONGELADO

El propósito principal de esta parte del trabajo es la caracterización de los anticuerpos contra las isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos principalmente con la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica tienen como objetivo la detección y localización de un antígeno, ya sea en tejidos (inmunohistoquímica) o en cultivos celulares (inmunocitoquímica), mediante la utilización de anticuerpos acoplados a un sistema de detección como pueden ser los fluorocromos, enzimas o partículas metálicas. La visualización se realiza mediante microscopía óptica o electrónica. En nuestro caso, se utilizaron anticuerpos conjugados tanto a fluorocromos como a enzimas y su posterior estudio se realizó siempre mediante microscopía óptica de campo claro o de fluorescencia.

Desde que en 1941 Coons y colaboradores revolucionaron la identificación de antígenos en tejidos utilizando un método de inmunofluorescencia directa conjugando anticuerpos con el isotiocianato de fluoresceína (Coons y col. 1941), las técnicas de inmunohistoquímica han avanzado de forma espectacular. La inmunohistoquímica muestra numerosos puntos a favor como herramienta de diagnóstico, siendo utilizada ampliamente de forma rutinaria. En una muestra de tejido de un paciente con cáncer, la técnica de inmunohistoquímica facilita la determinación del tipo de tumor del que se trata. A veces el patólogo es capaz de reconocer mediante una simple tinción de hematoxilina-eosina la naturaleza de las células cancerosas, pero a menudo esto no es posible y la inmunohistoquímica permite localizar moléculas características para un cierto tipo de tumor en la superficie o en el interior de las células afectadas. Por ejemplo, si se dispone de anticuerpos específicos para la próstata que reaccionan positivamente en muestras de tejido tumoral procedentes del hueso, se puede decir que el tumor localizado en el hueso se trata de una metástasis de cáncer de próstata. La técnica de inmunohistoquímica intenta, además, predecir la progresión de un tumor. En un tejido tumoral se pueden detectar las células en crecimiento. Si se observa que el 80% de las células tumorales están dividiéndose, en oposición a otro tumor donde la tasa de crecimiento es del 10%, se puede predecir que la progresión del primer tumor será más rápida que la del segundo. En la terapia del cáncer, mujeres con tumores de mama que expresan los receptores de estrógenos pueden responder de forma positiva al tratamiento con un antagonista de estrógenos, bloqueando su efecto en las células tumorales. (Para una revisión sobre el tema, ver: Patient information on immunohistochemistry. <http://jeffline.tju.edu>).

La planificación de esta primera parte del trabajo se realizó teniendo en cuenta que parecía que estos anticuerpos funcionaban mejor en tejido congelado que en tejido embebido en parafina, de manera que el primer objetivo a conseguir fue la caracterización

de estos anticuerpos mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido congelado. Los tejidos disponibles en ese momento se trataban de muestras cedidas por el Dr. Ballarín de la Fundació Puigvert, en el caso del riñón, y por el Dr. Capellà del Institut Català d'Oncologia, en el caso del colon. Estas muestras habían sido tratadas de forma distinta. En el caso del colon, se trataba de cortes congelados y englobados en O.C.T, mientras que la muestra del riñón se trataba de una biopsia que fue fijada en paraformaldehído 4% inmediatamente después de su extracción. Una vez que el tejido fue fijado, una parte se trató para ser congelada y otra parte para incluirla en parafina.

3.1.1 Inmunofluorescencia indirecta

El proceso de preparación de la muestra es fundamental. El principal problema que presenta la fijación de las muestras es que no existe el fijador ideal, por lo que se trata de alcanzar un compromiso entre la conservación de la estructura tisular o celular y de la actividad antigénica de los epítomos. Las principales razones para elegir como fijador el paraformaldehído fueron, en primer lugar, la experiencia del grupo con los anticuerpos de los transportadores concentrativos de rata, utilizados en pruebas de inmunohistoquímica (Dragan y col. 2000). En segundo lugar, se trata de un fijador que ocupa un lugar central en la inmunohistoquímica ya que su acción es relativamente suave y parcialmente reversible, y se utiliza tanto en microscopía óptica como electrónica.

Pruebas previas al presente trabajo, realizadas por miembros de nuestro grupo, mostraban que los anticuerpos hCNT1a y hCNT2a no parecían funcionales en la técnica de Western, pero hCNT1a sí que reconocía específicamente el antígeno en inmunocitoquímica (Mata y col., 2001). Por estos motivos, hCNT2a no se probó en los primeros experimentos.

El protocolo desarrollado inicialmente fue la técnica de inmunofluorescencia indirecta en tejido congelado. Existen diferentes métodos de amplificación de la señal. El método directo trata de conjugar el anticuerpo primario a un sistema de detección. Es un método rápido pero poco sensible, de manera que sólo permite detectar aquellos antígenos muy abundantes en la muestra. Otro inconveniente es el encarecimiento de la técnica ya que si se utiliza este método se necesita disponer de todos los anticuerpos marcados con los que se vaya a trabajar. De todas maneras se utiliza bastante en microscopía confocal. En el método indirecto, el anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés no está marcado. En su lugar, otro anticuerpo denominado secundario que reconoce el primario se conjuga con el sistema de detección. Este sistema permite la amplificación de la señal, ya que al anticuerpo primario se le pueden unir más de un anticuerpo secundario, aunque se corre el riesgo de aumentar la inespecificidad. En nuestro caso, se ha utilizado la inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos hCNT1a, hENT1a y hENT2a generados en conejo y que son reconocidos por un secundario unido a

fluoresceína. Las primeras pruebas se realizaron en el colon, utilizando los sueros inmunizados como anticuerpo primario y los sueros no inmunizados como control negativo.

En general, cuando se han obtenido cortes por congelación, el pre-tratamiento con detergentes no es estrictamente necesario. A pesar que su utilización se desaconseja en la localización de antígenos unidos a membrana, en nuestro caso añadir un paso de permeabilización con tritón parecía lo correcto. Cuando se utilizaba el anticuerpo hCNT1a no era necesario utilizar ningún mecanismo de permeabilización ya que el epítipo que reconoce es extracelular.

Para la caracterización de estos anticuerpos en tejido congelado, se desarrolló el protocolo descrito en la figura 23 para inmunofluorescencia indirecta a partir de una serie de pruebas. Estos anticuerpos funcionan muy bien en este tipo de preparación. En esta tesis se ha trabajado con las IgGs de los anticuerpos policlonales, no con el suero, ya que las imágenes obtenidas de esta manera son más limpias.

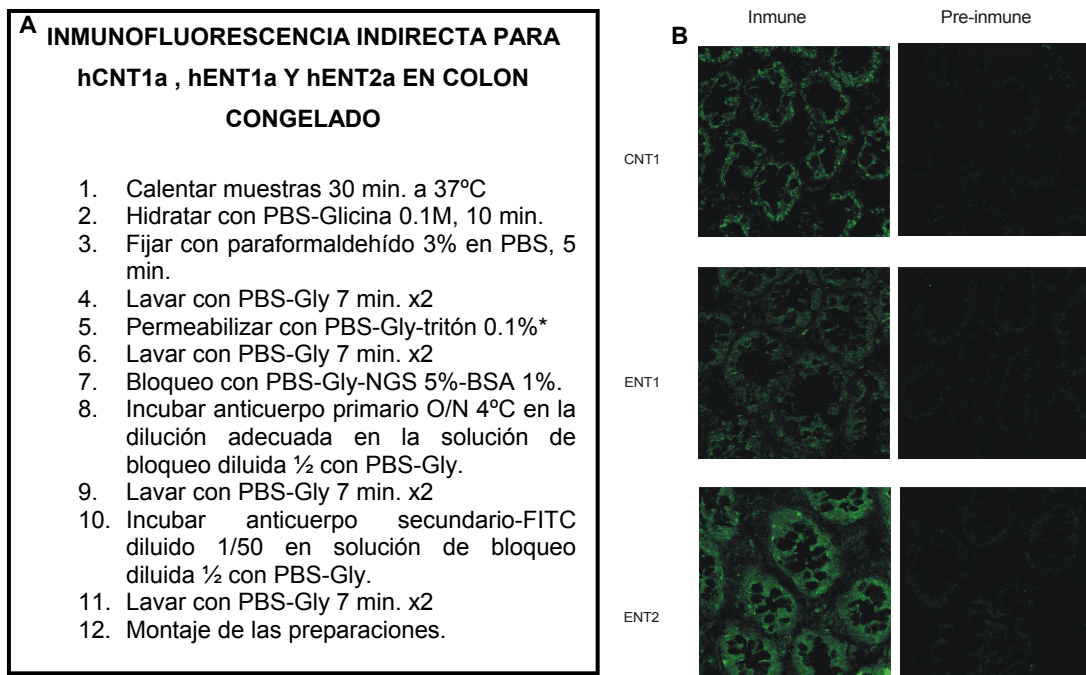


Figura 23: **A)** Protocolo desarrollado para la localización mediante inmunofluorescencia indirecta de hCNT1, hENT1 y hENT2. **B)** Resultado de la inmunolocalización con fluorocromos de hCNT1, hENT1 y hENT2 en muestras de colon congeladas

La técnica de fluorescencia tiene una serie de limitaciones como la necesidad de disponer de un microscopio especial, la dificultad de visualizar en detalle el ruido de fondo de las muestras o el hecho de que estas preparaciones no sean permanentes, a pesar de que existen procesos que retrasan la pérdida de fluorescencia. Estos problemas provocaron en el pasado la búsqueda de marcajes alternativos y se encontraron algunos enzimas que podrían sustituir a los fluorocromos, en particular la peroxidasa de rábano o HRP (Nakane y Pierce, 1966). Más adelante se introdujeron otros enzimas como la fosfatasa alcalina o la glucosa oxidasa. Todos estos enzimas producen precipitados de

color permanentes cuando reaccionan con algún sustrato determinado. Los resultados se visualizan mediante un microscopio óptico de campo claro, ya que muchos de estos precipitados son insolubles.

3.1.2 Método enzimático

Se trata de un método permanente o semi-permanente que se basa en un marcaje que produce una enzima en contacto con su sustrato dando lugar a precipitados de color y que son visibles en un microscopio óptico de campo claro. El método utilizado en nuestro caso se basa en la actividad de la peroxidasa de rábano (HRP), se trata de un protocolo un poco más largo que el basado en fluorocromos, pero amplifica extraordinariamente la señal y las preparaciones se pueden guardar durante mucho tiempo.

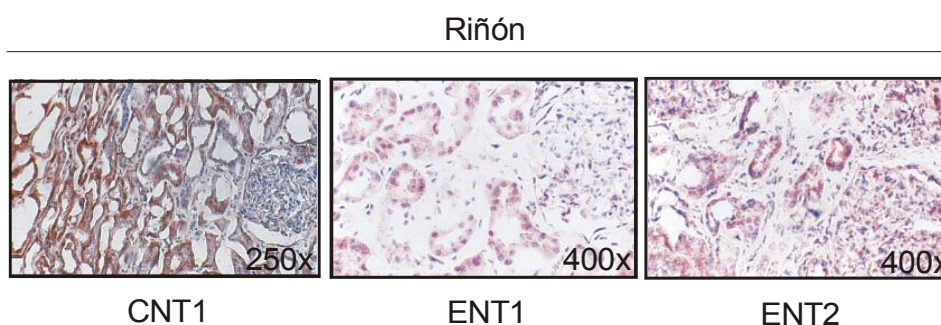


Figura 24: Cortes de riñón humano tenidos para el anticuerpo concentrativo hCNT1a y los dos equilibrativos hENT1a y hENT2a. El transportador concentrativo es el único que no marca el dómérulo.

**INMUNOLocalización ENZIMÁTICA PARA hCNT1a ,
hENT1a Y hENT2a EN MUESTRAS CONGELADAS**

1. Calentar muestras 30 min. a 37°C
2. Hidratar con PBS, 10 min.
3. Fijar con paraformaldehído 3% en PBS, 5 min¹.
4. Lavar con PBS 5 min. x2
5. Bloqueo peroxidasa endógenas con peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol. 30 min.
6. Lavar con PBS 5 min. x2
7. Permeabilizar con PBS -triton 0.1%²
8. Lavar con PBS 5 min. x2
9. Bloqueo con PBS-NGS 5%-BSA 1%.
10. Incubar anticuerpo primario O/N 4°C en la dilución adecuada en la solución de bloqueo diluida ½ con PBS.
11. Lavar con PBS 5 min. x2
12. Incubar anticuerpo secundario biotinilado diluido 1/200 en solución de bloqueo diluida ½ con PBS.
13. Lavar con PBS 5 min. x2
14. Incubar con el conjugado HRP-estreptavidina diluido 1/250 en PBS.
15. Lavar con PBS 5 min. x2
16. Revelar con aminoethyl carbazole substrate.
17. Contraste con hematoxilina.
18. Montaje de las preparaciones.

¹ Solo para preparaciones sin fijar
³ Con hCNT1a se descartan los pasos 11 y 12

Figura 25: Protocolo optimizado de inmunohistoquímica enzimática para los anticuerpos hCNT1a, hENT1a y hENT2a.

En la figura 24, se muestra el marcaje obtenido para los tres anticuerpos hCNT1a, hENT1a y hENT2a en cortes de corteza renal humana congelada. En las tres imágenes se puede apreciar un corpúsculo renal, que en caso de hCNT1 muestra un ligero artefacto de retracción, con lo que se demuestra claramente el espacio de Bowman. Estos corpúsculos renales están rodeados por túbulos contorneados, que en su mayoría suelen ser proximales, ya que el túbulo contorneado proximal es mucho más largo que la porción contorneada del túbulo distal. En todos los casos se observa un marcaje de los túbulos renales, mientras que hCNT1 es el único que no muestra una señal en el glomérulo. La intensidad de la señal con hENT1a no permite apreciar claramente, en la figura, el marcaje generalizado que se observa en la preparación.

En cuanto al anticuerpo de hCNT2, se han conseguido resultados en muestras congeladas con el segundo de estos anticuerpos generado por nuestro grupo. Se tuvo que incluir un paso con proteinasa k en la IHQ con el fin de desnaturalizar las proteínas, antes de bloquear las uniones inespecíficas. Esto nos permitió obtener los resultados que buscábamos. La concentración de la proteinasa k que nos funciona es 10-20 $\mu\text{g/ml}$ durante 10-20 minutos.

En la figura 26 se observan centros germinativos de nódulos linfáticos que son negativos para hCNT2, mientras que se puede apreciar una señal positiva en lo que probablemente corresponde al epitelio.

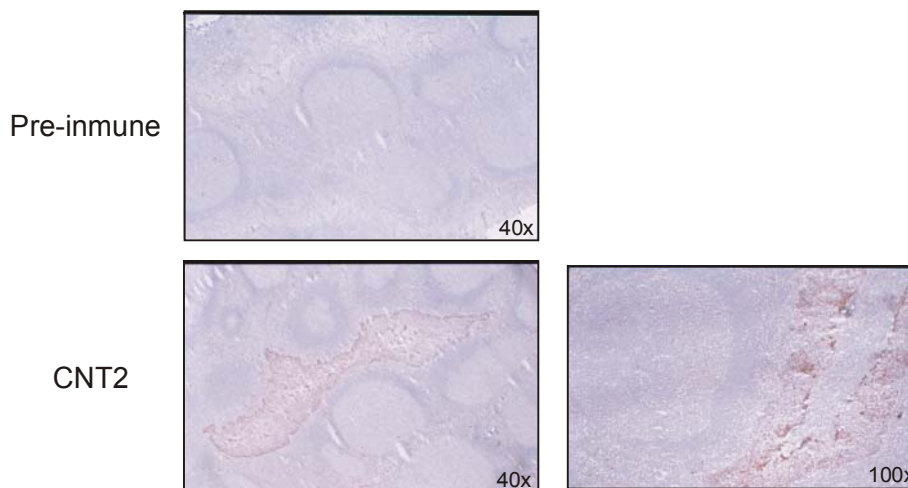


Figura 26: Marcaje con CNT2b en amígdala. Arriba izquierda, control negativo con el suero pre-inmune. Abajo, visión del marcaje en el tejido a diferentes aumentos.

3.1.3 Comprobación de la especificidad de los anticuerpos por inmunocompetencia

En este momento nos interesaba saber si el marcaje que se observaba en los tejidos era específico o no. De esta manera, se realizaron pruebas de inmunocompetencia, pre-incubando el anticuerpo primario hCNT1a con el antígeno contra el que iba dirigido

dicho anticuerpo. Si se conseguía desplazar o disminuir considerablemente la marca del anticuerpo podríamos entender que la señal observada era específica. Se hicieron diferentes pruebas de incubación variando el tiempo, la temperatura y la concentración del antígeno. En un principio, las soluciones con antígeno y anticuerpo se mantenían en hielo o a temperatura ambiente a diferentes tiempos que variaron entre 1 y 12 horas. Las condiciones que finalmente funcionaron para este anticuerpo en colon congelado y posteriormente para hENT1a y hENT2a en muestras de amígdala congelada, cedidas por la Dra. Colomer del Hospital Clínic, fueron las de incubar antígeno y anticuerpo toda la noche a temperatura ambiente. Para asegurarnos que no se trataba de una pérdida de actividad de los anticuerpos, se añadió un control positivo con anticuerpo primario, pero sin el antígeno y otro negativo con el suero pre-inmune.

En la figura 27 se muestra, en la imagen de la derecha, el resultado de la incubación del anticuerpo anti-hCNT1a con su antígeno donde la señal está totalmente desplazada. En cambio, el control positivo, a la izquierda, mantiene la señal del transportador de nucleósidos concentrativo. Estas imágenes corresponden a un corte transversal de colon humano, en las que se pueden apreciar las criptas de Lieberkún en la lámina propia de la mucosa.

CNT1

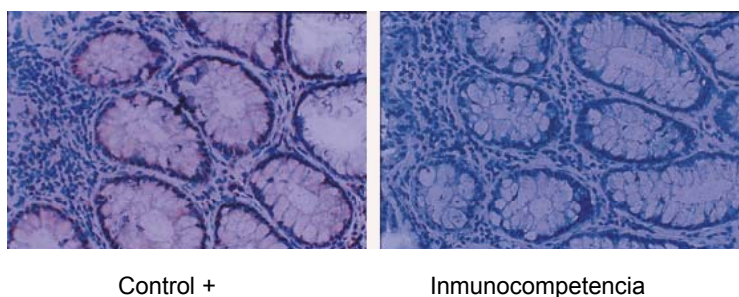


Figura 27: Inmunocompetencia para hCNT1a en colon humano. En la imagen de la derecha se puede observar como se ha perdido el reconocimiento del anticuerpo por la proteína CNT1.

En la figura 28, también se muestran las imágenes de las inmunocompetencias, en este caso con los anticuerpos contra los transportadores equilibrativos hENT1a y hENT2a. El resultado es el mismo que con hCNT1, de manera que se pierde casi por completo la detección de la expresión de ambos transportadores. Las muestras corresponden a cortes transversales de amígdala donde, a pesar de no apreciarse una estructura muy definida, se pueden distinguir los centros germinativos de los nódulos linfáticos.

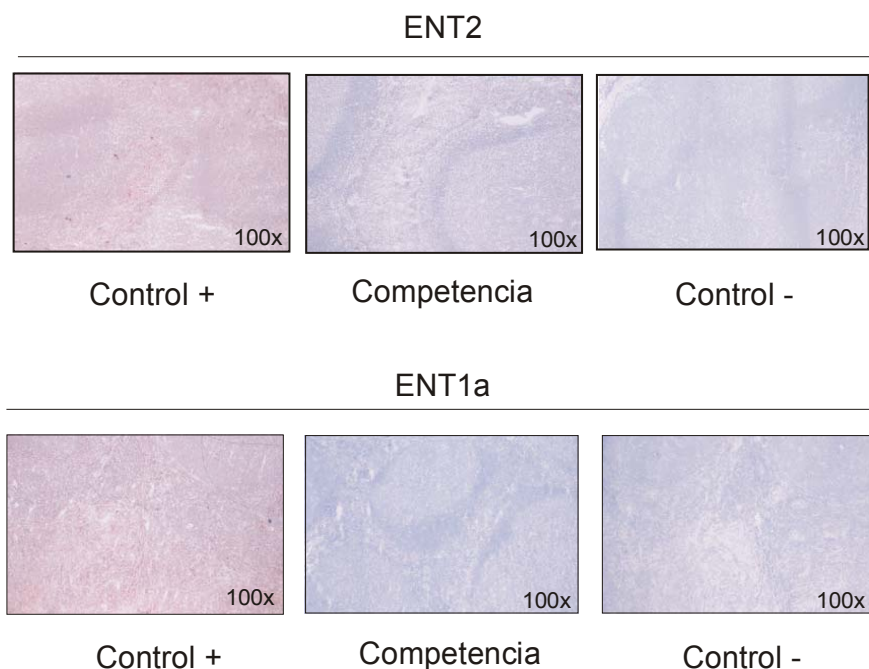


Figura 28: Inmunocompetencia en amígdala congelada con los anticuerpos contra las isoformas humanas equilibrativas de los transportadores de nucleósidos hENT1a y hENT2a.

3.2 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO ENGLOBADO EN PARAFINA

Las muestras englobadas en parafina mantienen mejor la estructura de los tejidos que las muestras congeladas, aunque el protocolo de inmunohistoquímica, normalmente, requiere un tratamiento adicional con el fin de mejorar la accesibilidad del anticuerpo a su epítipo. Este desenmascaramiento de antígenos se realiza habitualmente con calor y se trata de encontrar las condiciones de temperatura, tiempo y tipo de tampón, que ofrezcan mejores resultados. En la tabla 3, se muestran los métodos probados para los diferentes anticuerpos. Se ha intentado encontrar un método apropiado para todos ellos.

Método	Tiempo	Tampón
Microondas	Hasta hervor y repetir.	Citrato 10 mM pH 6
Placa calefactora	Hasta hervor y mantener 10 min.	Citrato 10 mM pH 3
Vaporizador	Al hervir, colocar las muestras. Mantener 25 min.	Tris-HCl 0.1 M pH 9 con 5% urea EDTA 1M pH 8

*En negrita, el método y tampón idóneos

Tabla 3: Combinaciones de métodos de desenmascaramiento y tampones para hCNT1, hENT1 y hENT2

En la figura 29, se muestra el marcaje para hCNT1a en muestras de colon incluidas en parafina. Las imágenes muestran la mucosa, donde se encuentran epitelio,

lámina propia y las criptas de Lieberkún que se extienden hacia abajo hasta la muscular de la mucosa. A continuación se encuentra la submucosa que es una zona muy vascularizada con numerosos vasos sanguíneos. En la imagen del centro, se puede observar un marcaje más intenso de las criptas que va disminuyendo a medida que nos acercamos a la muscular de la mucosa, donde la tinción con dicho anticuerpo es negativa. También se puede apreciar el sistema MALT o tejido linfoide asociado a la mucosa, con tinción positiva. Tampoco se detecta señal en la submucosa y en la capa circular interna de la muscular de la mucosa. La imagen de la izquierda de la figura 29 es una visión aumentada de la mucosa de colon, donde se observa una tinción más intensa en el epitelio de revestimiento. La lámina propia que contiene muchas células linfoides también es positiva para hCNT1, aunque la señal no está tan acentuada.

CNT1

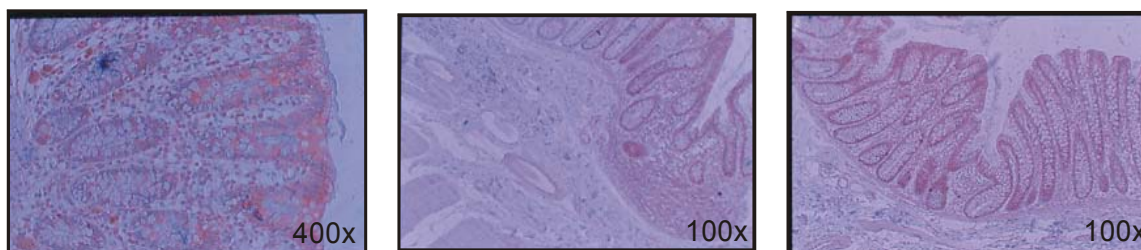


Figura 29: Marcaje de hCNT1a en muestras sanas de colon en parafina. Se aprecia el marcaje en las criptas y el epitelio de la mucosa y en el sistema MALT.

En la figura 30, podemos ver tejido sano y tumoral en una misma fotografía correspondiente a un carcinoma colorrectal. Es interesante apreciar que el tejido sano es positivo para hCNT1, mientras que el tumoral ha perdido la expresión, de la misma manera que ocurría en estudios previos con los anticuerpos contra las isoformas de rata en modelos de hepatocarcinogénesis (Dragan y col., 2002)

CNT1

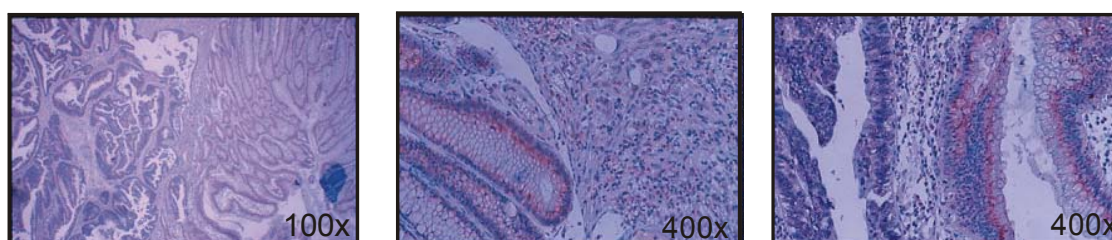


Figura 30: Marcaje de hCNT1a en muestras con tejido tumoral y sano. El marcaje positivo para hCNT1 en el tejido sano se pierde en la zona tumoral.

En la figura 31, se puede observar el mismo tejido de carcinoma colorrectal, perteneciente a dos cortes seriados de la preparación anterior. En este caso, se trata de fotografías pertenecientes a una inmunohistoquímica con los anticuerpos hENT1a y hENT2a. La imagen A corresponde al anticuerpo hENT2a y se puede apreciar una señal generalizada tanto en el tejido sano como en el tumoral. Las imágenes B, C y D pertenecen al anticuerpo hENT1a. El tejido sano expresa el transportador equilibrativo, pero se pierde su localización en el frente invasivo del tumor (B). Cuando nos alejamos del tejido normal, las células cancerosas dan una tinción positiva para este anticuerpo (C). El panel D muestra una imagen aumentada del tipo de marcaje localizado para la actividad de transporte es en el tejido sano.

En la extensión de los tumores ocurren varios procesos moleculares como la adquisición o pérdida de moléculas de adhesión, la secreción de enzimas proteolíticas, aumento de la proliferación y la iniciación de la angiogénesis que ocurren en el frente invasor del tumor. Se ha hipotetizado que características moleculares o morfológicas en esta área del tumor de varios carcinomas pueden reflejar el pronóstico de un tumor mejor que otras partes (Bryne y col., 1998).

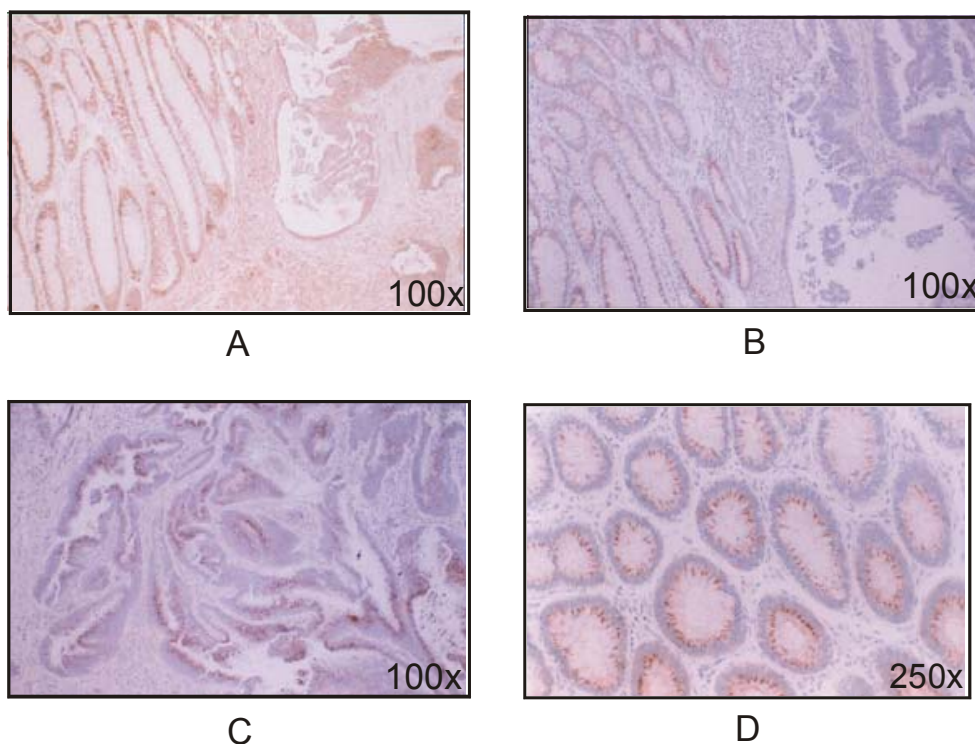


Figura 31: (A) Vista de carcinoma colorrectal con tejido sano para hENT2a. (B) Vista de carcinoma colorrectal con tejido sano para hENT1a. (C) El mismo tejido tumoral de B más alejado de las células sanas. (D) Tipo de marcaje de hENT1 en el tejido sano.

Estos anticuerpos fueron enviados a la Klinikum Kassel (Kassel, Alemania), donde se acabó de comprobar su especificidad. El protocolo utilizado en Kassel es muy similar al

nuestro. La diferencia es el método de amplificación de la señal. Se trata de un sistema muy sensible denominado EnVision™+ (Dako). Se trata de una técnica de dos pasos en la que tras la adición del anticuerpo primario, se añade un polímero conjugado en pasos secuenciales (Chilosi y col. 1994). Este conjugado consiste en un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario unidas directamente a una columna de dextrano activada (figura 32). Cuando se compara este método nuevo con los clásicos, anteriormente citados, se resuelve que el sistema de EnVision™+ es fácil de usar y evita la posibilidad de que las moléculas endógenas de biotina interfieran, además de que, al ser un sistema mucho más sensible, se ahorra en anticuerpo primario aumentando la dilución de trabajo (Sabattini et al, 1998). En el diagnóstico intraoperativo es muy importante la rapidez de la técnica de inmunohistoquímica. Se han publicado gran variedad de protocolos sobre técnicas rápidas en tejido congelado (Poletti y col. 1987; Chilosi y col., 1994; Richter y col., 1999), pero la mayoría de métodos descritos tienen la desventaja de tardar más de 20 minutos en realizarse o requieren los anticuerpos primarios directamente marcados. Con el sistema EnVision™+, mediante algunas modificaciones del método original, se ha llegado a realizar todo el proceso en menos de trece minutos, lo que representa una herramienta potencialmente muy útil en el diagnóstico intraoperativo con preparaciones congeladas (Kämmerer y col., 2001).

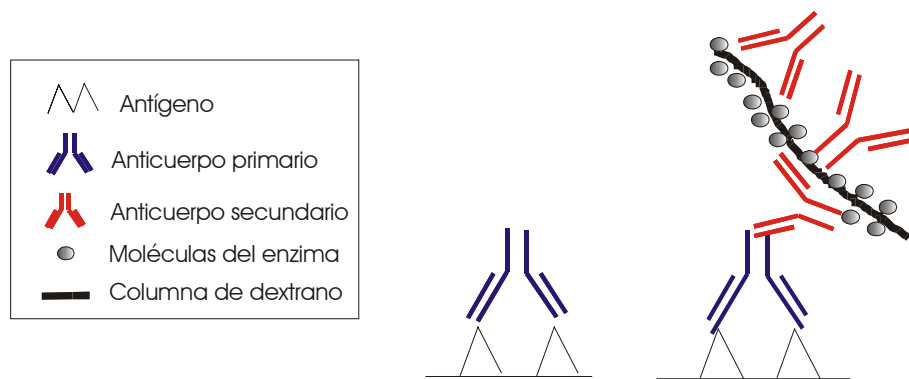


Figura 32: Esquema del sistema de visualización EnVision™+

En la figura 33 se muestra un ejemplo de marcaje en el hígado mediante este sistema realizado por el Institute of Pathology de Kassel. En esta imagen se puede observar la marca positiva con hCNT1a tanto en los hepatocitos como en el conducto biliar.

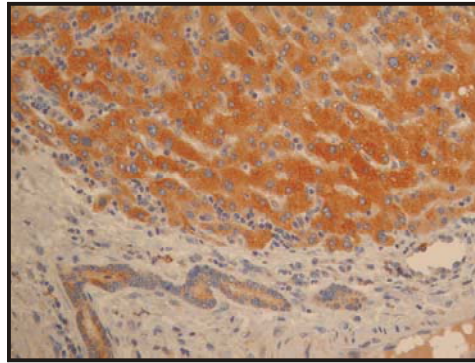
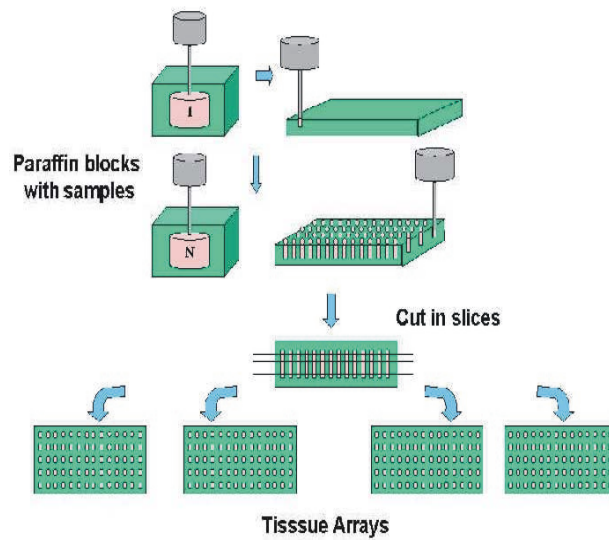


Figura 33: Muestra incluida en parafina de hígado sano con conducto biliar marcados con hCNT1 mediante el sistema EnVision™.

3.2.1 Matrices de tejidos

Uno de los problemas de la técnica de inmunohistoquímica es la difícil manipulación de una gran cantidad de muestras, incluso mediante un sistema automatizado. Se necesitan numerosas preparaciones y grandes volúmenes de anticuerpo, ya que sólo se dispone de un tejido por cada portaobjetos. El desarrollo de matrices de tejido o *multi tissue arrays* (TMA) ofrece información de hasta 1000 muestras a la vez en un único experimento. La construcción de los TMA consiste en la adquisición de muestras mediante un cilindro, de unos 0.6 milímetros de diámetro, que atraviesa un bloque de tejido incluido en parafina. Los bloques de tejidos donantes deben ser histológicamente representativos y de un mínimo de 1mm de grosor. Bloques antiguos de hace 20-40 años pueden ser utilizados si han sido fijados en formalina al 4%. Si el diámetro de la muestra es de 0,6 mm y se deja un espacio de 0.8 mm entre cada una, el máximo número de muestras que se pueden incluir en un área de 45 x 25 mm es de 1000, pero se suelen disponer entre 400 y 800. Es necesario agujerear con los cilindros los bloques de parafina donantes y colocarlos en el nuevo bloque de parafina (Kallioniemi y col., 2001). Este proceso se repite mediante un mecanismo automatizado de precisión. Este nuevo bloque se corta de la forma tradicional mediante un micrótopo, obteniendo cortes seriados de todas las muestras incluidas en el TMA. La mayor parte del tiempo y esfuerzo en la construcción de estas matrices de tejidos se dedica a la búsqueda, organización, revisión patológica y procesamiento de las muestras de tejido que se van a incluir en la matriz. En la figura 34 se muestra un esquema del proceso de confección de los TMA.



biotic Área de Bioinformática y Salud Pública
Instituto de Salud Carlos III

Figura 34: Esquema representativo de la fabricación de las matrices de tejidos. Cientos de cilindros se incluyen en un mismo bloque de parafina para agruparlos y disponerlos en un solo portaobjetos.

En este proyecto, hemos utilizado algunos de los TMA confeccionados en el CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) y por el Institute Kassel (Kassel, Alemania). Estas construcciones son unas herramientas muy útiles para el análisis rápido y eficaz de un gran número de tejidos incluidos en parafina (Kononen y col., 1998). En la figura 35 se muestran algunos ejemplos de tejidos incluidos en una de las matrices teñidas para hCNT1. Básicamente la tinción positiva para estos tejidos se localiza en epitelios, como en las papilas linguales, lobulillos de la glándula mamaria (pero no en el tejido conectivo de alrededor) glándulas endometriales o túbulos contorneados del riñón.

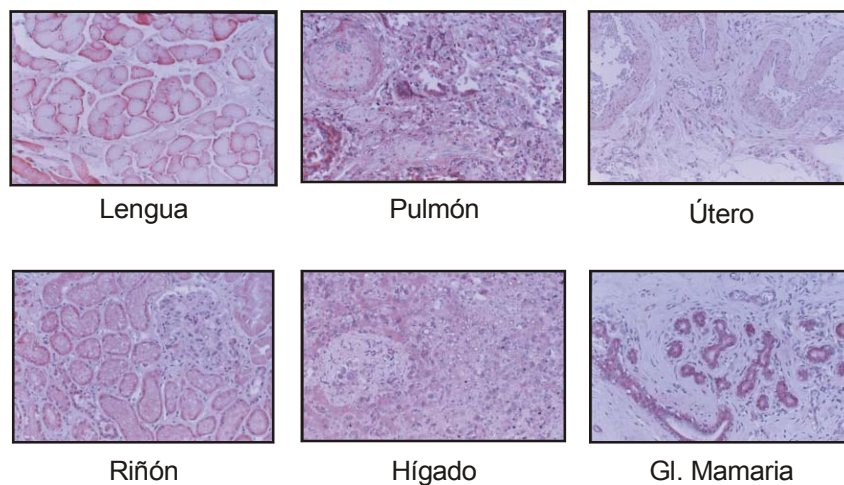


Figura 35: Marcaje de hCNT1 en una serie de tejidos sanos incluidos en un TMA.

3.3 CARACTERIZACIÓN POR WESTERN-BLOT

3.3.1 hENT1 y hENT2

Como se muestra en la figura 36, hENT1 y hENT2 son reconocidos como bandas únicas de 50-55 kDa en riñón, células Caco-2 así como en un panel de líneas celulares derivadas de adenocarcinomas pancreáticos, de los que se sabe que muestran actividades de transporte conducidas por hENT1 y hENT2. Estas bandas no se detectan cuando se utiliza el suero pre-inmune de los mismos conejos que los anticuerpos primarios.

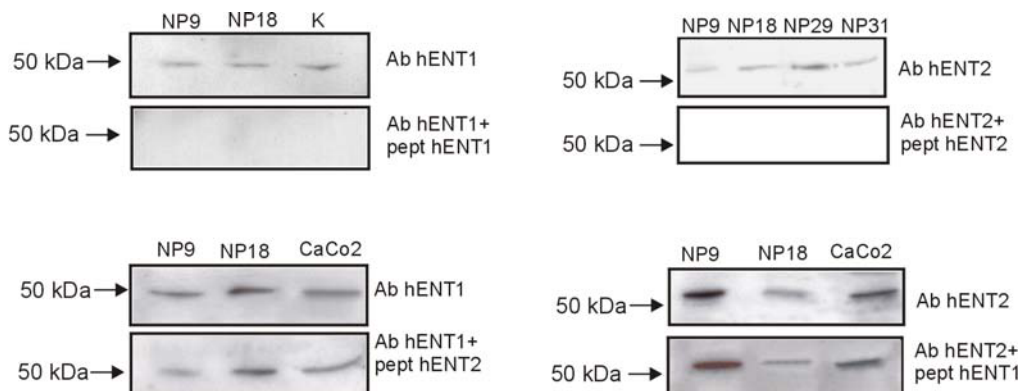


Figura 36: Análisis de la especificidad de las bandas detectadas mediante Western-blot por los anticuerpos hENT1 y hENT2 (20 μ g de proteína, dilución del anticuerpo 1/2000). Como se puede apreciar, no existe reconocimiento cruzado entre ambos anticuerpos.

De hecho, la inmunoreactividad de hENT1 y hENT2 se pierde completamente cuando los anticuerpos se pre-incubaban de forma separada (toda la noche a 4°C) con una concentración en exceso de los péptidos correspondientes, diseñados y utilizados como antígenos para la inmunización del conejo. Para demostrar que no existe una reacción cruzada entre ambos anticuerpos, se pre-incubó el anticuerpo de hENT1 con el péptido de hENT2 y viceversa, y los resultados son confirmatorios de que las secuencias elegidas para la producción de anticuerpos no muestran ninguna homología entre ambas isoformas ni tampoco entre las otras proteínas ENT (ENT3 y ENT4).

3.3.2 CNT1 y CNT2

El anticuerpo de CNT2 reconoce dos bandas en Western-blot, una a 50 kDa y la otra a 70 kDa. Para asegurarnos la especificidad de la señal, realizamos otra prueba de inmunocompetencia de forma que se consiguió desplazar únicamente la banda de 70 kDa indicándonos que la de 50 kDa es inespecífica (figura 37).

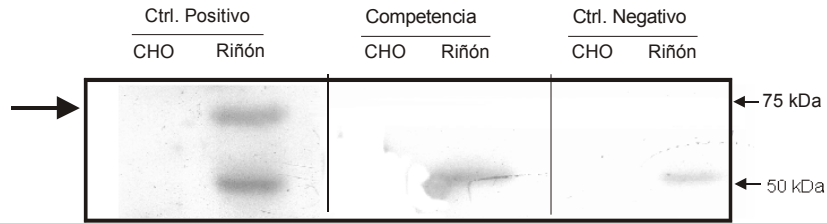


Figura 37: Western de inmunocompetencia con el anticuerpo hCNT2b (20 μ g prot y dilución del anticuerpo 1/2000)

En el caso de hCNT1, este anticuerpo reconoce una banda de un peso de unos 60 kDa. En la figura 38 se muestra un western a partir de proteína de membrana extraída de la línea celular MDCK, que apenas expresa hCNT1, y la misma línea celular parental transfectada con hCNT1 en presencia y en ausencia de butirato de sodio. El butirato de sodio nos permite sobreexpresar la proteína transfectada para poder apreciar mejor la señal en la membrana de western, pero, como se observa en la figura, en nuestro caso no hubiera sido necesario ya que la señal se aprecia claramente sin añadir este inductor.

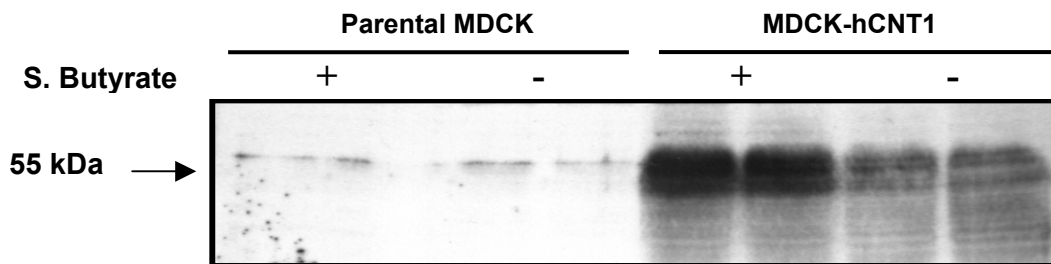


Figura 38: Western blot con el anticuerpo CNT1 en muestras de la línea MDCK, parental y transfectada con el ADN de hCNT1. Para incrementar la expresión de la proteína en algunas muestras se ha realizado un tratamiento con butirato sódico.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS hCNT1, hENT1 Y hENT2 EN TUMORES GINECOLÓGICOS Y DE MAMA

Una misma célula puede coexpresar varias isoformas de los transportadores de nucleósidos y este patrón de expresión parece depender del estado de diferenciación y/o transformación celular. Estudios realizados en nuestro laboratorio con células parenquimales hepáticas revelaron una actividad de transporte concentrativa (Ruiz-Montasell y col., 1992) que concuerda con la expresión de al menos dos sistemas de transporte complementarios (Mercader y col., 1996). Sabemos que el hepatocito expresa tanto la isoforma CNT1 como CNT2 (Felipe y col., 1998), mientras que los niveles de actividad de los transportadores equilibrativos son minoritarios; en cambio, estos transportadores equilibrativos, principalmente ENT1, cobran mayor importancia cuando se analiza la línea celular FAO derivada de hepatoma de rata (del Santo y col., 1998). La generación de los anticuerpos contra las isoformas de rata ha permitido confirmar estos niveles de expresión diferencial entre células tumorales y sanas mediante la técnica de inmunohistoquímica en dos modelos de hepatocarcinogénesis en rata, uno inducido químicamente y otro transgénico, donde la expresión de CNT1 y CNT2 se pierde casi por completo en el tejido tumoral a diferencia del sano, que mantiene una elevada expresión de ambas proteínas (Dragan y col., 2000). Ésta fue la primera evidencia de que un tumor puede condicionar la pérdida selectiva de estas isoformas de transportadores de nucleósidos con lo que sería de esperar que la bioasequibilidad de los fármacos que son sustratos de este transportador se encuentre alterada.

Recientemente se ha visto que CNT1 y ENT1 son capaces de internalizar fluoropirimidinas ampliamente utilizadas en la quimioterapia del cáncer, como la gemcitabina (Mackey y col, 1998; Lostao y col. 2000). Mackey y colaboradores realizaron un estudio mediante microinyección de oocitos con ADNc de los transportadores de nucleósidos donde observaron que tres de los cuatro miembros analizados de estas proteínas (CNT1, ENT1 y ENT2) son capaces de transportar gemcitabina, mientras que CNT2 no lo es, y que la afinidad y capacidad de transporte es muy variable dependiendo de cada transportador (Mackey y col., 1999). Con una metodología parecida, nuestro laboratorio ha demostrado que el 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'DFUR), un metabolito intermediario activo de la capecitabina, es sustrato del transportador hCNT1 (Mata y col., 2001). Estudios muy recientes en nuestro laboratorio han examinado los patrones de expresión de los transportadores de nucleósidos en pacientes con leucemia linfática crónica (CLL) y los han correlacionado con la citotoxicidad derivada del tratamiento con fludarabina, poniendo de manifiesto que los transportadores equilibrativos son los

principales responsables de la acumulación de este fármaco en las células de CLL (Molina-Arcas y col., 2002).

El tratamiento de tumores ginecológicos implica principalmente el uso de derivados de platino y más recientemente, los taxanos han sido identificados como la clase de agentes quimioterápicos más efectiva. A pesar de esto, estudios clínicos han apuntado que tratamientos combinados de gemcitabina y otros agentes como oxiplatino o paclitaxel presentan una actividad antitumoral prometedora en pacientes con carcinoma de ovario (Iaffaioli y col., 2000; Faivre y col., 2002; Pfisterer y col., 2005). Asimismo, se ha visto que la gemcitabina puede ser activa como un único agente, además de en combinación con otros fármacos en carcinomas de ovario, principalmente en el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario recurrente (para una revisión consultar Fruscella y col., 2003). En el caso de cáncer de mama, el uso de análogos de nucleósidos como la gemcitabina y la capecitabina ha cobrado mucha importancia y actualmente se utilizan de forma rutinaria en quimioterapia. En particular, la gemcitabina presenta actividad en el cáncer de mama utilizada en terapias de primera línea cuando hay metástasis (Possinger, 1995; Carmichael y Walling, 1996), mientras que la capecitabina tiene actividad en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastático tras un tratamiento ineficaz con taxanos o antraciclinas (Blum y col., 1999). Estos medicamentos son de los pocos fármacos activos en pacientes con cáncer de mama metastático (MBC) tras fallo de terapias con antraciclinas y taxanos que están dando lugar a resultados satisfactorios (Morabito y col., 2003; Lorusso y col., 2003; Andres y col., 2005). En tumores de mama la capecitabina tanto se aplica tanto como único fármaco como en tratamientos combinados y se ha señalado que tiene una menor toxicidad cuando se compara con 5-FU (McKendrick y Coutsouvelis, 2005).

El hecho de disponer de una serie de muestras de pacientes con tumores ginecológicos y de mama y de anticuerpos contra las isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos nos llevó a realizar los siguientes estudios sobre la expresión de estas proteínas, ya que las evidencias descritas anteriormente permiten pensar que la presencia de estos transportadores de nucleósidos puede condicionar la biodisponibilidad de los fármacos que son sustratos de estas proteínas, así como su toxicidad, por lo que pueden estar implicados en la respuesta tumoral a los agentes quimioterapéuticos.

4.1 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CARCINOMAS DE OVARIO, ENDOMETRIO Y ÚTERO CERVICAL.

En la figura 39 se muestran los patrones de expresión de los tres transportadores de nucleósidos estudiados hCNT1, hENT1 y hENT2 en los subtipos histológicos de cáncer de endometrio, ovario y cervical. La inmunotinción de los tres transportadores se ha

valorado dentro de una escala de 0 a 2, correspondientes a expresión negativa, media y elevada. Esta figura ilustra diferentes intensidades de marcaje para las proteínas de los transportadores de nucleósidos en tumores representativos del total analizado, mostrando marcaje negativo (-), medio (+) y elevado (++) de la expresión de hCNT1 (paneles D e I, negativos; panel E, medio; and panel H, expresión elevada). A, B y C muestran cilindros de tumores de ovario: A, se trata del subtipo de célula clara de marcaje negativo para hCNT1; B es la imagen del subtipo endometrial teñido (++) para hENT1 y C es un ejemplo del subtipo seroso altamente positivo para hENT2. D, F y G muestran regiones ampliadas de los cilindros A, B y C, respectivamente. E corresponde a un marcaje medio en el subtipo de célula clara de ovario, mientras que H e I muestran una elevada expresión en un tumor cervical escamoso y un adenocarcinoma uterino de cervix negativo, para hCNT1. A nivel subcelular, se detectó la presencia de los transportadores en el citoplasma, esencialmente difuso y homogéneo en todos los tejidos. A pesar de esto, algunos casos mostraron una tinción granular en el citoplasma y trazas en la membrana celular.

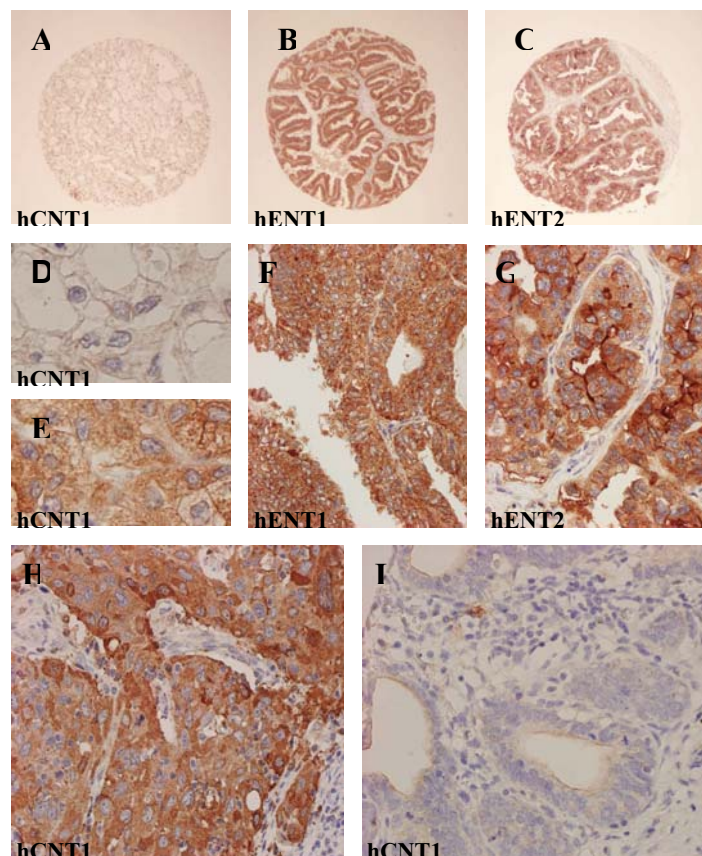


Figura 39: Patrones de expresión de los tres transportadores de hCNT1, hENT1 y hENT2 en los subtipos histológicos de cáncer de endometrio, ovario y cervical.

La tabla 4 muestra el número relativo y absoluto de los carcinomas analizados con expresión negativa, media y elevada para los tres transportadores. En los tres tipos de

tumores ginecológicos analizados, la isoforma cuya expresión fue inapreciable o nula más a menudo correspondió a hCNT1. Esto fue especialmente evidente en carcinomas de cérvix uterino, donde casi el 40% de los tumores (46 de 118) mostraron tinción negativa para esta proteína mientras que los tumores negativos para hENT1 y hENT2 no llegaron al 5% del total (4.2% y 1.7% respectivamente). Este patrón opuesto entre el transportador concentrativo y los equilibrativos también se encontró en los carcinomas endometriales y de ovario. De hecho, un total de 12 de 79 muestras, lo que corresponde a un 15% de tumores endometriales, fueron negativos para hCNT1, pero todos ellos retuvieron la expresión de los transportadores equilibrativos. Esta relación se invirtió cuando se evaluaron los tumores con tinción positiva intensa. El porcentaje de tumores que mostraron una elevada expresión de hCNT1 fue de un 9% en endometrio hasta un 33% en cérvix, mientras que de un 42 a un 66% de los tumores ginecológicos analizados mostraron una elevada expresión de hENT1. Estos resultados nos llevan a deducir que una elevada expresión de hENT1 y baja de hCNT1, parece ser relativamente común en tumores ginecológicos.

Tabla 4. Expresión de los NTs en tumores ginecológicos			
Carcinomas de ovario	Expresión		
	-	+	++
hENT1 (n =90)	8 (8.8 %)	41 (45.6 %)	41 (45.6 %)
hENT2 (n= 89)	14 (15.7 %)	54 (60.7 %)	21 (23.6 %)
hCNT1 (n = 90)	30 (33.3 %)	45 (50.0 %)	15 (16.7 %)
Carcinomas endometriales	Expresión		
	-	+	++
hENT1 (n = 80)	0 (0 %)	27 (33.8 %)	53 (66.2 %)
hENT2 (n = 78)	0 (0 %)	47 (60.3 %)	31 (39.7 %)
hCNT1 (n = 79)	12 (15.2 %)	60 (75.9 %)	7 (8.9 %)
Carcinomas de cérvix uterino	Expresión		
	-	+	++
hENT1 (n = 117)	5 (4.2 %)	63 (53.9 %)	49 (41.9 %)
hENT2 (n = 117)	2 (1.7 %)	55 (47.0 %)	60 (51.3 %)
hCNT1 (n = 118)	46 (39.0 %)	33 (28.0 %)	39 (33.0 %)

La evidencia de que la expresión de hCNT1 se pierde en un número mayor de casos que hENT1 o hENT2 constata resultados previos de nuestro grupo, ya mencionados anteriormente, que muestran una pérdida selectiva de las isoformas de CNT en dos modelos experimentales de hepatocarcinogénesis, uno inducido químicamente y el otro transgénico, donde la expresión de CNT1 se pierde por completo en el tejido tumoral respecto al sano (Dragan y col, 2000). Este resultado también es consistente con un trabajo mediante *dot-blot*s comerciales de ARN humano en el que se ha mostrado una expresión diferencial de los transportadores de nucleósidos entre tejido normal y tumoral de diferentes individuos, particularmente un descenso de la expresión en el tejido tumoral

de la mayoría de transportadores, aunque también una significativa retención de la expresión de hENT1 en tumores (Pennycooke y col., 2001). Anteriormente ya se había sugerido una elevada expresión del transportador ENT en tumores cuando no se disponía de anticuerpos apropiados y se había utilizado la elevada afinidad por la NBTI como índice del número de transportadores de ENT1 (Goh y col., 1995).

Según nuestra experiencia, los niveles de ARNm de CNT1 son extremadamente bajos en la mayoría de tejidos y por eso es difícil detectarlo mediante métodos convencionales. Aun así, el análisis de los perfiles de expresión en cáncer de ovario ha revelado algunos cambios menores en la expresión de los transportadores de nucleósidos (Welsh y col., 2001), particularmente un ligero descenso de los niveles de ARNm de hCNT1 y un moderado aumento de hENT1 en tejido tumoral respecto a sano. A pesar de estas evidencias, la función de los transportadores de nucleósidos y sus niveles de ARNm no correlacionan siempre, como se ha publicado recientemente en células de leucemia crónica, donde a pesar de que las células de pacientes con CLL expresan CNT1, CNT2, ENT1 y ENT2, la actividad de transporte está mediada principalmente por los transportadores equilibrativos (Molina-Arcas y col., 2003).

La observación de que muy pocos tumores ginecológicos son negativos para hENT1, de la misma manera que se ha observado para cáncer de mama (Mackey y col., 2002), es consistente con la visión de que las proteínas hCNT están relacionadas con la diferenciación, mientras que los hENTs, y particularmente hENT1, pueden colaborar en las necesidades celulares constitutivas y elementales de nucleósidos extracelulares. Existe un estudio muy reciente que correlaciona la falta de expresión de ENT1 en tumores de adenocarcinomas pancreáticos con una menor supervivencia en pacientes que han sido tratados con gemcitabina, aunque se ha de tener en cuenta que en el estudio sólo se han incluido 21 pacientes, de los cuales el 10% habían perdido la expresión de este transportador (Spratlin y col., 2004). Por otra parte, un análisis llevado a cabo en nuestro laboratorio por el Dr. José Manuel García-Manteiga pone de manifiesto que líneas derivadas de adenocarcinomas pancreáticos presentan mayoritariamente una elevada actividad de transporte mediada por hENT1, mientras que si se analizan los niveles de ARNm se observa una disminución o pérdida selectiva de los niveles de expresión de los transportadores concentrativos (García-Manteiga y col., 2003). ENT1 parece ser esencial en la proliferación de macrófagos, mientras que la expresión de los CNTs puede estar asociada con la activación celular y la apoptosis (Soler y col., 2001a, b). Esta dicotomía funcional entre ENT1 y CNTs puede también aplicarse a células epiteliales, donde la diferenciación de células epiteliales intestinales está acompañada de procesos de maduración del enterocito, dentro de los que se encuentra un transporte de nucleósidos concentrativo para su función última absorbente, en cambio, la inducción de la actividad equilibrativa se produce por un estímulo proliferativo (Aymerich y col., 2004).

4.1.1 Análisis de la expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en los diferentes subtipos histológicos de tumores ginecológicos

• Cáncer de ovario

Los tumores negativos (-) y positivos (+ y ++) para cada proteína transportadora (hCNT1, hENT1, y hENT2), se distribuyeron entre los cuatro subtipos histológicos conocidos de cáncer de ovario (seroso, mucinoso, endometriode y célula clara). Para cada transportador, se ha generado una tabla de contingencia en la que se muestra el número absoluto de tumores positivos y negativos para cada histotipo. La contribución relativa a la cantidad total de cilindros para cada subtipo histológico se muestra como porcentaje entre paréntesis. La significatividad estadística de cada tabla de contingencia se muestra como un valor de p para cada transportador.

Tabla 5. Expresión de los transportadores de nucleósidos en carcinomas de ovario divididos por tipo histológico					
hCNT1		Expresión			
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.016
	Total	%	Total	%	
Seroso	6	19.4	25	80.6	
Mucinoso	5	35.7	9	64.3	
Endometriode	1	10.0	9	90.0	
Célula clara	18	51.4	17	48.6	
hENT1		Expresión			
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.003
	Total	%	Total	%	
Seroso	0	0	31	100	
Mucinoso	0	0	14	100	
Endometriode	0	0	10	100	
Célula clara	8	22.9	27	77.1	
hENT2		Expresión			
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.034
	Total	%	Total	%	
Seroso	2	6.5	29	93.5	
Mucinoso	2	14.3	12	85.7	
Endometriode	0	0	10	100.0	
Célula clara	10	29.4	24	70.6	

• Cáncer de endometrio

Los tumores negativos (-) y positivos (+ y ++) para cada proteína transportadora (hCNT1, hENT1, y hENT2), se distribuyeron entre los tres subtipos histológicos conocidos de cáncer de endometrio (seroso, endometriode y célula clara). Para cada transportador, se ha generado una tabla de contingencia en la que se muestra el número absoluto de tumores positivos y negativos para cada histotipo. La contribución relativa a la cantidad total de cilindros para cada subtipo histológico se muestra como porcentaje entre paréntesis. El análisis estadístico sólo fue posible realizarlo para hCNT1, ya que todos los tumores endometrioides analizados fueron positivos para hENT1 y hENT2.

Tabla 6. Expresión de los transportadores de nucleósidos en carcinomas endometriales divididos por tipo histológico.					
hCNT1	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.119
	Total	%	Total	%	
Endometrioide	8	12.3	57	87.7	
Seroso	2	20.0	8	80.0	
Célula clara	2	50.0	2	50.0	
hENT1	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		
	Total	%	Total	%	
Endometrioide	0	0	66	100	
Seroso	0	0	10	100	
Célula clara	0	0	4	100	
hENT2	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		
	Total	%	Total	%	
Endometrioide	0	0	66	100	
Seroso	0	0	10	100	

● **Cáncer de cérvix uterino**

Tabla 7. Expresión de los transportadores de nucleósidos en carcinomas de cérvix uterino por tipo histológico					
hCNT1	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p < 0.001
	Total	%	Total	%	
Adenocarcinoma	35	54.7	29	45.3	
Célula escamosa	11	20.4	43	79.6	
hENT1	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.374
	Total	%	Total	%	
Adenocarcinoma	4	6.5	58	93.5	
Célula escamosa	1	1.8	54	98.2	
hENT2	Expresión				
Tipo histológico	Negativos		Positivos		Chi (χ^2) cuadrado p = 0.206
	Total	%	Total	%	
Adenocarcinoma	0	0	62	100	
Célula escamosa	2	3.6	53	96.4	

Los tumores negativos (-) y positivos (+ y ++) para cada proteína transportadora (hCNT1, hENT1, y hENT2), se distribuyeron entre los dos subtipos histológicos conocidos de cáncer de útero (adenocarcinoma y carcinoma celular escamoso). Para cada transportador, se ha generado una tabla de contingencia en la que se muestra el número absoluto de tumores positivos y negativos para cada histotipo. La contribución relativa a la cantidad total de cilindros para cada subtipo histológico se muestra como porcentaje entre paréntesis.

Uno de los hallazgos más interesantes de esta parte del trabajo con tumores ginecológicos es el hecho de que la pérdida de expresión de los transportadores de nucleósidos, especialmente hCNT1, se encuentra asociado con subtipos histológicos de peor pronóstico y esta relación ha sido estadísticamente significativa en muchos casos. La mayoría de los tumores de ovario negativos, considerando los tres transportadores a la vez, pertenecen al subtipo de célula clara, un tumor de ovario altamente agresivo y que requiere quimioterapia incluso en etapas tempranas (Young, 2003). Se trata de un cáncer que respecto a otros tumores de ovario epiteliales tiene un peor pronóstico, en parte debido a su nivel de resistencia frente a quimioterapias basadas en tratamientos con platino (Goff y col., 1996; Sugiyama y col., 2000). Cuando se compararon 44 pacientes con adenocarcinoma de célula clara en ovario con un grupo de 55 pacientes con adenocarcinoma seroso, teniendo en cuenta el estadio en el que se encontraban, los tumores de célula clara se asociaron con una supervivencia pobre en un margen de 5 años y en aquellos pacientes con cáncer recurrente, la afectación de los nódulos linfáticos fue mucho más común en los pacientes con este tipo de tumor (40% respecto al 7%). Estos tumores de célula clara parece que tienen un comportamiento clínico distinto comparado con los carcinomas serosos, presentando los primeros una mayor agresividad (Jenison y col., 1989)

El cáncer endometrial, en general, no parece estar asociado con una elevada pérdida de la expresión del transportador, pero todos los casos negativos que se han detectado corresponden a hCNT1. Aunque el número de carcinomas de célula clara endometrioides no es suficientemente elevado para una significatividad estadística, de nuevo, la mitad de estos tumores han sido negativos para hCNT1, mientras que el porcentaje de pérdida de este transportador en los otros dos subtipos histológicos, endometrioide y seroso, fue muy inferior que para los tumores de célula clara. Existen varios estudios dedicados a la búsqueda de características tumorales que puedan predecir la malignidad del tumor o la DFS, como por ejemplo la histología del tumor o el grado en que se encuentre. En pacientes con cáncer endometrial de grado II, parece ser que ambos parámetros son indicadores independientes de supervivencia libre de enfermedad o DFS (Lanciano y col., 1990).

La pérdida de la expresión de hCNT1 en los tumores cervicales ha sido muy elevada y además, muchos de estos tumores negativos pertenecen al subtipo histológico de adenocarcinoma, el cual se ha demostrado por varios estudios que son los tumores de cuello de útero con un peor pronóstico y los que presentan una respuesta más pobre a la quimioterapia, cuando se compara con los de célula escamosa (Lai y col., 1999; Nakanishi y col., 2000; Takeda y col., 2002). Un estudio con 1538 pacientes de cáncer cervical escamoso y 229 de adenocarcinoma muestra evidencias claras de que los pacientes con

adenocarcinoma de cérvix tienen un peor pronóstico que aquellos con tumores escamosos de un estadio y diámetro tumoral similar (Eifel y col., 1995).

Este análisis de expresión en tumores humanos de los transportadores de nucleósidos involucrados en el transporte de fármacos utilizados en quimioterapia ha permitido confirmar que la pérdida de expresión de CNT1 es mucho más común que en el caso de los transportadores equilibrativos, además de demostrar que la expresión de estas proteínas se correlaciona con el tipo histológico y que la pérdida de CNT1 se identifica con subtipos histológicos de peor pronóstico. Estos resultados pueden tener implicaciones terapéuticas, ya que los derivados de nucleósidos están siendo utilizados cada vez más en el tratamiento de tumores ginecológicos.

4.2 EXPRESIÓN DE hCNT1 EN TUMORES DE MAMA

La respuesta a quimioterapia de nucleobases o derivados de nucleósidos puede depender de una variedad de procesos celulares que incluyen el ciclo celular y la maquinaria apoptótica. Al mismo tiempo, estos fármacos anticancerígenos requieren procesos metabólicos, de manera que la forma activa del fármaco puede ser catabolizada. Las proteínas implicadas en estos procesos pueden ser relevantes para una apropiada respuesta a la terapia. Esto explica el interés en el estudio de biomarcadores del metabolismo de nucleótidos en tumores, de manera que se puedan encontrar mecanismos complementarios responsables de la resistencia a agentes quimioterapéuticos. Aunque se ha estudiado el análisis de ciertas enzimas de metabolismo de nucleótidos (Gasparini y col., 1995; Fox y col., 1997; Verweij, 1999; Ackland y Peters, 1999), el papel que juegan los transportadores de nucleósidos en respuesta a fármacos apenas se conoce. Muy recientemente, Spratlin y colaboradores han estudiado un grupo de 21 pacientes con adenocarcinoma pancreático que habían sido tratados con gemcitabina encontrando una correlación entre la expresión de hENT1 y supervivencia, de manera que aquellos pacientes que expresaban hENT1 mostraron una mayor supervivencia (Spratlin y col., 2004). En nuestro caso, los resultados que se muestran a continuación son indicativos de que hCNT1, por si solo, puede tener un valor de pronóstico de supervivencia y riesgo de recaídas en pacientes de tumor de mama.

La expresión de hCNT1 en tumores de mama, fue principalmente citoplasmática (68 pacientes), de los que además mostraron un ligero marcaje nuclear (36 de los 68) o un fuerte marcaje nuclear (22 pacientes). Un imagen representativa de las células mostrando ambos tipos de patrón de tinción se presenta en la figura 40 (paneles a y b).

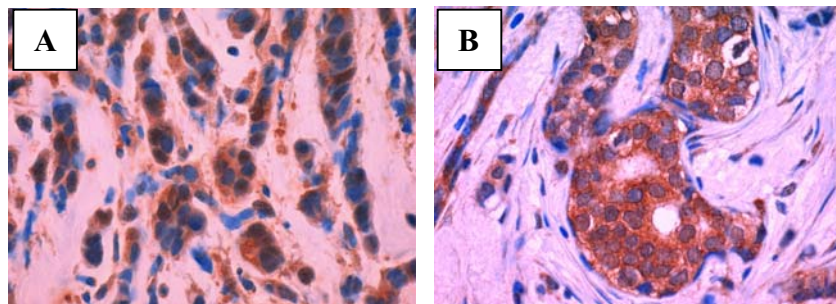


Figura 40: Patrones representativos del marcaje de hCNT1. En la imagen A se puede apreciar el tipo de marcaje nuclear y citoplasmático, mientras que la imagen B corresponde al tipo de tinción exclusivamente citoplasmático

La intensidad de hCNT1 fue frecuentemente moderada y el porcentaje de células tumorales positivas fue similar al encontrado para el marcador DPD (tabla 8). La tinción nuclear fue, en la mayoría de muestras, más intensa que la citoplasmática.

Aunque todos los tumores de cáncer de mama analizados mostraron algo de expresión de hCNT1, en este tipo de cáncer en particular se encuentra una variabilidad del porcentaje de células positivas, así como en su localización subcelular. Aunque hCNT1 es un transportador de membrana plasmática, se ha visto que un elevado porcentaje de la proteína se encuentra en estructuras intracelulares en otros tipos epiteliales (Dufloy y col., 2002), lo que puede explicar por qué muchas células, muestran una expresión de la proteína intracelular. La aparente localización nuclear de hCNT1 es nueva, aunque recientemente se ha demostrado un patrón de tinción nuclear en el caso de hCNT3 en células de leucemia linfática crónica (Mackey y col., 2005).

Además del transportador hCNT1, también se analizó la expresión de marcadores del metabolismo de nucleótidos, como son la timidina fosforilasa (TP), la timidilato sintasa (TS) y la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) (Figura 41, paneles a y b) y los marcadores tumorales ER, PR, MIB, HER2, p53 y bcl2. Todas las muestras presentaron un elevado porcentaje de células positivas de intensidad moderada para DPD y TP, mientras que para TS, el porcentaje de células positivas fue inferior que para los otros biomarcadores, aunque la intensidad de la señal fue mayor (tabla 8).

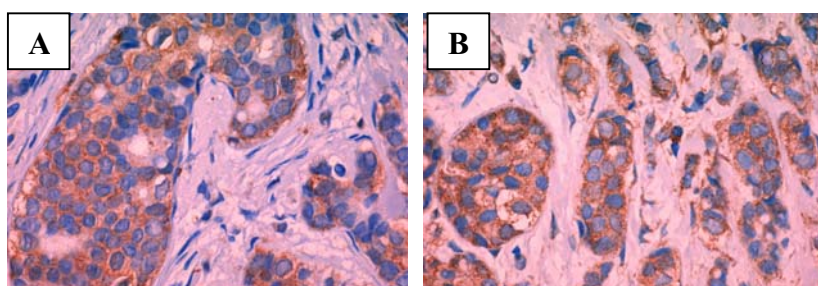


Figura 41: Patrones representativos de tinción para la los marcadores de nucleótidos TP (A) y DPD (B).

La variabilidad de la tinción de los tres marcadores del metabolismo de nucleótidos (TP, DPD y TS) y el transportador de nucleósidos hCNT1 se da como la media \pm SD de las células positivas en todos los tumores analizados y también, en un segundo término, como la media \pm SD de la intensidad alcanzada, basada en una escala de 0-3. Los tumores se definieron en base al porcentaje de células positivas para cada enzima del metabolismo de nucleótidos independientemente de la intensidad de señal. Respecto a los marcadores tumorales, se detectó un número elevado de tumores negativos para HER2 (87%) y p53 (69%), mientras que solamente el 27% de los tumores analizados fueron negativos para Bcl2. Alrededor del 40% de los tumores fueron negativos en el caso de ER, PR y MIB-I (tabla 8).

Marcadores tumorales			Marcadores del metabolismo de nucleótidos		
	Negativos	Positivos		% Células positivas	Intensidad
ER	42	48	TP	52 \pm 26	2.0 \pm 0.8
PR	39	51	DPD	68 \pm 24	2.0 \pm 0.6
MIB-I	34	56	TS	10 \pm 12	3.0 \pm 0.3
HER	79	11	hCNT1	74 \pm 20	2.3 \pm 0.6
Bcl2	25	65			
p53	62	28			

Tabla 8: A la izquierda se muestran los tumores positivos y negativos para los marcadores tumorales clásicos (ER, PR, MIB-1, HER2, bcl2 y p53). A la derecha se muestra la heterogeneidad del marcaje de los cuatro marcadores del metabolismo de nucleótidos (TP, DPD, TS y el transportador de nucleósidos hCNT1) como la media \pm SD de las células positivas de todos los tumores y también como la media \pm SD de la intensidad de marcaje, sobre una escala de 0 a 3.

El análisis de la expresión de hCNT1 en estos pacientes mostró una correlación positiva entre el porcentaje de células tumorales positivas para hCNT1 y la expresión de TP, DPD y HER2 y en menor grado con ER, mientras que no se encontró ninguna correlación significativa con TS. También se encontró una correlación negativa entre el patrón de expresión nuclear de hCNT1 y la expresión de MIB y bcl2 (tabla 9). Esto sería consistente con algún tipo de regulación coordinada entre hCNT1, TP y DPD, proteínas implicadas en el metabolismo de fármacos derivados de fluoropirimidinas en cáncer de mama, empezando por hCNT1, ya que sería el responsable de su transporte a través de la membrana plasmática. Esto puede ser particularmente relevante en la activación metabólica de la capecitabina, ya que su catabolito secundario, 5'-DFUR, es sustrato de

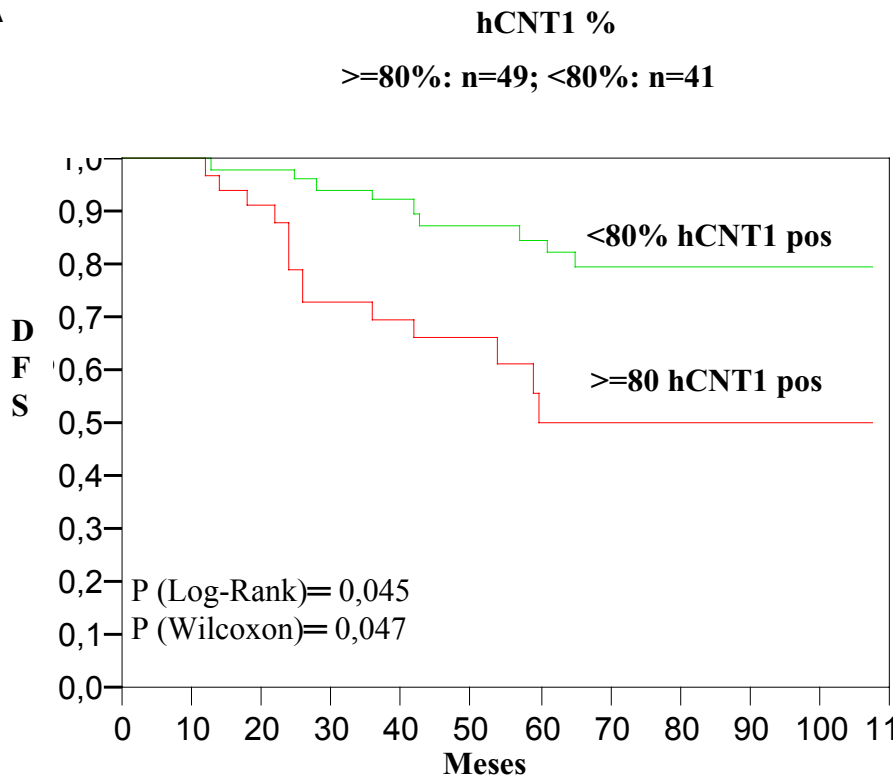
hCNT1 (Mata y col., 2001) y una vez ha entrado al interior celular, requiere una activación metabólica mediante la enzima TP para dar lugar a 5-FU en las células tumorales. La disponibilidad de 5-FU también depende de la expresión de la enzima responsable de su degradación, la DPD. A pesar de estos datos, los pacientes analizados en este estudio no fueron tratados mediante quimioterapia basada en fármacos derivados de fluoropirimidinas, sino que les fue administrado 5-FU, una nucleobase derivada de pirimidina que no es transportada por hCNT1 (Mata y col., 2001), ya que en el momento del tratamiento de estos pacientes, el régimen con fluoropirimidinas como la capecitabina o gemcitabina en cáncer de mama aun no se encontraba disponible.

Marcador tumoral	Porcentaje (<80% vs ≥80%)	Patrón citoplasmático vs nuclear
ER	+, $p = 0.072$	NS
PR	NS	NS
HER2	+, $p = 0.007$	NS
MIB	NS	-, $p = 0.001$
p53	NS	NS
Bcl2	NS	-, $p = 0.059$
TP	+, $p = 0.0002$	NS
DPD	+, $p = 0.0001$	NS
TS	NS	NS

Tabla 9: Correlación de la expresión de hCNT1 con otros marcadores del metabolismo de nucleótidos y algunos parámetros tumorales seleccionados.

Tanto el patrón de expresión de hCNT1 como el porcentaje de células positivas para hCNT1, fueron investigados como posibles correlaciones clínicas. La incidencia de la tinción nuclear de hCNT1, se asoció con una disminución de la DFS ($p=0.0089$, correlación Spearman Rank). Además, el porcentaje de células positivas para hCNT1 (superior a un 80%) parece que es indicativo de un peor pronóstico ($p=0.047$, test Wilcoxon; $p=0.045$, log rank; Figura 42 ,panel A). En aquellos pacientes que mostraron tumores de mama con un elevado porcentaje de células positivas para el transportador de nucleósidos, como fue el caso en aquellos pacientes con nódulos linfáticos positivos ($RR=2.09$; $p=0.026$, test Wilcoxon; $p=0.020$, log rank), se encontró un riesgo relativamente elevado ($RR=1.55$) de recaída. La combinación del estado del nódulo linfático con células positivas para hCNT1, reveló un elevado riesgo de recaída ($RR=3.01$; $p=0.003$, test Wilcoxon; $p=0.003$, log rank)(Figura 42, panel B).

Panel A



Panel B

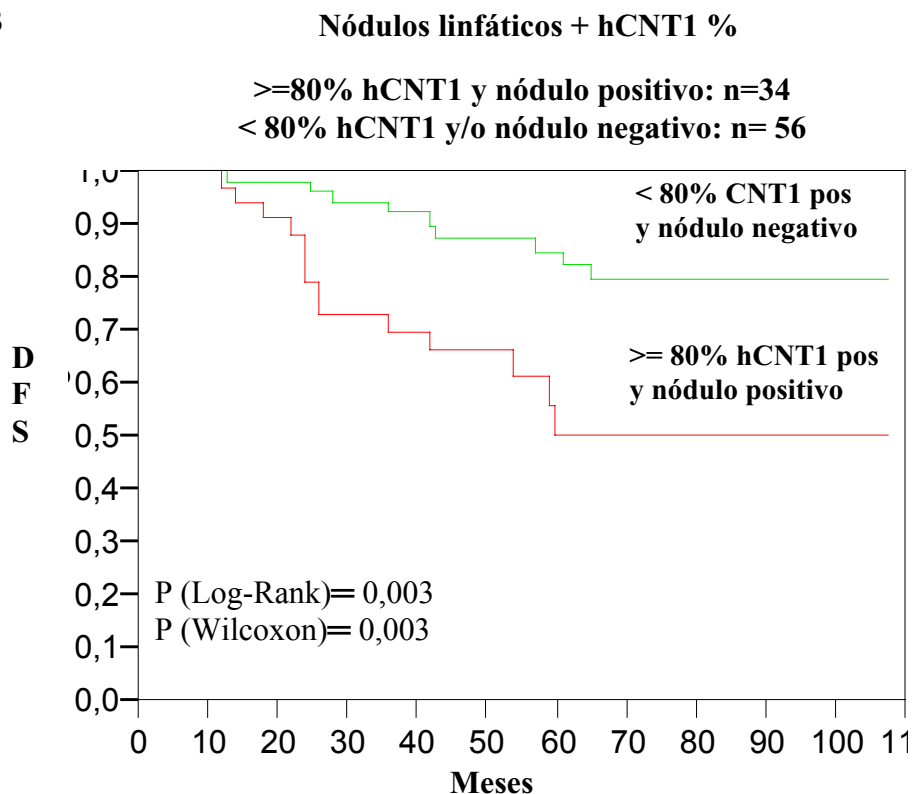


Figura 42. Curva de Kaplan-Meier de DFS y expresión de hCNT1. Se realizó un análisis de Kaplan-Meier para determinar si la expresión de hCNT1, basada en el porcentaje de células positivas (valor de corte del 80%), se correlacionaba con la DFS. El panel A muestra una correlación significativa utilizando exclusivamente la expresión de hCNT1 como marcador de pronóstico, mientras que el panel B combina la expresión de este transportador y el estado del nódulo linfático.

El porcentaje de células positivas para hCNT1 muestra una fuerte correlación con la expresión de HER2, un marcador que a menudo se asocia con un peor pronóstico (Pegram y col., 1998; Slamon y col., 1989). De hecho, la persistencia de la expresión de CNT1 se asocia con una reducción de la supervivencia a largo plazo y con riesgo de recaída. Además, la evidencia que el estado del nódulo linfático se correlaciona con este riesgo demuestra que el grupo de pacientes estudiado es representativo de la biología del cáncer de mama y comparable a estudios anteriores (Clark y McGuire, 1989). Estas correlaciones sugieren que las células con una elevada expresión del transportador pueden tener una mejor habilidad para metastatizar, ya que el parámetro de DFS se relaciona con la capacidad de invasión del tumor primario. Este índice combinado (expresión de hCNT1 y estado del nódulo linfático) ofrecen un mejor correlación con DFS que si se analizan hCNT1 y estado del nódulo linfático de manera independiente.

La explicación biológica para la relación entre el estado del nódulo linfático y la expresión de hCNT1 necesita ser desarrollada. En células en cultivo, la restauración de la función de hCNT1 da lugar a un aumento de la sensibilidad a nucleósidos derivados de fluoropirimidinas, como 5'DFUR y gemcitabina (Mata y col., 2001; García-Manteiga y col., 2003). Esto ocurre incluso aunque la mayoría de la proteína de hCNT1, detectada por análisis de FACS, se localice intracelularmente (García-Manteiga y col., 2003). Es posible que la actividad de transporte debida a la pequeña fracción de proteína que se encuentra ligada a la membrana plasmática sea suficiente para promover la vía de recuperación de nucleósidos por medio de este transportador, el cual interfiere con la acción de 5-FU en el metabolismo de nucleótidos intracelular. De esta forma, el papel que juega hCNT1 cuando el agente quimioterapéutico interfiere con el metabolismo de nucleótidos, como en el caso de 5-FU, puede ser el contrario, dando lugar a resistencia en lugar de quimosensibilidad. Un artículo muy reciente favorece esta idea, ya que la expresión elevada de hCNT3 en pacientes de leucemia linfática crónica correlaciona con peor respuesta al tratamiento de fludarabina y apoyan la idea de la posibilidad que la quimioresistencia esté asociada con una aumento de la vía de recuperación de nucleósidos dependiente de CNT3 (Spratlin y col., 2004).

1. EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN CEREBRO

La expresión de los transportadores equilibrativos se ha considerado prácticamente ubicua (Crawford y col., 1998b), pero la evidencia de la amplia distribución de los transportadores de nucleósidos concentrativos es bastante reciente, ya que en un primer momento se creía que su localización estaba limitada a epitelios especializados como riñón o intestino. Mediante la generación de anticuerpos policlonales dirigidos contra las isoformas concentrativas de rata, nuestro grupo demostró la presencia de esta proteína en una extensa variedad de tejidos (Valdés y col., 2000). Este trabajo reveló la presencia de la proteína rCNT2 en cerebro, mientras que no se pudo detectar CNT1 mediante western blot.

Nos planteamos estudiar la expresión de los transportadores concentrativos en cerebro ya que apenas existe información al respecto, a pesar de que la adenosina se encuentre implicada en multitud de procesos y sería lógico pensar que una proteína transportadora como CNT2 con una gran afinidad por este nucleósido puede tener un papel importante en su internalización.

Se analizó una batería de muestras de diferentes regiones cerebrales de rata mediante los anticuerpos CNT1 y CNT2 y se observó la presencia de CNT2 en todas las regiones estudiadas, mientras que CNT1 no pudo ser identificado en ninguna de ellas. Para localizar las regiones concretas de expresión de CNT2 se realizaron ensayos de hibridación *in situ* (ISH) con una ribosonda del transportador CNT2 y también para ENT1, ya que este último ha sido muy estudiado en el sistema nervioso y nos ha servido de control. Gracias a estos experimentos y a la inmunohistoquímica con GFAP realizada sobre los mismos cortes donde se había revelado la ISH, se dedujo que la expresión de CNT2 se concentra mayoritariamente en neuronas, aunque no se puede descartar su expresión en células gliales. Además, nos ha permitido observar las zonas con niveles de expresión más elevados para ambos transportadores y que concuerdan con regiones ricas en el receptor de adenosina A₁ (Dunwiddie y Masino, 2001), por lo que pueden ser susceptibles de ser regulados por la adenosina. Por otro lado, la fuente de ATP en neuronas y astrocitos proviene del metabolismo oxidativo y de la glicólisis, respectivamente, y las neuronas activas son las células del cerebro que más nucleótidos consumen (Deitmer, 2001), por lo que es posible que las neuronas necesiten más aporte de adenosina que los astrocitos.

Estudios muy recientes en nuestro grupo muestran que a través del agonista rPIA se provoca un rápido incremento en la actividad de transporte de CNT2 en células hepáticas, que se bloquea completamente con DPCPX, un antagonista preferente por A₁, lo que indica que dicho incremento está mediado por el receptor A₁. Se trata de la primera evidencia en la relación entre el receptor de adenosina A₁ y el transportador concentrativo de alta afinidad CNT2. Además, esta interacción depende de los canales K_{ATP}, lo que hace

pensar que la actividad de CNT2 puede estar relacionada con el estado energético de la célula (Dufloy y col., 2004).

Se analizaron los niveles de expresión de los transcritos de los transportadores de nucleósidos preferentes por adenosina, CNT2 y ENT1, en un modelo de privación de sueño en corteza cerebral de rata. En este modelo, los niveles de adenosina extracelular se encuentran muy elevados (Porkka-Heiskanen y col., 2002) y se observó que la expresión del transcrito de CNT2 se redujo hasta un 25% sobre los animales control y tras 8 horas de sueño, esta disminución se recuperó parcialmente. Por otro lado, cuando se observaron los niveles de expresión del ARNm de ENT1, no se observaron cambios significativos. Estos resultados no se encuentran alterados por el ritmo circadiano, según los datos obtenidos por PCR a tiempo real. Los cambios en la expresión de CNT2 que observamos en las ratas privadas de sueño sugieren una regulación transcripcional de CNT2 mediada por sueño y concuerdan con datos previos de otros autores que indican un incremento de adenosina en la privación de sueño en cerebro basal y corteza cerebral (Porkka-Heiskanen y col., 1997, 2000) y apuntan a la adenosina como mediador endógeno del sueño (Benington y col., 1995; Thakkar y col., 2003). Respecto a ENT1 no se observan cambios, lo que sugiere que la transcripción de este transportador no se regula por la misma vía. Incluso si no se descarta una participación de los ENT en la recaptación de adenosina (Sweeney, 1996), la elevada afinidad de CNT2 (6 μ M respecto 40 μ M en el caso de ENT1, ver Pastor-Anglada y col., 1998) puede proporcionar una mayor eficiencia en su eliminación.

Una de las primeras funciones de la adenosina en situaciones patológicas que se propuso fue un efecto anticonvulsivo (Dragunow, 1986), de forma que parece que el daño celular aumentaría los niveles de adenosina extracelular vía los receptores A_1 (Zhang y col., 1994). Para comprobar si el transportador CNT2 tiene alguna implicación en una situación patológica, utilizamos un modelo de corteza cerebral e hipocampo de ratas a las que se les había administrado kainato. Los niveles de CNT2 se vieron incrementados a las 6, 24 y 72 tras el tratamiento con kainato de forma significativa, indicando un rol de CNT2 en situaciones patológicas donde la adenosina tiene un papel prioritario en neuroprotección vía el receptor A_1 .

Con el fin de estudiar la actividad de CNT2 se utilizaron modelos de líneas celulares neurales. Ninguna de las tres líneas disponibles (Neuro 2A, SH-SY5Y, PC12) mostró actividad dependiente de sodio mediada por CNT2 que nos sirviera para estudiar su posible regulación por el receptor A_1 . Esto nos llevó al aislamiento de cultivos primarios de hipocampo y corteza cerebral. En este modelo tampoco detectamos actividad de transporte dependiente de sodio, pero al analizar los niveles del transportador a diferentes días de cultivo se vio como los niveles del transcrito de CNT2 y ENT1 decaían, mientras que ENT2 era el transportador que más se mantenía. Estos resultados nos indican que

este cultivo primario no es un buen modelo para el estudio de CNT2, mientras que ENT2 presenta una elevada actividad en estas células. Paralelamente a estos experimentos, se ha publicado un trabajo en el que estudian la actividad de transporte de nucleósidos en cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos de rata con observaciones similares a las nuestras. Así, estos autores deducen que el transporte de uridina y adenosina en estos modelos celulares se encuentra mediado principalmente por ENT2 (Nagai y col., 2005).

Una publicación también muy reciente apunta a una regulación de los transportadores equilibrativos en cerebro por el receptor A_{2a} (Pinto-Duarte y col., 2005), mientras que estudios en nuestro laboratorio muestran una activación del transportador CNT2 a través del agonista PIA vía el receptor A₁ en tejidos periféricos (Dufлот y col., 2004). Según nuestros resultados, ENT2 se encuentra ampliamente expresado en neuronas corticales y de hipocampo de estos cultivos primarios y, según datos de otros autores, podría estar regulado por el receptor de adenosina A_{2a}. Por estos motivos nos decidimos a realizar cultivos primarios de células granulares de cerebelo, una región donde habíamos localizado de forma moderada el transcrito de CNT2 por ISH y donde apenas se encuentra expresado el receptor A_{2a} y sí el receptor A₁ (Ribeiro y col., 2003). Los primeros resultados con estos cultivos son muy recientes, pero indican que existe un transporte dependiente de sodio que podría estar mediado por CNT2. Estudios futuros de regulación purinérgica con agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina nos pueden ayudar a entender la posible relación entre este transportador y los receptores de adenosina en el sistema nervioso central.

2. CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES MONOESPECÍFICOS CONTRA LAS ISOFORMAS HUMANAS DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS.

Nuestro grupo de investigación fue el primero en generar anticuerpos contra las isoformas concentrativas de rata de los transportadores de nucleósidos (Felipe y col. 1998). Se sabe que los transportadores equilibrativos están ampliamente distribuidos, casi de forma ubicua, mientras que, en un principio, se pensó que las actividades concentrativas mostraban un patrón de expresión muy concreto, localizado en epitelios especializados en absorción, como riñón, intestino e hígado (Baldwin y col., 1999). Una vez que se identificaron las entidades moleculares de estos transportadores concentrativos, se pudo demostrar la presencia de su ARN mensajero en tejidos menos especializados. (Valdés y col., 2000; Ritzel y col., 2001). Estos anticuerpos permitieron estudiar la expresión de estas proteínas y, mediante un barrido de muestras, demostrar que estos transportadores no sólo se expresan en tejidos especializados sino que su distribución es mucho más amplia de lo que se creía en un principio (Valdés y col., 2000).

Se han generado y caracterizado anticuerpos dirigidos contra las isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos. Los anticuerpos de hCNT1, hENT1 y hENT2 funcionan en inmunohistoquímica tanto en tejido congelado como en tejido englobado en parafina y en la técnica de western blot. El anticuerpo de hCNT2, en cambio, no parece funcionar en tejido englobado en parafina, pero sí en congelado y en western blot.

Durante la caracterización de estos anticuerpos hemos descrito la distribución de estos transportadores en algunos tejidos. En cortes de corteza renal humana congelada para los anticuerpos hENT1, hENT2 y hCNT1 se observa un marcaje de los túbulos renales, mientras que hCNT1 es el único que no muestra una señal en el glomérulo.

Se han realizado inmunodetecciones con el anticuerpo anti-hCNT1 en muestras de colon incluidas en parafina. En las criptas se pudo observar un marcaje más intenso que disminuía a medida que nos acercábamos a la muscular de la mucosa, donde la tinción con dicho anticuerpo fue negativa. También se pudo apreciar el sistema MALT o tejido linfoide asociado a la mucosa, con tinción positiva. Tampoco se detectó señal en la submucosa y en la capa circular interna de la muscular de la mucosa. En el epitelio de revestimiento se observó una tinción más intensa. La lámina propia que contiene muchas células linfoides, también fue positiva hCNT1, aunque la señal no fue tan acentuada.

Cuando analizamos la expresión de hENT1, hENT2 y hCNT1 en preparaciones de carcinomas colorrectales se pudo apreciar una pérdida de expresión de hCNT1 en el tejido tumoral respecto al sano, mientras que hENT2 mostró una expresión generalizada. En cuanto a hENT1, se localizó señal en el tejido sano, pero se perdía su localización en el frente invasivo del tumor. En las áreas tumorales más alejadas del tejido sano, las células cancerosas mostraron una tinción positiva para este anticuerpo. Estos resultados concuerdan con un trabajo previo de nuestro laboratorio con modelos de hepatocarcinomas en rata (Dragan y col., 2000).

Hay datos experimentales descritos anteriormente que sugieren que la sensibilidad de una célula tumoral a un fármaco derivado de nucleósidos dependerá del patrón de expresión de las isoformas de los transportadores de nucleósidos naturales. El análisis inmunocitoquímico de biopsias tumorales puede tener valor predictivo de la sensibilidad de ese tumor a un determinado tipo de quimioterapias.

3. EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN TUMORES DE MAMA Y GINECOLÓGICOS

En el tratamiento de cáncer de mama, los análogos de nucleósidos han cobrado mucha importancia, de manera que actualmente se utilizan de forma rutinaria, principalmente la gemcitabina y la capecitabina (Possinger, 1995; Carmichael y Walling, 1996; Blum y col., 1999). En el caso de los tumores ginecológicos, la gemcitabina se utiliza

en combinación con otros agentes como el oxiplatino y también como único agente, principalmente en el tratamiento de cáncer de ovario (Fruscella y col., 2003).

Mediante el uso de los anticuerpos dirigidos contra las isoformas humanas de los transportadores de nucleósidos se analizó la expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en una serie de muestras de pacientes con tumores ginecológicos. Así, se observó que en los tres tipos de tumores analizados (endometrio, ovario y cervical) la isoforma cuya expresión fue inapreciable o nula más a menudo era hCNT1, mientras que la pérdida de expresión de los transportadores equilibrativos fue mucho menor. Esta relación se invirtió cuando se evaluaron los tumores con tinción positiva intensa. Estos resultados nos llevan a deducir que una elevada expresión de hENT1 y baja de hCNT1 parece ser relativamente común en tumores ginecológicos. El hecho que la expresión de hCNT1 se pierda en más casos que para los transportadores equilibrativos, concuerda con estudios previos de nuestro grupo, ya mencionados, que muestran una pérdida selectiva de las isoformas de CNT en dos modelos experimentales de hepatocarcinogénesis (Dragan y col, 2000). Muy pocos tumores ginecológicos son negativos para hENT1, hecho que ya se había observado en cáncer de mama (Mackey y col., 2001; Mackey y col., 2002) y que se relaciona con la visión de que las proteínas hCNT están implicadas en la diferenciación, mientras que los hENT, y particularmente hENT1, pueden colaborar en las necesidades celulares constitutivas y elementales de nucleósidos extracelulares.

En el análisis de la expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en los diferentes subtipos histológicos de tumores ginecológicos se apreció que la pérdida de expresión de los transportadores de nucleósidos, especialmente hCNT1, se encuentra asociado con subtipos histológicos de pronóstico pobre y esta relación ha sido estadísticamente significativa en muchos casos. La mayoría de los tumores de ovario negativos para los tres transportadores a la vez pertenecen al subtipo de célula clara, un tumor de ovario altamente agresivo y que requiere quimioterapia incluso en etapas tempranas (Young, 2003). La pérdida de la expresión de hCNT1 en los tumores cervicales ha sido muy elevada y, además, muchos de estos tumores negativos, pertenecen al subtipo histológico de adenocarcinoma, el tumor de cuello de útero con un peor pronóstico y que presenta una respuesta más pobre a la quimioterapia cuando se compara con los de célula escamosa (Lai y col., 1999; Nakanishi y col., 2000; Takeda y col., 2002).

Este análisis de expresión en tumores ginecológicos humanos de los transportadores de nucleósidos involucrados en el transporte de fármacos utilizados en quimioterapia ha permitido confirmar que la pérdida de expresión de CNT1 es mucho más común que en el caso de los transportadores equilibrativos, además de demostrar que la expresión de estas proteínas se correlaciona con el tipo histológico y que la pérdida de CNT1 se identifica con subtipos histológicos de peor pronóstico. Estos resultados pueden

tener implicaciones terapéuticas, ya que los derivados de nucleósidos están siendo utilizados cada vez más en el tratamiento de tumores ginecológicos.

La localización de hCNT1 mediante el anticuerpo puesto a punto contra la isoforma humana de este transportador en cáncer de mama fue principalmente citoplasmática, y entre estas muestras, muchas mostraron un marcaje nuclear de intensidad variable. hCNT1 es un transportador de membrana plasmática, pero existen evidencias de su presencia en estructuras intracelulares (Dufloy y col., 2002) y aunque la localización nuclear de hCNT1 era desconocida hasta hace poco, recientemente se ha demostrado un patrón de tinción nuclear de hCNT3 en células de leucemia linfática crónica (Mackey y col., 2005).

Además del transportador hCNT1, también se analizó la expresión de marcadores del metabolismo de nucleótidos, como son la timidina fosforilasa (TP), la timidilato sintasa (TS) y la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) y los marcadores tumorales ER, PR, MIB, HER2, p53 y bcl2. Todas las muestras mostraron un elevado porcentaje de células positivas de intensidad moderada para DPD y TP, mientras que para TS, el porcentaje de células positivas fue inferior, pero la intensidad de la señal fue mayor.

El análisis de la expresión de hCNT1 en estos pacientes mostró una correlación positiva entre el porcentaje de células tumorales positivas para hCNT1 y la expresión de TP, DPD y HER2 y en menor grado con ER, mientras que no se encontró ninguna correlación significativa con TS. También se encontró una correlación negativa entre el patrón de expresión nuclear de hCNT1 y la expresión de MIB y bcl2. Esto sería consistente con algún tipo de regulación coordinada entre hCNT1, TP y DPD en el metabolismo de fármacos derivados de fluoropirimidinas en cáncer de mama, empezando por hCNT1, ya que sería el responsable de su transporte a través de la membrana plasmática. Esto puede ser particularmente relevante en la activación metabólica de la capecitabina, ya que su catabolito secundario, la 5'-DFUR, es sustrato de hCNT1 (Mata y col., 2001) y una vez ha entrado al interior celular requiere una activación metabólica mediante la enzima TP para dar lugar a 5-FU en las células tumorales. La disponibilidad de 5-FU también depende de la expresión de la enzima responsable de su degradación, la DPD. A pesar de estos datos, los pacientes analizados en este estudio no fueron tratados mediante quimioterapia basada en fármacos derivados de fluoropirimidinas, sino que les fue administrado 5-FU, una nucleobase derivada de pirimidina que no es transportada por hCNT1 (Mata y col., 2001), ya que en el momento del tratamiento de estos pacientes el régimen con fluoropirimidinas como la capecitabina o gemcitabina en cáncer de mama aun no se encontraba disponible.

La incidencia de la tinción nuclear de hCNT1 se asoció con una disminución de la DFS (supervivencia libre de enfermedad) y el porcentaje de células positivas para hCNT1 (superior a un 80%) parece que es indicativo de un peor pronóstico. En aquellos pacientes

que mostraron tumores de mama con un elevado porcentaje de células positivas para hCNT1 se encontró un riesgo relativamente elevado de recaída y la combinación del estado del nódulo linfático con células positivas para hCNT1 también reveló un elevado riesgo de recaída. Por otro lado, el porcentaje de células positivas para hCNT1 muestra una fuerte correlación con la expresión de HER2, un marcador que a menudo se asocia con un peor pronóstico (Pegram y col., 1998; Slamon y col., 1989).

Estas correlaciones sugieren que las células con una elevada expresión del transportador pueden tener una mejor habilidad para metastatizar, ya que el parámetro de DFS se relaciona con la capacidad de invasión del tumor primario. Este índice combinado (expresión de hCNT1 y estado del nódulo linfático) ofrecen un mejor correlación con DFS que si se analizan hCNT1 y estado del nódulo linfático de manera independiente.

Se sabe que la restauración de la función de hCNT1 en células en cultivo da lugar a un aumento de la sensibilidad a nucleósidos derivados de fluoropirimidinas, como 5'DFUR y gemcitabina (Mata y col., 2001; García-Manteiga y col., 2003). Esto ocurre incluso aunque la mayoría de la proteína de hCNT1, detectada por análisis de FACS, se localice intracelularmente (García-Manteiga y col., 2003). Podríamos pensar que la pequeña fracción del transportador que se encuentra en membrana es suficiente para la recuperación de nucleósidos aumentando la disponibilidad de éstos en el interior celular y que podrían interferir con la acción del 5-FU en el metabolismo de nucleótidos. De esta forma, el papel que juega hCNT1 puede ser el contrario, dando lugar a resistencia en lugar de quimiosensibilidad. Un artículo muy reciente favorece esta idea, ya que la expresión elevada de hCNT3 en pacientes de leucemia linfática crónica correlaciona con una peor respuesta al tratamiento de fludarabina y apoyan la idea de la posibilidad que la quimioresistencia esté asociada con un aumento de la vía de recuperación de nucleósidos dependiente de hCNT3 (Spratlin y col., 2004).

A

- Ackland SP, Peters GJ. (1999): Thymidine phosphorylase: its role in sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Drug Resist Updat*, 2: 205-214.
- Alcántara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E. (1998): Regional and cellular patterns of reelin mRNA expresión in the forebrain of the developing anadult mouse. *J. Neurosci.* 18, 7779-99.
- Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M. (1996) Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet.* Oct;5(10):1649-55.
- Alvarez-Dolado M, Ruiz M, del Rio JA y col., (1999): Thyroid hormoneregulates reelin and dab1 expression during brain developement. *J. Neurosci.* 19: 6979-93
- Anderson CM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE, Parkinson FE. (1999b): Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* Jul 5;70(2):293-7
- Anderson CM, Xiong W, Geiger JD, Young JD, Cass CE, Baldwin SA, Parkinson FE. (1999a): Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J Neurochem.* Aug;73(2):867-73.
- Andres R, Mayordomo JI, Lara R, Lastra R, Ortega E, Polo E, Lambea J, Isla D, Saenz-Cusi A, Escudero P, Tres A. (2005): Gemcitabine/capecitabine in patients with metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes. *Clin Breast Cancer.* Jun;6(2):158-62.
- Andresen BT, Gillespie DG, Mi Z, Dubey RK, Jackson EK. (1999): Role of adenosine A(1) receptors in modulating extracellular adenosine levels. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct;291(1):76-80.
- Arner E.S. & Eriksson S. (1995): Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 67, 155-86.
- Ault B, Olney MA, Joyner JL, Boyer CE, Notrica MA, Soroko FE, Wang CM. (1987): Pro-convulsant actions of theophylline and caffeine in the hippocampus: implications for the management of temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* Nov 17;426(1):93-102.
- Avery T.L., Rehg J.E., Lumm W.C., Harwood F.C., Santana V.M. & Blakley R.L. (1989): Biochemical pharmacology of 2-chlorodeoxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. *Cancer Res* 49, 4972-8.
- Aymerich I, Pastor-Anglada M, Casado FJ. (2004): Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol.* Nov;124(5):505-12.
- Aymerich I, Foufelle F, Ferré P, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Extracellular adenosine activates amp-dependent protein kinase (AMPK). A role for nucleoside transporters in ampk-mediated signaling. Enviado.

B

- Bai L., Yamaguchi M., Tatsumi M., Kon K. & Brautigam M. (1998): Mechanisms responsible for resistance of sublines derived from leukemia cell lines to an antitumor agent 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *J Cancer Res Clin Oncol* 124, 367-73.
- Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B (2000): Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci.* 2000 Dec;113 Pt 24:4451-61.
- Baldwin S.A., Mackey J.R., Cass C.E. & Young J.D. (1999): Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 5, 216-24.
- Baldwin S.A., Beal P.R., Yao S.Y., King A.E., Cass C.E. & Young J.D. (2003): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.*

- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. (2004): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* Feb;447(5):735-43. Epub 2003 Jun 28. Review.
- Baldwin SA, Yao SY, Hyde RJ, Ng AM, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MW, Cass CE, Young JD. (2005): Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem.* Apr 22;280(16):15880-7
- Belt J.A., Harper E.H., Byl J.A. & Noel L.A. (1992): Sodium-dependent nucleoside transport in human myeloid leukemic cell lines and freshly isolated myeloblasts. *Proc Am Assoc Cancer Res* 33, 20.
- Belt J.A., Marina N.M., Phelps D.A. & Crawford C.R. (1993): Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul* 33, 235-52.
- Ben-Ari Y. (1985): Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* Feb;14(2):375-403. Review
- Benington JH, Kodali SK, Heller HC. (1995): Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation. *Brain Res.* Sep 18;692(1-2):79-85.
- Bhalla K., Nayak R. & Grant S. (1984): Isolation and characterization of a deoxycytidine kinase-deficient human promyelocytic leukemic cell line highly resistant to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 44, 5029-37.
- Biber K, Klotz KN, Berger M, Gebicke-Harter PJ, van Calker D.(1997): Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci.* Jul 1;17(13):4956-64.
- Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, LoRusso PM, Kuter I, Vogel C, Osterwalder B, Burger HU, Brown CS, Griffin T. (1999): Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* Feb;17(2):485-93.
- Borberly AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. 1999. *J Biol Rhythms* 14:557-568. Review.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* Aug 16;92(16):1295-302. Review.
- Bouffard D.Y. & Momparler R.L. (1995): Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res* 19, 849-56.
- Bradford MM. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7;72:248-54.
- Brundege JM, Dunwiddie TV. (1996): Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* Sep 15;16(18):5603-12.
- Bryne M. (1998): Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* Jun;4(2):70-7. Review.
- Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D. (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem.* Jun 21;271(25):15091-8.
- Buckmaster PS, Dudek FE. (1997): Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol.* Sep 1;385(3):385-404.
- Buckmaster PS, Dudek FE. (1997): Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol.* Sep 1;385(3):385-404.
- Burnstock G, Wood JN.(1996): Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;6(4):526-32. Review.

C

- Cabrita MA, Baldwin Sa, Young Jd and Cass CE. Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. 2002. *Biochem. Cell Biol.* 80: 623-638.
- Cannistra SA, Niloff JM. (1996): Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med.* Apr 18;334(16):1030-8. Review.
- Carmichael J, Walling J. (1996): Phase II activity of gemcitabine in advanced breast cancer. *Semin Oncol.* Oct;23(5 Suppl 10):77-81.
- Carson DA, Goldblum R, Keightley R, Seegmiller JE. (1977): Immunoreactive adenosine deaminase (ADA) in cultured fibroblasts from patients with combined immunodeficiency disease. *Adv Exp Med Biol.* 1977;76A:463-70.
- Cartee L. & Kucera G.L. (1998): Gemcitabine induces programmed cell death and activates protein kinase C in BG-1 human ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 41, 403-12.
- Casado FJ, Lostao MP, Aymerich I, Larrayoz IM, Duflot S, Rodriguez-Mulero S., and Pastor-Anglada M. Nucleoside transporters in absorptive epithelia. 2002. *J. Physiol. Biochem.* 58: 207-216.
- Cass C.E. (1995): In: *Drug transport in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* Edited by Georgopapadakou, N.H. New York: Dekker, 403-451.
- Cass C.E., King K.M., Montano J.T. & Janowska-Wieczorek A. (1992): A comparison of the abilities of nitrobenzylthioinosine, dilazep, and dipyridamole to protect human hematopoietic cells from 7-deazaadenosine (tubercidin). *Cancer Res* 52, 5879-86.
- Che M., Ortiz D.F. & Arias I.M. (1995): Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na(+)-nucleoside cotransporter. *J Biol Chem* 270(23), 13596-9
- Chen ZS, Lee K, Kruh GD. (2001): Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem.* Sep 7;276(36):33747-54.
- Chilosi M, Lestani M, Pedron S, Montagna L, Benedetti A, Pizzolo G, Menestrina F. (1994): A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech Histochem.* Jul;69(4):235-9.
- Christensen LF, Broom AD, Robins MJ, Bloch A. (1972): Synthesis and biological activity of selected 2,6-disubstituted-(2-deoxy- -and- -D-erythro-pentofuranosyl)purines. *J Med Chem.* Jul;15(7):735-9.
- Clark GM, McGuire WL. (1989) New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology (Huntingt)*, 3: 49-54.
- Coe I.R., Griffiths M., Young J.D., Baldwin S.A. & Cass C.E. (1997): Assignment of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) to 6p21.1-p21.2. *Genomics* 45, 459-60.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (Wash DC)* 258: 1650-1654.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47: 200-202.
- Correia-de-Sa P, Ribeiro JA. (1996): Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a receptor facilitation of evoked [3H]acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neuroscience.* Jul;73(1):85-92.
- Correia-de-Sa, P, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (1991): Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. *Br J Pharmacol.* Jun;103(2):1614-20.

- Craig J.E., Zhang Y. & Gallagher M.P. (1994): Cloning of the nupC gene of Escherichia coli encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. *Mol Microbiol* 11, 1159-68.
- Crawford C.R., Ng C.Y., Noel L.D. & Belt J.A. (1990): Nucleoside transport in L1210 murine leukemia cells. Evidence for three transporters. *J Biol Chem* 265, 9732-6.
- Crawford C.R., Ng C.Y. & Belt J.A. (1998a): Isolation of a human cDNA that confers equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside-insensitive nucleoside transport activity (ei) to a transport deficient human leukemia cell line. In Proceedings of the 88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, Calif., April 12-16. Abstract No. A406 American Association for Cancer Research.
- Crawford C.R., Patel D.H., Naeve C. & Belt J.A. (1998b): Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem* 273, 5288-93.
- Cunha RA, Correia-de-Sa P, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (1996): Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br J Pharmacol. Sep;119(2):253-60.*
- Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastiao AM, Ribeiro JA, Fredholm BB. (1994): Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res. 1994 Jun 27;649(1-2):208-16*
- Curbo S., Zhu C., Johansson M., Balzarini J. & Karlsson A. (2001): Dual mechanisms of 9-beta-D-arabinofuranosylguanine resistance in CEM T-lymphoblast leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 40-5.

D

- Dagnino L, Paterson AR. (1990): Sodium-dependent and equilibrative nucleoside transport systems in L1210 mouse leukemia cells: effect of inhibitors of equilibrative systems on the content and retention of nucleosides. *Cancer Res. Oct 15;50(20):6549-53.*
- de Mendonca A, Ribeiro JA. (1994): Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience. Sep;62(2):385-90.*
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (2000): Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev. Sep;33(2-3):258-74. Review*
- Dean M, Allikmets R. (1995): Evolution of ATP-binding cassette transporter genes *Curr Opin Genet Dev. Dec;5(6):779-85. Review.*
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res. Jul;11(7):1156-66. Review.*
- Deitmer JW. (2001): Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol. Dec;129(1-2):71-81. Review.*
- del Santo B., Valdes R., Mata J., Felipe A., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (1998): Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* 28, 1504-11.
- del Santo B., Tarafa G., Felipe A., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (2001): Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J Hepatol* 34, 873-80.
- Delicado EG, Rodrigues A, Sen RP, Sebastiao AM, Ribeiro JA, Miras-Portugal MT. (1990): Effect of 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine on adenosine transport in cultured chromaffin cells. *J Neurochem. Jun;54(6):1941-6.*
- Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U, Villringer A. (1994): Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol. Jul;267(1 Pt 2):H296-301*

- Doody RS, Dunn JK, Clark CM, Farlow M, Foster NL, Liao T, Gonzales N, Lai E, Massman P. (2001): Chronic donepezil treatment is associated with slowed cognitive decline in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. Jul-Aug;12(4):295-300.
- Downward J. (1998): Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-7.
- Dragan Y., Valdes R., Gomez-Angelats M., Felipe A., Javier Casado F., Pitot H. & Pastor-Anglada M. (2000): Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatology* 32, 239-46.
- Dragunow M. (1986): Endogenous anticonvulsant substances. *Neurosci Biobehav Rev*. Fall;10(3):229-44. Review.
- Duflot S, Riera B, Fernandez-Veledo S, Casado V, Norman RI, Casado FJ, Lluís C, Franco R, Pastor-Anglada M. (2004): ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. *Mol Cell Biol*. Apr;24(7):2710-9.
- Duflot S., Calvo M., Casado F.J., Enrich C. & Pastor-Anglada M. (2002): Concentrative Nucleoside Transporter (rCNT1) Is Targeted to the Apical Membrane through the Hepatic Transcytotic Pathway. *Exp Cell Res* 281, 77-85.
- Dumontet C., Fabianowska-Majewska K., Mantincic D., Callet Bauchu E., Tigaud I., Gandhi V., Lepoivre M., Peters G.J., Rolland M.O., Wyczechowska D., Fang X., Gazzo S., Voorn D.A., Vanier-Viornerly A. & MacKey J. (1999b): Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol* 106, 78-85.
- Dunwiddie TV, Diao L, Kim HO, Jiang JL, Jacobson KA. (1997): Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci*. Jan 15;17(2):607-14
- Dunwiddie TV. (1999): Adenosine and suppression of seizures. *Adv Neurol*. 79:1001-10. Review
- Dunwiddie TV, Diao L. (2000): Regulation of extracellular adenosine in rat hippocampal slices is temperature dependent: role of adenosine transporters. *Neuroscience*. 95(1):81-8.
- Dunwiddie TV, Masino SA. (2001): The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 24:31-55. Review.

E

- Eifel PJ, Burke TW, Morris M, Smith TL. (1995): Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. Oct;59(1):38-44.
- Elliott KJ, Todd Weber E, Rea MA. (2001): Adenosine A1 receptors regulate the response of the hamster circadian clock to light. *Eur J Pharmacol*. Feb 23;414(1):45-53.
- Evers R, Zaman GJ, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LC, Oude Elferink RP, Borst P, Schinkel AH. (1996): Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1211-8.
- Eytan GD, Regev R, Assaraf YG. (1996) Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis. *J Biol Chem*. Feb 9;271(6):3172-8.

E

- Faivre S, Le Chevalier T, Monnerat C, Lokiec F, Novello S, Taieb J, Pautier P, Lhomme C, Ruffie P, Kayitalire L, Armand JP, Raymond E. (2002): Phase I-II and pharmacokinetic study of gemcitabine combined with oxaliplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer and ovarian carcinoma. *Ann Oncol*. Sep;13(9):1479-89.

- Felipe A., Ferrer-Martinez A., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (1997): Expression of sodium-dependent purine nucleoside carrier (SPNT) mRNA correlates with nucleoside transport activity in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 572-5.
- Felipe A, Valdes R, Santo B, Lloberas J, Casado J, Pastor-Anglada M. (1998): Na⁺-dependent nucleoside transport in liver: two different isoforms from the same gene family are expressed in liver cells. *Biochem J*. Mar 1;330 (Pt 2):997-1001.
- Fernandez-Veledo S, Valdes R, Wallenius V, Casado FJ, Pastor-Anglada M. (2004): Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *J Hepatol*. Oct;41(4):538-44.
- Ferreira C.G., Span S.W., Peters G.J., Kruyt F.A. & Giaccone G. (2000a): Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res* 60, 7133-41.
- Fideu MD, Miras-Portugal MT. (1992): Long term regulation of nucleoside transport by thyroid hormone (T3) in cultured chromaffin cells. *Neurochem Res*. Nov;17(11):1099-104.
- Fideu MD, Miras-Portugal MT. (1993): Steroid-induced inhibition of adenosine transport in cultured chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol*. Oct;13(5):493-502.
- Fishell G, Hatten ME. (1991): Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development*. Nov;113(3):755-65.
- Flanagan S.A. & Meckling-Gill K.A. (1997): Characterization of a novel Na⁺-dependent, guanosine-specific, nitrobenzylthioinosine-sensitive transporter in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 272, 18026-32.
- Flanagan S.A., Gandhi V., Secrist J.A., 3rd & Meckling K.A. (2003): The novel nucleoside transport system exhibited by NB4 cells, csg, transports deoxyguanosine analogues, including ara-G. *Biochem Pharmacol* 66, 733-7.
- Fox SB, Engels K, Comley M, Whitehouse RM, Turley H, Gatter KC, Harris AL. (1997): Relationship of elevated tumour thymidine phosphorylase in node-positive breast carcinomas to the effects of adjuvant CMF. *Ann Oncol*, 8: 271-5.
- Fruscella E, Gallo D, Ferrandina G, D'Agostino G, Scambia G. (2003): Gemcitabine: current role and future options in the treatment of ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. Oct;48(1):81-8. Review.
- Fumoleau P, Cameron D. (2004): Future options with capecitabine (Xeloda) in (neo)adjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol*. Oct;31(5 Suppl 10):45-50. Review.

G

- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. (2001): Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):875-90. Review.
- Galmarini C.M., Mackey J.R. & Dumontet C. (2002): Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* 3, 415-24.
- Gandhi V., Mineishi S., Huang P., Chapman A.J., Yang Y., Chen F., Nowak B., Chubb S., Hertel L.W. & Plunkett W. (1995): Cytotoxicity, metabolism, and mechanisms of action of 2',2'-difluorodeoxyguanosine in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 55, 1517-24.
- Garcia-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M. (2003): Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. Oct 15;9(13):5000-8.
- Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E, Morabito A, Fanelli M, Gatti C, Suzauki H, Tominaga T, Dirix LY, Gion M. (1999): Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am*, 5: 101-11.

- Gati W.P., Paterson A.R., Larratt L.M., Turner A.R. & Belch A.R. (1997): Sensitivity of acute leukemia cells to cytarabine is a correlate of cellular nucleoside transporter site content measured by flow cytometry with SAENTA-fluorescein. *Blood* 90, 346-53.
- Gerstin K.M., Dresser M.J. & Giacomini K.M. (2002): Specificity of human and rat orthologs of the concentrative nucleoside transporter, SPNT. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F344-9.
- Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. (1972): Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*. Nov 18;2(7786):1067-9.
- Goan Y.G., Zhou B., Hu E., Mi S. & Yen Y. (1999): Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 59, 4204-7.
- Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW, Nikrui N, Tamimi HK, Cain JM, Greer BE, Fuller AF Jr. (1996): Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol*. Mar;60(3):412-7.
- Goh L.B., Mack P. & Lee C.W. (1995): Nitrobenzylthioinosine-binding protein overexpression in human breast, liver, stomach and colorectal tumour tissues. *Anticancer Res* 15, 2575-9.
- Gomez-Angelats M., del Santo B., Mercader J., Ferrer-Martinez A., Felipe A., Casado J. & Pastor-Anglada M. (1996): Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem J* 313 (Pt 3), 915-20.
- Griffith DA, Jarvis SM. (1996): Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. Oct 29;1286(3):153-81. Review.
- Griffiths M., Beaumont N., Yao S.Y., Sundaram M., Boumah C.E., Davies A., Kwong F.Y., Coe I., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (1997a): Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* 3, 89-93.
- Griffiths M., Yao S.Y., Abidi F., Phillips S.E., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (1997b): Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 328 (Pt 3), 739-43.
- Gu JG, Geiger JD. (1992): Transport and metabolism of D-[3H]adenosine and L-[3H]adenosine in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. *J Neurochem*. May;58(5):1699-705.
- Gu JG, Foga IO, Parkinson FE, Geiger JD. (1995): Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations. *J Neurochem*. May;64(5):2105-10
- Gutierrez M.M. & Giacomini K.M. (1993): Substrate selectivity, potential sensitivity and stoichiometry of Na(+)-nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1149, 202-8.

H

- Hamilton S.R., Yao S.Y., Ingram J.C., Henderson P.J., Gallagher M., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (1997): Anti-peptide antibodies as probes of the structure and subcellular distribution of the sodium-dependent nucleoside transporter rCNT1. *J Physiol Abstract*, Sheffield Meeting.
- Hamilton S.R., Yao S.Y., Ingram J.C., Hadden D.A., Ritzel M.W., Gallagher M.P., Henderson P.J., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (2001): Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* 276, 27981-8.
- Hammond J.R. & Kiss A. (1999): Molecular cloning of the full-length cDNAs encoding the inhibitor-sensitive and inhibitor-resistant equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Proc Can Fed Biol Soc* 42:P014.

- Hammond J.R., Lee S. & Ferguson P.J. (1999): [3H]gemcitabine uptake by nucleoside transporters in a human head and neck squamous carcinoma cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 1185-91.
- Handschumacher R.E., Cheng C.Y., Holland J.F., Frei E., Bast R., Kufe D.W., Morton D.L. & Weichselbaum R.R. (1993): In *Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea&Febiger, 712-732.
- Hansen H.H. & Sorensen J.B. (1997): Efficacy of single-agent gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer: a review. *Semin Oncol* 24, S7-38-S7-41.
- Hapke D.M., Stegmann A.P. & Mitchell B.S. (1996): Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res* 56, 2343-7.
- Heinemann V., Hertel L.W., Grindey G.B. & Plunkett W. (1988): Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 48, 4024-31.
- Higgins CF. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*. 8:67-113. Review
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. & Harris C.C. (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Hong M., Schlichter L. & Bendayan R. (2001): A novel zidovudine uptake system in microglia. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 141-9.
- Huang P., Chubb S., Hertel L.W., Grindey G.B. & Plunkett W. (1991): Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51, 6110-7.
- Huang P. & Plunkett W. (1995): Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol* 22, 19-25.
- Huang Q.Q., Harvey C.M., Paterson A.R., Cass C.E. & Young J.D. (1993): Functional expression of Na(+)-dependent nucleoside transport systems of rat intestine in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. Demonstration that rat jejunum expresses the purine-selective system N1 (cif) and a second, novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem* 268, 20613-9.
- Huang Q.Q., Yao S.Y., Ritzel M.W., Paterson A.R., Cass C.E. & Young J.D. (1994): Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem* 269, 17757-60.
- Hunsucker S.A., Spychala J. & Mitchell B.S. (2001): Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem* 276, 10498-504.
- Huston JP, Haas HL, Boix F, Pfister M, Decking U, Schrader J, Schwarting RK. (1996): Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience*. Jul;73(1):99-107.
- Hyde R.J., Cass C.E., Young J.D. & Baldwin S.A. (2001): The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* 18, 53-63.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. (1990): Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. Jul 26;346(6282):362-5
- Hylland P, Nilsson GE, Lutz PL. (1994): Time course of anoxia-induced increase in cerebral blood flow rate in turtles: evidence for a role of adenosine. *J Cereb Blood Flow Metab*. Sep;14(5):877-81.
- !
- Iaffaioli RV, Tortoriello A, Santangelo M, Turitto G, Libutti M, Benassai G, Frattolillo A, Ciccarelli PD, De Rosa P, Crovella F, Carbone I, Barbarisi A. (2000): Phase I dose escalation study

of gemcitabine and paclitaxel plus colony-stimulating factors in previously treated patients with advanced breast and ovarian cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 12(4):251-5.

Iwasaki H., Huang P., Keating M.J. & Plunkett W. (1997): Differential incorporation of ara-C, gemcitabine, and fludarabine into replicating and repairing DNA in proliferating human leukemia cells. *Blood* 90, 270-8.

J

James S, Xuereb JH, Askalan R, Richardson PJ. (1992): Adenosine receptors in post-mortem human brain. *Br J Pharmacol*. 1992 Jan;105(1):238-44.

Jamieson G.P., Snook M.B., Bradley T.R., Bertonecello I. & Wiley J.S. (1989): Transport and metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human ovarian adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 49, 309-13.

Jansen W.J., Pinedo H.M., van der Wilt C.L., Feller N., Bamberger U. & Boven E. (1995): The influence of BIBW22BS, a dipyridamole derivative, on the antiproliferative effects of 5-fluorouracil, methotrexate and gemcitabine in vitro and in human tumour xenografts. *Eur J Cancer* 31A, 2313-9.

Jarvis MF, Williams M. (1989): Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *Eur J Pharmacol*. Sep 13;168(2):243-6.

Jarvis S.M., Young J.D. & Ellory J.C. (1980): Nucleoside transport in human erythrocytes. Apparent molecular weight of the nitrobenzylthioinosine-binding complex estimated by radiation-inactivation analysis. *Biochem J* 190, 373-6.

Jarvis S.M. & Young J.D. (1981): Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J* 194, 331-9.

Jarvis S.M. & Griffith D.A. (1991): Expression of the rabbit intestinal N2 Na⁺/nucleoside transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 278 (Pt 2), 605-7.

Jedlitschky G, Leier I, Bohme M, Buchholz U, Bar-Tana J, Keppler D. (1994) Hepatobiliary elimination of the peroxisome proliferator nafenopin by conjugation and subsequent ATP-dependent transport across the canalicular membrane. *Biochem Pharmacol*. Sep 15;48(6):1113-20.

Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. (2000): The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem*. Sep 29;275(39):30069-74.

Jenison EL, Montag AG, Griffiths CT, Welch WR, Lavin PT, Greer J, Knapp RC. (1989): Clear cell adenocarcinoma of the ovary: a clinical analysis and comparison with serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. Jan;32(1):65-71. Review.

Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. (1997): Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest*. Dec 1;100(11):2849-57.

Jennings LL, Hao C, Cabrita MA, Vickers MF, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. (2001): Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology*. Apr;40(5):722-31

Johansson B, Georgiev V, Fredholm BB. (1997): Distribution and postnatal ontogeny of adenosine A2A receptors in rat brain: comparison with dopamine receptors. *Neuroscience*. Oct;80(4):1187-207.

Johnson-Kozlow M, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E, Morton D. (2002): Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am J Epidemiol*. Nov 1;156(9):842-50.

Jones KW, Rylett RJ, Hammond JR. (1994): Effect of cellular differentiation on nucleoside transport in human neuroblastoma cells. *Brain Res.* Oct 10;660(1):104-12.

K

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. (2001): Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* Apr;10(7):657-62. Review.

Kammerer U, Kapp M, Gassel AM, Richter T, Tank C, Dietl J, Ruck P. (2001): A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. *J Histochem Cytochem.* 2001 May;49(5):623-30.

Kawasaki H., Carrera C.J., Piro L.D., Saven A., Kipps T.J. & Carson D.A. (1993): Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 81, 597-601

Keppler D, Kartenbeck J. (1996)The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene.*Prog Liver Dis.*;14:55-67. Review.

Kiss A, farh K, Kim J, Garriock RJ, Drysdale TA and Hammond JR. Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. 2000. *Biochem. J.* 352: 363-372.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* Jul;4(7):844-7.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* Aug 15;57(16):3537-47.

Kroep J.R., van Moorsel C.J., Veerman G., Voorn D.A., Schultz R.M., Worzalla J.F., Tanzer L.R., Merriman R.L., Pinedo H.M. & Peters G.J. (1998): Role of deoxycytidine kinase (dCK), thymidine kinase 2 (TK2), and deoxycytidine deaminase (dCDA) in the antitumor activity of gemcitabine (dFdC). *Adv Exp Med Biol* 431, 657-60.

L

Lai CH, Hsueh S, Hong JH, Chang TC, Tseng CJ, Chou HH, Huang KG, Lin JD. (1999). Are adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas different from squamous carcinomas in stage IB and II cervical cancer patients undergoing primary radical surgery? *Int J Gynecol Cancer.* 9(1):28-36.

Lanciano RM, Curran WJ Jr, Greven KM, Fanning J, Stafford P, Randall ME, Hanks GE. (1990): Influence of grade, histologic subtype, and timing of radiotherapy on outcome among patients with stage II carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol.* Dec;39(3):368-73.

Lang T.T., Selner M., Young J.D. & Cass C.E. (2001): Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol* 60, 1143-52.

Larrayoz I.M., Casado F.J., Pastor-Anglada M. & Lostao M.P. (2004): Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem* 279, 8999-9007.

Latini S, Pazzagli M, Pepeu G, Pedata F. (1996): A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system.*Gen Pharmacol.* 1996 Sep;27(6):925-33. Review.

Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. 2001. *J Neurochem* 79:463-484.

- Lawrence T.S., Eisbruch A. & Shewach D.S. (1997): Gemcitabine-mediated radiosensitization. *Semin Oncol* 24, S7-24-S7-28.
- Le Hir M. (1990): Evidence for separate carriers for purine nucleosides and for pyrimidine nucleosides in the renal brush border membrane. *Ren Physiol Biochem*. May-Jun;13(3):154-61.
- Lee C.W., Sokoloski J.A., Sartorelli A.C. & Handschumacher R.E. (1994): Differentiation of HL-60 cells by dimethylsulfoxide activates a Na(+)-dependent nucleoside transport system. *In Vivo* 8, 795-801.
- Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD. (2000): Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst*. Dec 6;92(23):1934-40.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem*. Nov 11;269(45):27807-10
- Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. (2001): Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2. *J Cereb Blood Flow Metab*. Aug;21(8):929-36.
- Linden J. (1991): Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB J*. Sep;5(12):2668-76. Review.
- Liu DKC, Horner RL, Wojtowicz JM. Time of day determines modulation of synaptic transmission by adenosine in the rat hippocampal slices. 2000. *Neurosci Lett*. 282:200-202.
- Loewen S.K., Ng A.M., Yao S.Y., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (1999): Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *J Biol Chem* 274, 24475-84.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. (2003): 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. May;3(5):330-8. Review.
- Lorusso V, Crucitta E, Silvestris N, Guida M, Misino A, Latorre A, De Lena M. (2003): A phase I study of capecitabine in combination with vinorelbine in advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer*. Jun;4(2):138-41.
- Lostao M.P., Mata J.F., Larrayoz I.M., Inzillo S.M., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (2000): Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 481, 137-40.
- Lotfi K., Mansson E., Peterson C., Eriksson S. & Albertioni F. (2002): Low level of mitochondrial deoxyguanosine kinase is the dominant factor in acquired resistance to 9-beta-D-arabinofuranosylguanine cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1489-96.
- Lu H, Chen C, Klaassen C. (2004): Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metab Dispos*. Dec;32(12):1455-61

M

- Macek TA, Schaffhauser H, Conn PJ.(1998): Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci*. Aug 15;18(16):6138-46.
- Mackey J.R., Baldwin S.A., Young J.D. & Cass C.E. (1998a): Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resist Updat* 1, 310-324.
- Mackey J.R., Mani R.S., Selner M., Mowles D., Young J.D., Belt J.A., Crawford C.R. & Cass C.E. (1998b): Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 58, 4349-57.

- Mackey J.R., Yao S.Y., Smith K.M., Karpinski E., Baldwin S.A., Cass C.E. & Young J.D. (1999): Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst* 91, 1876-81.
- Mackey J.R., Jennings L.L., Clarke M.L., Santos C.L., Dabbagh L., Vsianska M., Koski S.L., Coupland R.W., Baldwin S.A., Young J.D. & Cass C.E. (2002): Immunohistochemical variation of human equilibrative nucleoside transporter 1 protein in primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 8, 110-6.
- Mackey JR, Galmarini CM, Graham KA, Joy AA, Delmer A, Dabbagh L, Glubrecht D, Jewell LD, Lai R, Lang T, Hanson J, Young JD, Merle-Beral H, Binet JL, Cass CE, Dumontet C. (2005): Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. *Blood*. Jan 15;105(2):767-74. Epub 2004 Sep 28.
- Mackiewicz M, Nikonova EV, Zimmerman JE, Galante RJ, Zhang L, Cater JR, Geiger JD, Pack AI. Enzymes of adenosine metabolism in the brain: diurnal rhythm and the effect of sleep deprivation. 2003. *J Neurochem* 85:348-357.
- Maia L, de Mendonca A. (2002): Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol*. Jul;9(4):377-82.
- Markman M. (2002): Second-line treatment of ovarian cancer with single-agent gemcitabine. *Semin Oncol*. Feb;29(1 Suppl 1):9-10. Review.
- Marquardt D, Center MS. (1992) Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin: evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells. *Cancer Res*. Jun 1;52(11):3157-63.
- Marzo I., Perez-Galan P., Giraldo P., Rubio-Felix D., Anel A. & Naval J. (2001): Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J* 359, 537-46.
- Mata J.F., Garcia-Manteiga J.M., Lostao M.P., Fernandez-Veledo S., Guillen-Gomez E., Larrayoz I.M., Lloberas J., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (2001): Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. *Mol Pharmacol* 59, 1542-8.
- McGinn CJ, Miller EM, Lindstrom MJ, Kunugi KA, Johnston PG, Kinsella TJ. (1994): The role of cell cycle redistribution in radiosensitization: implications regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Nov 15;30(4):851-9.
- McGrath T, Center MS. (1987) Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 30;145(3):1171-6.
- McGrath T, Latoud C, Arnold ST, Safa AR, Felsted RL, Center MS. (1989) Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells. Analysis of resistance associated membrane proteins and levels of mdr gene expression. *Biochem Pharmacol*. Oct 15;38(20):3611-9.
- McKendrick J, Coutsouvelis J. (2005): Capecitabine: effective oral fluoropyrimidine chemotherapy. *Expert Opin Pharmacother*. Jul;6(7):1231-9.
- McNally T, Helfrich RJ, Cowart M, Dorwin SA, Meuth JL, Idler KB, Klute KA, Simmer RL, Kowaluk EA, Halbert DN. (1997): Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 24;231(3):645-50.
- Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Wagner R. (1989): Enhancement of sleep by microinjection of triazolam into the medial preoptic area. *Neuropsychopharmacology*. Mar;2(1):61-6.
- Mercader J, Gomez-Angelats M, del Santo B, Casado FJ, Felipe A, Pastor-Anglada M. (1996): Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem J*. Aug 1;317 (Pt 3):835-42.
- Merriman R.L., Hertel L.W., Schultz R.M., Houghton P.J., Houghton J.A., Rutherford P.G., Tanzer L.R., Boder G.B. & Grindey G.B. (1996): Comparison of the antitumor activity of gemcitabine and ara-C in a panel of human breast, colon, lung and pancreatic xenograft models. *Invest New Drugs* 14, 243-7.

- Mignot E, Taheri S, Nishino S. (2002): Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci.* Nov;5 Suppl:1071-5. Review.
- Mitchell JB, Lupica CR, Dunwiddie TV. (1993): Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci.* Aug;13(8):3439-47.
- Miura T, Tsuchida A. (1999): Adenosine and preconditioning revisited. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Feb;26(2):92-9. Review.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M. (2002): Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003 Mar 15;101(6):2328-34. Epub 2002 Oct 31.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M. (2003): Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* Mar 15;101(6):2328-34. Epub 2002 Oct 31
- Morabito A, Filippelli G, Palmeri S, Cascinu S, Ferrau F, Zagonel V, Gattuso D, Catalano V, Capacetti B, Franciosi V, Accurso V, Scinto F, Gasparini G. (2003): The combination of gemcitabine and vinorelbine is an active regimen as second-line therapy in patients with metastatic breast cancer pretreated with taxanes and/or anthracyclines: a phase I-II study. *Breast Cancer Res Treat.* Mar;78(1):29-36.
- Mubagwa K, Flameng W. (2001): Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res.* Oct;52(1):25-39. Review
- Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. (1994): Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;91(26):13033-7.
- Murillo-Rodriguez E, Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, Shiromani PJ. (200): The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats. *Neuroscience.* 123(2):361-70.

N

- Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S. (2005): Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 9;334(4):1343-50.
- Nagourney RA, Brewer CA, Radecki S, Kidder WA, Sommers BL, Evans SS, Minor DR, DiSaia PJ. (2003): Phase II trial of gemcitabine plus cisplatin repeating doublet therapy in previously treated, relapsed ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* Jan;88(1):35-9.
- Nakane PK y Pierce GB Jr. (1966): Enzyme-labeled antibodies; preparation and localization of antigens. *J Hystochem Cytochem.* 14: 929-31.
- Nakanishi T, Ishikawa H, Suzuki Y, Inoue T, Nakamura S, Kuzuya K (2000): A comparison of prognoses of pathologic stage Ib adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol;*79(2):289-93.
- Ng S.S., Tsao M.S., Nicklee T. & Hedley D.W. (2001): Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 7, 3269-75.
- Nielsen S.E., Munch-Petersen B. & Mejer J. (1995): Increased ratio between deoxycytidine kinase and thymidine kinase 2 in CLL lymphocytes compared to normal lymphocytes. *Leuk Res* 19, 443-7.

O

- Ochiishi T, Takita M, Ikemoto M, Nakata H, Suzuki SS. (1999): Immunohistochemical analysis on the role of adenosine A1 receptors in epilepsy. *Neuroreport*. Nov 26;10(17):3535-41.
- Orlando M, Mandachain M. (2001): Gemcitabine in ovarian cancer. *Semin Oncol*. Jun;28(3 Suppl 10):62-9. Review.
- Orr R.M., Talbot D.C., Aherne W.G., Fisher T.C., Serafinowski P. & Harrap K.R. (1995): 2'-Deoxycytidine kinase deficiency is a major determinant of 2-chloro-2'-deoxyadenosine resistance in lymphoid cell lines. *Clin Cancer Res* 1, 391-8.
- Osses N., Pearson J.D., Yudilevich D.L. & Jarvis S.M. (1996): Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochem J* 317 (Pt 3), 843-8.

P

- Parker W.B., Shaddix S.C., Chang C.H., White E.L., Rose L.M., Brockman R.W., Shortnacy A.T., Montgomery J.A., Secrist J.A., 3rd & Bennett L.L., Jr. (1991): Effects of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)adenine on K562 cellular metabolism and the inhibition of human ribonucleotide reductase and DNA polymerases by its 5'-triphosphate. *Cancer Res* 51, 2386-94.
- Parkinson FE, Fredholm BB. (1990): Autoradiographic evidence for G-protein coupled A2-receptors in rat neostriatum using [3H]-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. Jul;342(1):85-9.
- Pastor-Anglada M, Felipe A, Casado FJ, del Santo B, Mata JF, Valdes R. (1998a). Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochem Cell Biol*.76(5):771-7. Review.
- Pastor-Anglada M, Felipe A, Casado J. (1998b): Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends in Pharmacological sciences*. 19: 424-30.
- Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. (2004): Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. Mar;18(3):385-93. Review.
- Patel D.H., Crawford C.R., Naeve C.W. & Belt J.A. (2000): Cloning, genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding the murine sodium-dependent, purine-selective, concentrative nucleoside transporter (CNT2). *Gene* 242, 51-8.
- Patil SD, Unadkat JD. (1997): Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane. *Am J Physiol*. Jun;272(6 Pt 1):G1314-20.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP. (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*. Feb 23;271(5252):1126-8.
- Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. (1998): HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat*.52(1-3):65-77. Review.
- Peng L, Huang R, Yu AC, Fung KY, Rathbone MP, Hertz L. (2005): Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. *Glia*. Oct;52(1):25-35.
- Pennycooke M., Chaudary N., Shuralyova I., Zhang Y. & Coe I.R. (2001): Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 951-9.
- Pfisterer J, Vergote I, Du Bois A, Eisenhauer E (2005): Combination therapy with gemcitabine and carboplatin in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. May-Jun;15 Suppl 1:36-41.
- Pinto-Duarte A, Coelho JE, Cunha RA, Ribeiro JA, Sebastiao AM. (2005): Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J Neurochem*. May;93(3):595-604.

- Plagemann PG, Wohlhueter RM. (1985): Nitrobenzylthioinosine-sensitive and -resistant nucleoside transport in normal and transformed rat cells. *Biochim Biophys Acta*. Jun 27;816(2):387-95.
- Plunkett W., Huang P. & Gandhi V. (1990): Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 17, 3-17.
- Plunkett W., Huang P., Xu Y.Z., Heinemann V., Grunewald R. & Gandhi V. (1995): Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 22, 3-10.
- Poletti A, Volpe R, Manconi R, Candiani E, Rossi C, Carbone A. (1997): Effectiveness of a rapid immunohistologic method for tumor cell origin analysis. *J Immunol Methods*. Dec 4;105(1):39-43.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. (1997): Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. May 23;276(5316):1265-8.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW. (2000): Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience*. 99(3):507-17.
- Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D. (2002): Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev*. Aug;6(4):321-32. Review.
- Possinger K. (1995): Gemcitabine in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs*. Dec;6 Suppl 6:55-9.
- Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W 3rd, Dantzig AH. (2005): The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther*. May;4(5):855-63.

Q

- Quamme G, Biber J, Murer H. (1989): Sodium-phosphate cotransport in OK cells: inhibition by PTH and "adaptation" to low phosphate. *Am J Physiol*. Dec;257(6 Pt 2):F967-73.

R

- Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. (2003): Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*. Oct 10;987(1):49-58.
- Reichard P. (1988): Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 57, 349-74.
- Reichardt P, Von Minckwitz G, Thuss-Patience PC, Jonat W, Kolbl H, Janicke F, Kieback DG, Kuhn W, Schindler AE, Mohrmann S, Kaufmann M, Luck HJ. (2003): Multicenter phase II study of oral capecitabine (Xeloda[®]) in patients with metastatic breast cancer relapsing after treatment with a taxane-containing therapy. *Ann Oncol*. Aug;14(8):1227-33.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. (2003): Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol*. May;63(5):1094-103.
- Reith, E. J., Breidenbach, B., Lorenc, M. *Texto básico de Anatomía y Fisiología*. Ediciones Doyma. Barcelona
- Resta R., Yamashita Y. & Thompson L.F. (1998): Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161, 95-109.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. (2002): Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*. Dec;68(6):377-92. Review.

- Richter T, Nahrig J, Komminoth P, Kowolik J, Werner M. (1999): Protocol for ultrarapid immunostaining of frozen sections. *J Clin Pathol.* Jun;52(6):461-3.
- Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Kock K, Kroemer HK. (2005): Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.* 37(1):253-78. Review.
- Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E. & Young J.D. (1997): Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* 272, C707-14.
- Ritzel M.W., Yao S.Y., Ng A.M., Mackey J.R., Cass C.E. & Young J.D. (1998): Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* 15, 203-11.
- Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Hyde R.J., Karpinski E., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (2001a): Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol* 18, 65-72.
- Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E. & Young J.D. (2001b): Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem* 276, 2914-27.
- Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. (1995): Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res.* Apr 24;677(2):193-203.
- Robertson JM. (2002): The Astrocentric Hypothesis: proposed role of astrocytes in consciousness and memory formation. *J Physiol Paris.* Apr-Jun;96(3-4):251-5. Review.
- Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun;83(12):4538-42
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J. (1998): Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* Nov 16;401(2):163-86.
- Ross D.D. & Cuddy D.P. (1994): Molecular effects of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) on DNA replication in intact HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 48, 1619-30.
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992): Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* Winter;4(4):346-69. Review.
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. (2001): Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* Dec;13(12):439-45. Review.
- Ruiz van Haperen V.W., Veerman G., Vermorken J.B. & Peters G.J. (1993): 2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 46, 762-6. Ruiz van Haperen V.W., Veerman G., Eriksson S., Boven E., Stegmann A.P., Hermsen M., Vermorken J.B., Pinedo H.M. & Peters G.J. (1994): Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res* 54, 4138-43.
- Ruiz van Haperen V.W., Veerman G., Eriksson S., Stegmann A.P. & Peters G.J. (1995): Induction of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine in the human ovarian cancer cell line A2780. *Semin Oncol* 22, 35-41.
- Ruiz-Montasell B, Ferrer-Martinez A, Casado FJ, Felipe A, Pastor-Anglada M. (1994): Coordinate induction of Na⁽⁺⁾-dependent transport systems and Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase in the liver of obese Zucker rats. *Biochim Biophys Acta.* Nov 23;1196(1):45-50.

Ruiz-Montasell B, Martinez-Mas JV, Enrich C, Casado FJ, Felipe A, Pastor-Anglada M. (1993): Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett.* Jan 18;316(1):85-8

S

Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. (1998): The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* Jul;51(7):506-11.

Sasvari-Szekely M., Csapo Z., Spasokoukotskaja T., Eriksson S. & Staub M. (1998): Activation of deoxycytidine kinase during inhibition of DNA synthesis in human lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 431, 519-23.

Schaddelee MP, Read KD, Cleypool CG, Ijzerman AP, Danhof M, de Boer AG. (2005): Brain penetration of synthetic adenosine A1 receptor agonists in situ: role of the rENT1 nucleoside transporter and binding to blood constituents. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Jan;24(1):59-66.

Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. (1999): MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med.* Sep;5(9):1048-51.

Sebastiao AM, Ribeiro JA. (1996): Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol.* Feb;48(3):167-89. Review.

Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB. (1996): Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science.* Jan 12;271(5246):216-9.

Sherley J.L. & Kelly T.J. (1988): Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 263, 8350-8.

Shewach D.S. & Mitchell B.S. (1986): Characterization of arabinosylguanine resistance in a lymphoblastoid cell line. *Adv Exp Med Biol* 195 Pt B, 605-9.

Shewach DS, Ellero J, Mancini WR, Ensminger WD. (1992): Decrease in TTP pools mediated by 5-bromo-2'-deoxyuridine exposure in a human glioblastoma cell line. *Biochem Pharmacol.* Apr 1;43(7):1579-85.

Shi M.M., Wu J.S., Lee C.M. & Young J.D. (1984): Nucleoside transport. Photoaffinity labelling of high-affinity nitrobenzylthioinosine binding sites in rat and guinea pig lung. *Biochem Biophys Res Commun* 118, 594-600.

Sjoberg AH, Wang L, Eriksson S. (1994): Substrate specificity of human recombinant mitochondrial deoxyguanosine kinase with cytostatic and antiviral purine and pyrimidine analogs. *Mol Pharmacol.* Feb;53(2):270-3.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* May 12;244(4905):707-12.

Soler C., Felipe A., Casado F.J., Celada A. & Pastor-Anglada M. (2000): Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 67, 345-9.

Soler C., Felipe A., Mata J.F., Casado F.J., Celada A. & Pastor-Anglada M. (1998): Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor- α in human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 26939-45.

Spasokoukotskaja T., Sasvari-Szekely M., Hullan L., Albertioni F., Eriksson S. & Staub M. (1998): Activation of deoxycytidine kinase by various nucleoside analogues. *Adv Exp Med Biol* 431, 641-5.

Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R, Mackey JR. (2004): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* Oct 15;10(20):6956-61.

- Spychala J., Madrid-Marina V. & Fox I.H. (1989): Evidence for "low Km" and "high Km" soluble 5'-nucleotidases in human tissues and rat liver. *Adv Exp Med Biol* 253B, 129-34.
- Stegmann A.P., Honders M.W., Kester M.G., Landegent J.E. & Willemze R. (1993): Role of deoxycytidine kinase in an in vitro model for AraC- and DAC-resistance: substrate-enzyme interactions with deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia* 7, 1005-11.
- Stone TW. Purines: pharmacology and physiological roles. 1985. McMillan. London.
- Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. (2000): Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer*. Jun 1;88(11):2584-9.
- Sundaram M., Yao S.Y., Ng A.M., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (2001): Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins. *Biochemistry* 40, 8146-51.
- Sundaram M., Yao S.Y., Ng A.M., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (1998): Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem* 273, 21519-25.
- Sundaram M., Yao S.Y., Ng A.M., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (1998): Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem* 273, 21519-25.
- Svenningsson P, Le Moine C, Aubert I, Burbaud P, Fredholm BB, Bloch B. (1998): Cellular distribution of adenosine A2A receptor mRNA in the primate striatum. *J Comp Neurol*. Sep 21;399(2):229-40.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. (1999): Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol*. Nov;59(4):355-96. Review.
- Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, Sunahara R, Bloch B, Fredholm BB. (1997): Cellular expression of adenosine A2A receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience*. Oct;80(4):1171-85.
- Sweeney ML . Adenosine release and uptake in cerebellar granule neurons both occur via an equilibrative nucleoside carrier that is modulated by G proteins. 1996. *J Neurochem* 67:81-88.
- Szkotak AJ, Ng AM, Sawicka J, Baldwin SA, Man SF, Cass CE, Young JD, Duszyk M. (2001): Regulation of K(+) current in human airway epithelial cells by exogenous and autocrine adenosine. *Am J Physiol Cell Physiol*. Dec;281(6):C1991-2002.
- Szymusiak R, Alam N, McGinty D. (2000): Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep. *Behav Brain Res*. Nov;115(2):171-82. Review.
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. (1989): Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*. Aug 24;803(1-2):178-88.

I

- Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Yamada H, Fujimoto S. (2002): Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*;81(12):1144-51.
- Tallman MS. (2001): Therapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Control*. Jan-Feb;8(1):62-78. Review

- Tanaka M. & Yoshida S. (1982): Altered sensitivity to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate of DNA polymerase alpha from leukemic blasts of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 42, 649-53.
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000): A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*. Mar 2;404(6773):42-9.
- Terao A, Greco, MA, Davis, RW, Heller, HC, Kilduff TS. Region-specific changes in immediate early gene expression in response to sleep deprivation and recovery sleep in the mouse brain. 2003. *Neuroscience* 120:1115-1124.
- Tetzlaff W, Schubert P, Kreutzberg GW. (1987): Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience*. Jun;21(3):869-75.
- Thakkar MM, Winston S, McCarley RW. A1 receptor and adenosinergic homeostatic regulation of sleep-wakefulness: effects of antisense to the A1 receptor in the cholinergic cerebro anterior basal. 2003. *J Neurosci* 23:4278-4287.
- Thomas A., El Rouby S., Reed J.C., Krajewski S., Silber R., Potmesil M. & Newcomb E.W. (1996): Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 12, 1055-62.
- Thompson SM, Haas HL and Gahwiler BH. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. 1992. *J. Physiol.* 451: 347-363.
- Thompson SM, Haas HL, Gahwiler BH. (1992): Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol.* 451:347-63.
- Ticho SR, Radulovacki M. (1991): Role of adenosine in sleep and temperature regulation in the preoptic area of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* Sep;40(1):33-40.
- Trussell LO, Jackson MB. (1985): Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul;82(14):4857-61.
- Tse C.M., Belt J.A., Jarvis S.M., Paterson A.R., Wu J.S. & Young J.D. (1985): Reconstitution studies of the human erythrocyte nucleoside transporter. *J Biol Chem* 260, 3506-11.

U

- Ueno R, Honda K, Inoue S, Hayaishi O. (1983): Prostaglandin D2, a cerebral sleep-inducing substance in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar;80(6):1735-7.
- Underhill CR, Parnis FX, Highley MS, Ahern J, Harper PG, Hansen H, Lund B, Dombernowsky P, Hirsch F, Hansen M, Carmichael J, Williams C. (2001): Multicenter phase II study of gemcitabine in previously untreated patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Anticancer Drugs.* Sep;12(8):647-52.

V

- Valdes R., Ortega M.A., Casado F.J., Felipe A., Gil A., Sanchez-Pozo A. & Pastor-Anglada M. (2000): Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology* 119, 1623-30.
- Valdes R., Casado F.J. & Pastor-Anglada M. (2002): Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 575-9.
- van Moorsel C.J., Kroep J.R., Pinedo H.M., Veerman G., Voorn D.A., Postmus P.E., Vermorken J.B., van Groeningen C.J., van der Vijgh W.J. & Peters G.J. (1999): Pharmacokinetic schedule finding study of the combination of gemcitabine and cisplatin in patients with solid tumors. *Ann Oncol* 10, 441-8.

- Van Wylen DG, Park TS, Rubio R, Berne RM. (1986): Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* Oct;6(5):522-8.
- Verhoef V., Sarup J. & Fridland A. (1981): Identification of the mechanism of activation of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine in human lymphoid cells using mutants deficient in nucleoside kinases. *Cancer Res* 41, 4478-83.
- Verweij J. (1999): Rational design of new tumoractivated cytotoxic agents. *Oncology*, 57 Suppl 1: 9-15.

W

- Wahl M, Schilling L. (1993): Regulation of cerebral blood flow—a brief review. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 59:3-10. Review.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-51
- Wan W, Sutherland GR, Geiger JD. (1990): Binding of the adenosine A2 receptor ligand [3H]CGS 21680 to human and rat brain: evidence for multiple affinity sites. *J Neurochem.* Nov;55(5):1763-71.
- Wang L., Karlsson A., Arner E.S. & Eriksson S. (1993): Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. Efficient phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine. *J Biol Chem* 268, 22847-52.
- Wang J. & Giacomini K.M. (1997): Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters. *J Biol Chem* 272, 28845-8.
- Wang J., Schaner M.E., Thomassen S., Su S.F., Piquette-Miller M. & Giacomini K.M. (1997a): Functional and molecular characteristics of Na⁽⁺⁾-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res* 14, 1524-32.
- Wang J., Su S.F., Dresser M.J., Schaner M.E., Washington C.B. & Giacomini K.M. (1997b): Na⁽⁺⁾-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol* 273, F1058-65.
- Wang J. & Giacomini K.M. (1999): Characterization of a bioengineered chimeric Na⁺-nucleoside transporter. *Mol Pharmacol* 55, 234-40.
- Wang L., Munch-Petersen B., Herrstrom Sjoberg A., Hellman U., Bergman T., Jornvall H. & Eriksson S. (1999): Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett* 443, 170-4.
- Ward J.L., Sherali A., Mo Z.P. & Tse C.M. (2000): Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem* 275, 8375-81.
- Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P. & Fenaux P. (1994): p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 84, 3148-57.
- Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA, Hampton GM. (2001): Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 30;98(3):1176-81.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. (2000): Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 20;97(13):7476-81.

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. (2002): TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. May 1;94(9):2511-6.

Wu J.S. & Young J.D. (1984): Photoaffinity labelling of nucleoside-transport proteins in plasma membranes isolated from rat and guinea-pig liver. *Biochem J* 220, 499-506.

Wu X., Yuan G., Brett C.M., Hui A.C. & Giacomini K.M. (1992): Sodium-dependent nucleoside transport in choroid plexus from rabbit. Evidence for a single transporter for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem* 267, 8813-8.

X

Xue L, Zhou B, Liu X, Qiu W, Jin Z, Yen Y (2003). Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res*. Mar 1;63(5):980-6.

Y

Yao S.Y., Cass C.E. & Young J.D. (1996): Transport of the antiviral nucleoside analogs 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxycytidine by a recombinant nucleoside transporter (rCNT) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 50, 388-93.

Yao S.Y., Ng A.M., Muzyka W.R., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A. & Young J.D. (1997): Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem* 272, 28423-30.

Young RC: (2003) Early-stage ovarian cancer: to treat or not to treat. *J Natl Cancer Inst* 95(2):94-5.

Z

Zaja F., Di Loreto C., Amoroso V., Salmaso F., Russo D., Silvestri F., Fanin R., Damiani D., Infanti L., Mariuzzi L., Beltrami C.A. & Baccarani M. (1998): BCL-2 immunohistochemical evaluation in B-cell chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia before treatment with fludarabine and 2-chloro-deoxy-adenosine. *Leuk Lymphoma* 28, 567-72.

Zhang G, Franklin PH, Murray TF. (1994): Activation of adenosine A1 receptors underlies anticonvulsant effect of CGS21680. *Eur J Pharmacol*. Apr 1;255(1-3):239-43.