

Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Biologia
Bienni 2001-2003

Modulació de la sensibilitat a la gemcitabina mitjançant estratègies de teràpia gènica en càncer de pàncreas humà.

Memòria presentada per
Sandra Pérez Torras

Per optar al grau de
Doctor

Tesi doctoral sota la direcció de la **Dra. Adela Mazo Sánchez**
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona

La directora

L'autora

Adela Mazo

Sandra Pérez

Barcelona, Maig 2007

Introducció

1. El Pàncreas

El pàncreas humà és un òrgan rosat d'aparença multilobulada situat a la cavitat retroperitoneal. Té un pes humit aproximat entre 85 i 100 g, i les dimensions de la glàndula adulta es situen entre 14 i 18 cm de longitud, de 2 a 9 cm d'amplada i 2-3 cm de gruix.

El pàncreas és un òrgan d'origen endodèrmic i és clau per a la regulació de la digestió de proteïnes i glúcids i la homeòstasi de la glucosa. Generalment, el pàncreas es subdivideix en 4 regions diferencials: el cap (porció interior a la corba del duodè), el coll (també dit istme), el cos (corresponent a la regió central) i la cua (part extrema a l'esquerra, propera a l'hílum esplènica).

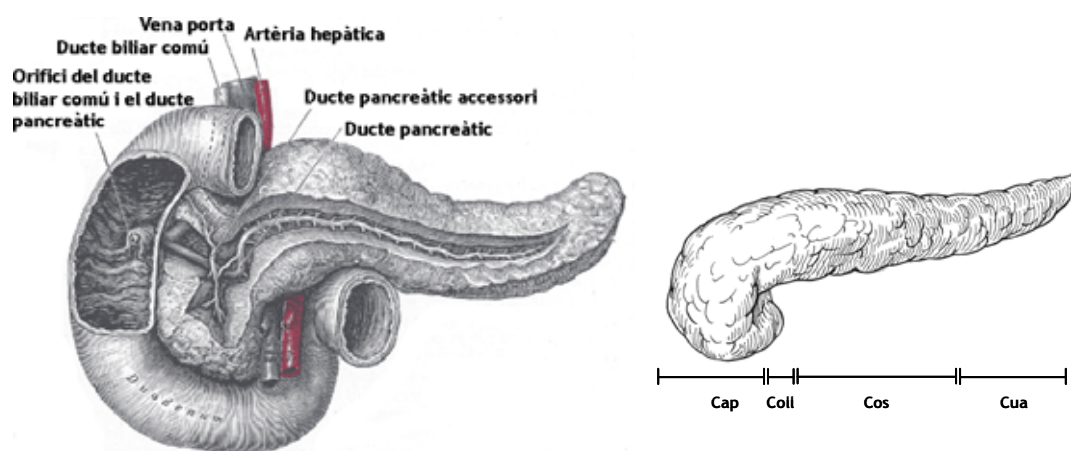
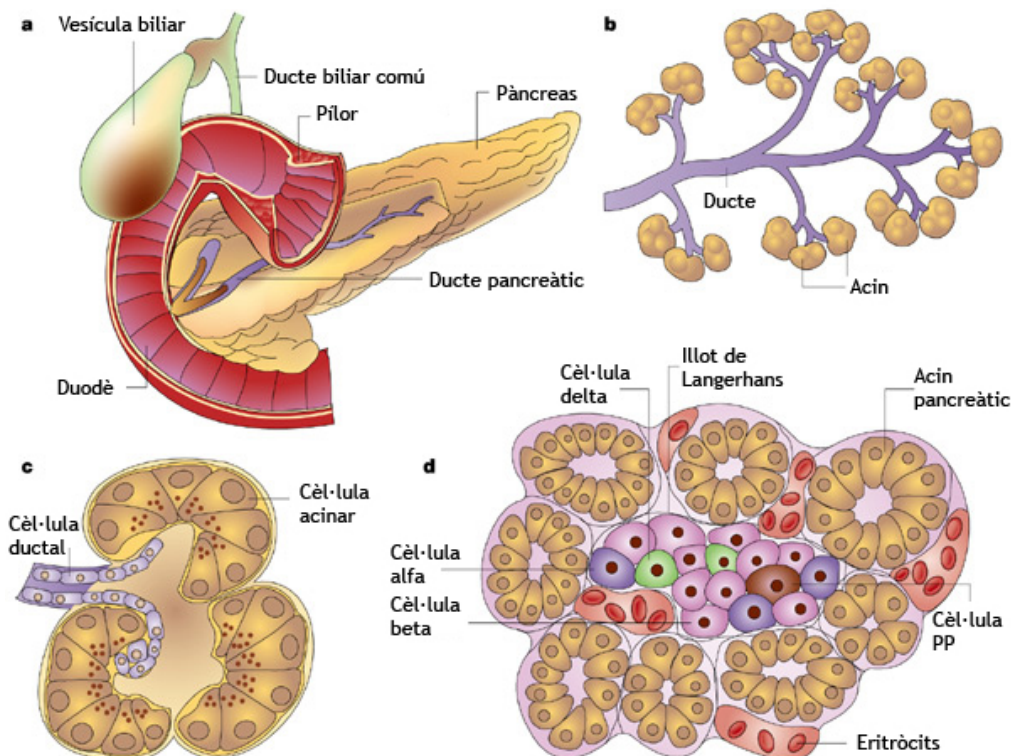


Fig. 1. Situació i estructura macroscòpica del pàncreas.

El rec sanguini prové de dues ramificacions de la superfície anterior de la superfície anterior de la artèria aorta, l'artèria celíaca i la mesentèrica superior i és recollit pel sistema portal hepàtic, en el punt de formació de la vena hepàtica portal a partir de les venes esplèniques i mesentèriques superiors. Posseeix un sistema de drenatge limfàtic important, que no és aparent fisiològicament, i que acaba en els nodes peripancreàtic, pancreaticosplènic, pancreaticoduodenal i celíac. Es troba innervat per ramificacions simpàtiques i parasimpàtiques del sistema nerviós autònom.

El pàncreas és al mateix temps una glàndula exocrina i endocrina i aquesta doble funció la duen a terme diferents grups cel·lulars. Així doncs, el pàncreas exocrí, que representa un 80% de la massa tissular de l'òrgan, és l'encarregat de la producció i síntesi del suc pancreàtic ric en enzims digestius, mentre que l'endocrí és el responsable de la síntesi de les hormones més importants relacionades amb la glucèmia. Aquesta divisió funcional és clarament diferenciable a nivell histològic, de manera que dins del teixit pancreàtic podem distingir, per una banda, un epitelí exocrí i un sistema d'excreció, format per les cèl·lules acinars, centreacinars i ductals i, per altra, els illots de Langerhans,

estructures que contenen com a mínim quatre tipus cel·lulars diferenciats especialitzats en la síntesi de diferents hormones.



Nature Reviews | Cancer

Fig. 2. Anatomia del pàncreas. a. Anatomia del pàncreas. b. El pàncreas exocrí. c. Un acin aïllat. d. In illot de Langerhans encastat en el teixit exocrí. Adaptat de Bardeesy et al 2002.

La peça secretora bàsica del pàncreas exocrí és l'acin, que és una estructura esfèrica on es disposen les cèl·lules productores d'enzims (cèl·lules acinars) en una sola capa al voltant del conducte terminal o conducte intercalat, glàndules tubuloacinars o tubuloalveolars. Les cèl·lules acinars productores d'enzims són piramidals amb la base sobre la làmina basal o el teixit connectiu reticular, i contenen grànuls de zimogen. Les cèl·lules ductals són cuboïdals i contenen anhidrasa carbònica; algunes d'aquestes cèl·lules es projecten a la llum de l'acin interposant-se entre ella i les cèl·lules acinars i es coneixen com a cèl·lules centreacinars. Els ductes i els dúctuls pancreàtics, no són tan sols conductes passius; malgrat la seva petita mida i nombre de cèl·lules, produeixen la majoria del volum i tot el bicarbonat del suc pancreàtic. El sistema ductal del pàncreas es pot estructurar en tres parts: els ductes intralobulars (format per les cèl·lules centreacinars i les intercalades, que participen en el transport de fluids i ions des de les cèl·lules acinars veïnes i en el correcte mesclat d'aquest fluid amb les proteïnes del suc pancreàtic), el sistema ductal interlobular (que transcorre pel teixit connectiu interlobular, i està format per cèl·lules epitelials productores de

mucines però sense funció associada clara) i finalment el sistema ductal principal. Aquest darrer està format per dos canals primaris; el ducte principal o de Wirsung que transcorre des de la cua del pàncreas i drena la totalitat de l'òrgan, recollint el contingut de tots els canals secundaris. Per contra, el ducte accessori, o de Santorini no sempre és actiu; en arribar al cap del pàncreas, el ducte principal fa un gir sobtat que li permet unir-se al canal biliar comú, formant així l'ampulla de Vater, una prominència situada a 8-10 cm del pílor.

Les cèl·lules productores d'hormones es localitzen en petits cúmuls cel·lulars de caràcter endocrí, que representen de l'1 al 2% de tot el volum pancreàtic i que contrasten, en els estudis morfològics, amb la superfície acinar exocrina. Aquest mosaic cel·lular és l'anomenat illot de Langerhans i segrega diferents hormones i pèptids reguladors. Es coneixen al menys quatre tipus cel·lulars ben caracteritzats: les cèl·lules α , β , δ i PP, productores d'insulina, glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic respectivament. A l'home, les cèl·lules α es situen a la perifèria de l'illot, les β a l'interior i entre ambdues es disposen les cèl·lules δ i les PP.

El pàncreas és un òrgan complex en el qual es manifesten moltes malalties diferents, algunes fatals i d'altres cròniques. La seva ubicació anatòmica a la cavitat duodenal, a la part superior del retroperitoneu, des d'on s'estén fins a la melsa, fa que les exploracions per palpació siguin difícils, i li confereix un caràcter d'òrgan silent.

2. Càncer de Pàncreas

El pàncreas presenta una elevada diversitat fisiològica i cel·lular i com a reflex d'aquesta, existeix un ampli espectre de lesions malignes amb característiques fisiològiques i histològiques de les cèl·lules que el constitueixen. L'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC), la nomenclatura del qual és deguda a la seva similitud histològica amb les cèl·lules ductals, és la neoplàsia de pàncreas més comú, essent més d'un 85% dels casos de tumors pancreàtics (Warshaw and Fernandez-del Castillo, 1992; Li *et al.*, 2004).

El PDAC s'associa amb molt pocs dels factors de risc coneguts tant demogràfics com ambientals i amb un grapat de mutacions genètiques autosòmiques dominants. Nombrosos estudis han establert l'edat avançada, fumar i la pancreatitis crònica com a clars factors de risc, mentre que l'obesitat i la diabetis n'incrementen el risc (Everhart and Wright, 1995; Fuchs *et al.*, 1996; Gapstur *et al.*, 2000; Michaud *et al.*, 2001; Berrington de Gonzalez *et al.*, 2003; Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2005). Per altra banda, un 10% dels PDAC estan associats amb una predisposició familiar heretada (Schenk *et al.*, 2001; Petersen and Hruban, 2003). Així doncs, s'ha pogut determinar algunes mutacions germinals associades amb el càncer de pàncreas com les que afecten als gens supressors de tumors *INK4A*, *BRCA2* i *LKB1*, al gen *MLH1* implicat en la reparació dels

aparellaments erronis del DNA i al gen *PRSS1* del tripsinogen catiònic (Whitcomb *et al.*, 1996; Jaffee *et al.*, 2002). El gen *BRCA1* sembla que també pot atorgar una susceptibilitat augmentada de patir PDAC tot i que amb un risc associat menor al de *BRCA2* (Thompson and Easton, 2002). Degut a l'edat típica d'aparició del PDAC associada amb les mutacions germinals esmentades abans, sembla que aquestes lesions estarien implicades en la progressió maligna del tumor més que en el seu inici. En aquest sentit, les mutacions de *INK4A* i *BRCA2* no es detecten en les primeres lesions esporàdiques premalignes i només es troben en les fases intermèdies tardanes o avançades de les lesions neoplàsiques pancreàtiques intraepitelials (PanIN, *pancreatic intraepithelial neoplasias*) (Wilentz *et al.*, 1998; Goggins *et al.*, 2000). Aquestes mutacions germinals representen menys del 20% dels PDAC d'herència familiar, fet que posa de manifest l'existència d'altres gens que predisposen per aquesta malaltia (Lynch *et al.*, 1996).

Actualment, encara ens manca molta informació per arribar a entendre com aquestes lesions individuals acaben desenvolupant un PDAC i, per tant, l'observació clínica d'insuficiència exocrina i pancreatitis com a trets patofisiològics comuns del procés és indispensable per a la seva detecció i diagnòstic.

Les disfuncions exocrines del pàncreas i les pancreatitis poden promoure la tumorigènesi, en part, per l'alliberament localitzat de factors de creixement, citoquines i espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*), el que pot induir proliferació cel·lular, alterar els estats de diferenciació cel·lular i seleccionar les mutacions oncogèniques. La detecció de mutacions activadores de K-RAS en una terç dels pacients amb pancreatitis crònica atorga consistència a aquesta hipòtesi (Lohr *et al.*, 2000).

A més a més, models animals de rosegadors han posat de manifest l'existència d'una població de cèl·lules precursoras ductals que poden expandir-se en resposta a dany al pàncreas (Vinik *et al.*, 1997; Kritzik *et al.*, 1999; Scoggins *et al.*, 2000; Bonner-Weir and Sharma, 2002). En estats d'inflamació pancreàtica o dany, un extens compartiment *stemcell-like* podria representar una subpoblació de cèl·lules susceptibles de transformació oncogènica per mutacions somàtiques de proto-oncogens i gens supressors de tumors clau (Beachy *et al.*, 2004).

2.1. Model de progressió de les neoplàsies pancreàtiques

El PDAC normalment apareix al cap del pàncreas amb infiltració en els teixits adjacents com els limfàtics, la melsa, la cavitat retroperitoneal i, sovint, presenta metastasis al fetge i als pulmons. Es caracteritza per un estroma dens format per fibroblasts i cèl·lules inflamatòries, el que es coneix com a desmoplàsia. En models experimentals, s'ha observat que les cèl·lules estel·lades que formen part del pàncreas normal i es caracteritzen per tenir una morfologia fibroblàstica, podrien contribuir a aquesta resposta desmoplàsica (Jaster, 2004). El PDAC més

comú exhibeix una estructura glandular amb estructures similars als ductes i amb graus variables d'atípia i diferenciació. Altres subtipus menys comuns de PDAC inclouen histologies col·loïdals, adenoescamoses o sarcomatoses. Sovint, en un tumor existeixen diferències regionals en l'histologia, en la classificació del tumor i en el grau de diferenciació. A més a més, les petites lesions primerenques acostumen a presentar invasió perineural i limfovascular, el que suggereix una propensió a la dispersió llunyana en fases inicials.

Estudis clínics i histopatològics han permès identificar tres lesions precursors del PDAC (Fig. 3) (Hezel *et al.*, 2006): els PanINs (neoplàsies pancreàtiques intraepitelials), les neoplàsies mucinoses cístiques (MCN, mucinous cystic neoplasm) i les neoplàsies intraductals papil·lars mucinoses (IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasms) (Brugge *et al.*, 2004; Maitra and Hruban, 2005).

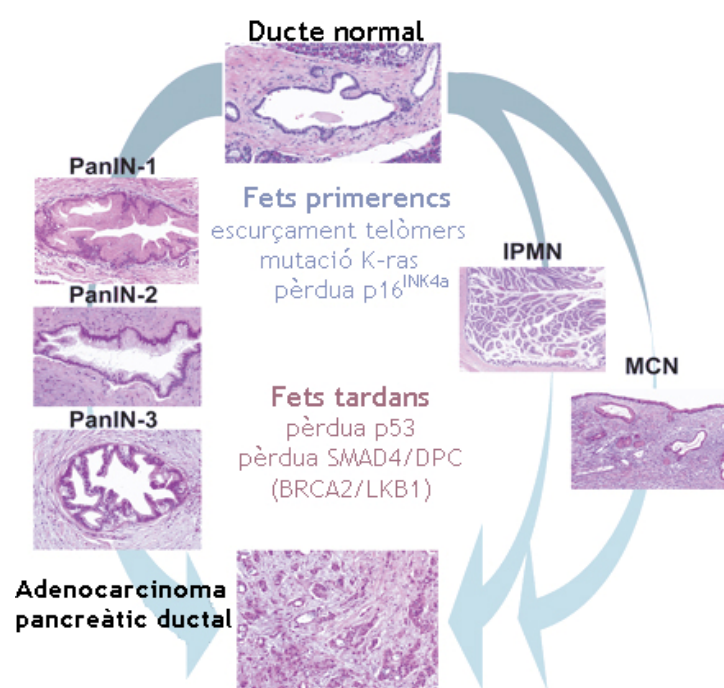


Fig. 3. Lesions precursors de càncer de pàncreas i els aconeteixements genètics relacionats amb la seva progressió: PanIN, MCN i IPMN. L'esquema de progressió del PanIN es mostra a l'esquerra. Al costat dret s'observa la progressió potencial dels MCNs i els IPMNs fins a PDAC. Els aconeteixements genètics estan dividits entre els que es produeixen a les fases primerenques o a les tardanes de la progressió del PDAC. Adaptat de Hezel *et al.*, 2006

D'aquestes tres lesions, la més comuna i estudiada és el PanIN, que es localitza en els ductes pancreàtics de petit diàmetre. L'anàlisi de mostres pancreàtiques obtingudes d'autòpsies i de reseccions quirúrgiques ha permès determinar que els PanINs són lesions comuns en els adults d'edat avançada (trobant-se presents en un 30% dels casos). Els PanINs mostren un ampli espectre d'alteracions morfològiques divergents en relació als ductes normals, que

permeten establir etapes graduals de creixement displàsic (Hruban *et al.*, 2000; Hruban *et al.*, 2001; Maitra and Hruban, 2005). Els PanINs es divideixen en tres etapes: 1A (aplanat), 1B (papil·lar), 2 (papil·lar atípic) i 3 (papil·lar atípic sever) (Fig. 4). El grau 1A es caracteritza per una lesió epitelial plana formada per cèl·lules columnars altes amb els nuclis situats a la part basal i amb abundant mucina supranuclear. El PanIN-1B és una lesió epitelial amb arquitectura papil·lar. El PanIN-2 presenta anormalitats nuclears com pèrdua de polaritat, superpoblació, pseudoestratificació i hiperchromatisme. L'arquitectura del PanIN-3 està formada normalment per un epiteli papil·lar o micropapil·lar amb atípia nuclear severa, cèl·lules globulars distròfiques i algunes mitosis anormals (Hruban *et al.*, 2001).

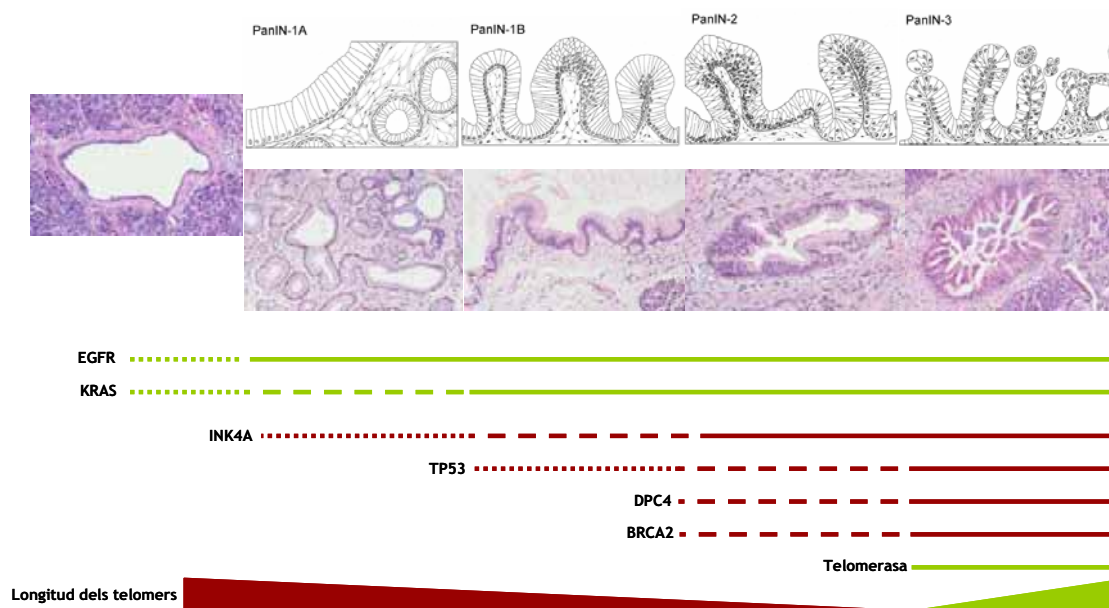


Fig. 4. Model de progressió del PDAC a partir de lesions neoplàsiques pancreàtiques intraepitelials. En vermell les alteracions de pèrdua de funció i en verd les d'activació. Adaptat de Bardeesy *et al.*, 2002. Imatges extretes de la web del Johns Hopkins University.

Aquesta progressió finalment acaba en PDAC amb evidents àrees d'invasió a través de la membrana basal.

Diversos estudis han establert uns perfils d'alteracions moleculars que reforcen el model de progressió des dels PanINs al PDAC (Heinmoller *et al.*, 2000; Hruban *et al.*, 2000; Hruban *et al.*, 2001; Wilentz *et al.*, 2000a; Yamano *et al.*, 2000; Maitra *et al.*, 2003).

Per altra banda, els MCNs i IPMNs són lesions menys comuns. Els MCNs són grans lesions epitelials cístiques productores de mucines que presenten un estroma distintiu de tipus ovàric amb un grau variable de displàsia epitelial i regions focals d'invasió. Els IPMNs s'assemblen als PanINs a nivell cel·lular, però creixen formant grans estructures cístiques.

Les alteracions genètiques documentades pels adenocarcinomes ocorren en els PanINs i s'observen també, encara que en menor mesura, en els MCNs i els IPMNs. A més, aquestes alteracions transcorren de forma seqüencial durant la progressió tumoral i no totes són comunes a totes les lesions precursors. Així, per exemple, l'escurçament de telòmers i la pèrdua de BRCA2 s'han documentat pels PanINs, mentre que la pèrdua de LKB1 s'ha trobat en PDACs i IPMNs (revisat a (Hezel *et al.*, 2006).

Malgrat tots els estudis realitzats, encara no es coneix com aquestes lesions precursors de PDAC es relacionen entre elles, si el seu origen cel·lular és comú o si cada una condueix a diferents subtipus de PDAC amb característiques moleculars i biològiques diferenciades.

2.2. Genètica molecular del PDAC

L'anàlisi molecular de l'evolució del PDAC ha permès identificar una sèrie d'alteracions genètiques, entre les quals les més freqüents inclouen l'activació d'oncogens, la pèrdua de funció de supressors tumorals i la sobreexpressió de sistemes receptor-lligand. A més a més, existeixen un seguit de gens que es poden trobar alterats tot i que en una proporció menor. En la taula 1 (Hilgers and Kern, 1999) es resumeixen aquestes alteracions i les seves freqüències.

	Gen	Tipus	Localització	Freqüència (%)	Origen de la mutació
Alta incidència	K-ras	Oncogèn	12p12.1	47-100	Somàtica
	p16	Supressor	9p21	>90	Som>Germ
	p53	Supressor	17p31	50-75	Somàtica
	DPC4	Supressor	18q21	55	Somàtica
Baixa incidència	AKT2	Oncogèn	19q13.1	10-15	Somàtica
	MYB	Oncogèn	6q24	10	Somàtica
	MKK4	Supressor	17p13	4	Somàtica
	BRCA2	Supressor	13q13	5-10	Som>Germ
	pRB	Supressor	13q14	6	Somàtica
	LKB1	Supressor	19p13	5	Som>Germ
	ALK5	Supressor	9q21	1	Somàtica
	RER ⁻ /TGFβR2	Supressor	/3p22	1	Somàtica
	RER ⁺ /TGFβR2	RER	/3p22	4	Som>Germ
	MLH-1	Missmatch repair	3p	3	Somàtica

Taula 1. Patró d'alteracions de l'adenocarcinoma de pàncreas. Les alteracions es classifiquen en base a la seva freqüència d'aparició. Adaptat de Hilgers i Kern, 1999.

2.2.1. K-ras

K-ras és un membre de la família de proteïnes Ras d'unió a GTP que participa en un ampli ventall de funcions cel·lulars que inclouen proliferació, diferenciació i supervivència (Malumbres and Barbacid, 2003). K-ras actua com a transmissor de senyals des de les proteïnes tirosina quinasa de la membrana citoplasmàtica, on la seva activació per factors de creixement implica el desencadenament de diferents rutes intracel·lulars com la via de les MAP quinases, de la PI3 quinasa i la de RalGDS (Campbell *et al.*, 1998).

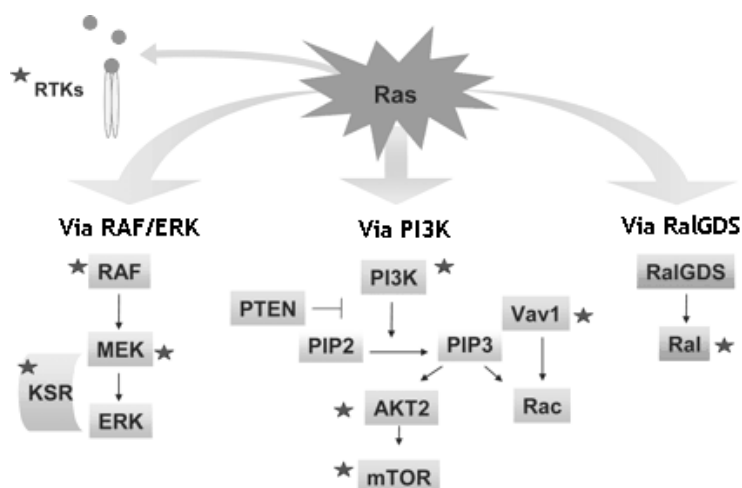


Fig. 5. Esquema de senyalització de RAS. Ras utilitza un gran nombre d'efectors. A l'esquema es mostren les tres cascades de senyalització més importants relacionades amb la progressió i el manteniment del PDAC: la via de les quinases Raf/Map (ERK), la de la PI3K i la de Ral GDS. La inhibició de cada una d'aquestes cascades a diferents nivells (indicat amb una estrella) inhibeix la tumorigènesi del PDAC en un gran nombre de sistemes *in vitro* i *in vivo*. Adaptat de Hezel *et al.*, 2006.

El gen K-ras codifica per una proteïna de 21 kDa que es localitza a la cara interna de la membrana plasmàtica i té activitat guanosina trifosfatasa (GTPasa), tot i que aquesta és ineficient i requereix proteïnes activadores de l'activitat GTPasa (GAPs, *GTPasa activating proteins*) per promoure l'hidròlisi del GTP i atenuar la transmissió de la senyal. Les mutacions de K-ras provoquen una activació constitutiva del seu senyal al fer-la insensible a les GAPs. Aquestes mutacions puntuals, presents a gairebé tots els PDACs, apareixen quasi exclusivament al codó 12, mentre que les mutacions al codó 13 característiques del càncer de colon són menys freqüents (Capella *et al.*, 1991). Les mutacions a K-ras es desenvolupen en les primeres fases de la carcinogènesi (Lemoine *et al.*, 1992) i es considera un factor de pronòstic desfavorable (Castells *et al.*, 1999). L'elevada taxa de mutació de K-ras en càncer de pàncreas ha propiciat que s'hagi utilitzat en diversos estudis com a possible marcador per aquesta patologia (Tada *et al.*, 1991; Dianxu *et al.*, 2002), tot i que cal tenir en compte que les seves

mutacions no són específiques de malignitat (Caldas *et al.*, 1994; DiGiuseppe *et al.*, 1994). Tot i així, les mutacions de K-ras en pacients amb pancreatitis crònica podrien ser un bon marcador d'un subgrup poblacional al que cal fer un seguiment més acurat al llarg del temps per permetre una detecció primerenca (Boadas *et al.*, 2001).

2.2.2. El locus 9p21: els supressors tumorals INK4A i ARF

El locus 9p21 codifica per dos supressors tumorals solapats: INK4A i ARF, i les seves proteïnes p16^{INK4A} i p14^{ARF}, mitjançant un exó inicial diferent i dues pautes de lectura diferents en els dos exons compartits.

p16^{INK4A} és una proteïna supressora tumoral que forma part de la família INK4 d'inhibidors específics dels complexos ciclina D/CDK 4-6 (*Cyclin Dependent Kinase*) que actuen com a reguladors del cicle cel·lular (Serrano *et al.*, 1993). Aquests complexos fosforilen la proteïna del retinoblastoma (pRB), el que permet que alliberi el factor de transcripció E2F i continuï la progressió del cicle cel·lular cap a la fase S. Això converteix a p16 i la via del retinoblastoma en factors clau per al control de la proliferació. Per tant no és d'estranyar que la pèrdua de la funció de p16, ja sigui per mutació, deleció o hipermetilació del promotor es trobi en més d'un 90% dels pacients de càncer de pàncreas. Les alteracions de p16 poden aparèixer en les fases inicials del desenvolupament tumoral (PanIN-1A), tot i que es troben de forma majoritària a partir de les fases intermèdies (PanIN-2 i sobretot 3) (Wilentz *et al.*, 1998; Gerdes *et al.*, 2001).

p14^{ARF} estableix p53 inhibint la seva degradació al proteasoma dependent de MDM2. Degut a la seva juxtaposició amb p16 i la freqüència de les deleccions homozigòtiques d'aquest locus (aproximadament un 40% dels tumors), molts dels tumors pancreàtics comparteixen la pèrdua dels dos supressors tumorals. La deficiència en ARF estaria provocant una marcada reducció dels nivells de la proteïna p53 i afectant per tant a la seva funció. A més a més, en el PDAC coexisteixen en un 40% dels casos les mutacions de p53 i les deleccions d'ARF, el que podria posar de manifest l'existència de funcions independents per als dos en la supressió del càncer de pàncreas (Heinmoller *et al.*, 2000; Maitra *et al.*, 2003). Existeixen evidències de funcions de la proteïna ARF independents de p53 per com la inhibició del processat de l'ARN al ribosoma (Rocha *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2003).

2.2.3. p53

La proteïna p53 és un factor de transcripció que respon a diferents senyals d'estrés com el dany a l'ADN, la sobreexpressió d'oncogens i diverses limitacions metabòliques, per tal de regular els gens diana que indueixen aturada del cicle cel·lular, apoptosi, senescència, reparació de l'ADN o alteracions del metabolisme. p53 actua en forma tetramèrica de manera que les formes mutants es poden unir a les nadiues impedit així la correcta unió del tetràmer a l'ADN. És per això que la mutació d'un únic al·lel pot tenir efectes dominants negatius. La

capacitat de p53 per transactivar gens ve regulada per diverses modificacions post-translacionals com fosforilació, acetilació, isomerització (PIN1) i interacció amb altres proteïnes. A les cèl·lules normals no sotmeses a estrés, p53 es troba en nivells baixos degut sobretot a l'acció de MDM2, que la inhibeix de dues maneres, impedit la unió als co-activadors i promovent la seva degradació al proteasoma mitjançant la unió de molècules d'ubiquitina. Pràcticament totes les alteracions de p53 detectades en els tumors pancreàtics, i en general a tots els tipus de càncer, fan perdre a p53 la seva capacitat d'unió a l'ADN, el que posa de manifest un cop més que és aquesta propietat la que li confereix les principals capacitats supressores. Aquestes mutacions, normalment també impedeixen la seva interacció amb MDM2, evitant així la seva degradació i mantenint els nivells de la proteïna mutada en nivells elevats fàcilment detectables als tumors. Al mateix temps, la tetramerització de p53 emmascara la senyal d'exportació nuclear, de manera que la proteïna tendeix a mantenir-se al nucli.

La proteïna p53 impedeix que la cèl·lula progressi a través del cicle cel·lular en condicions que poden generar o perpetuar dany a l'ADN. L'activació o inactivació de p53 permet a la cèl·lula sobreviure o morir; així doncs, la importància de la seva funció fa que estigui sotmesa a mecanismes de control exquisits que permeten la seva ràpida resposta a una senyal d'estrés i en preveuen una activació errònia. En la regulació de p53 hi participen un gran grup de proteïnes amb accions oposades, entre elles destaquen els seus inhibidors MDM2 i MDM4, i co-activadors transcripcionals com p300.

La via de p53 és d'importància cabdal per la supressió tumoral en els humans. Les mutacions en el gen TP53 que comprometen la funció de la proteïna es detecten en un 50% dels càncers humans. En els tumors pancreàtics p53 es troba mutada en el 50-75% dels casos i les seves mutacions apareixen en les fases tardanes dels PanIN que presenten característiques clares de displàsia (Boschman *et al.*, 1994; Maitra *et al.*, 2003). En aquests PanINs més avançats, la pressió selectiva per eliminar p53 pot ser deguda en part a un cúmul d'alteracions genètiques que activen les respostes del punt de control de dany a l'ADN dependent de p53. D'aquesta manera, la pèrdua de la funció p53 permetria el creixement i la supervivència de les cèl·lules que contenen aberracions cromosòmiques procarcinogèniques.

2.2.4. DPC4

El gen DPC4 (Smad4) codifica per una proteïna de 64 kDa que juga un paper important en la regulació de la transcripció gènica i és un component central de la cascada de senyalització de TGF- β (Massague *et al.*, 2000). La inactivació del supressor de tumors DPC4 és una de les alteracions més comuns en el càncer de pàncreas i es detecta en un 55% dels casos (Wilentz *et al.*, 2000b). La seva inactivació és relativament específica del càncer de pàncreas i ocorre en les fases tardanes del procés carcinogènic (PanIN-3). No s'han trobat alteracions en les fases inicials, però apareixen amb una freqüència significativa en les lesions

neoplàsiques amb atípia i en el carcinoma invasiu (Wilentz *et al.*, 2000c; Hua *et al.*, 2003). Existeixen evidències recents que relacionen la deficiència de DPC4 amb la inhibició de la parada del cycle i la migració cel·lular induïda per TGF- β sense afectar a la transició epiteli-mesènquima, desplaçant així el balanç de la senyalització de TGF- β de la supressió a la progressió tumoral (Levy and Hill, 2005). Així doncs, sembla que l'expressió elevada de TGF- β contribueix a la progressió del PDAC. Els lligands de la família de TGF- β es troben altament expressats en les cèl·lules tumorals en relació a les del pàncreas normal (Friess *et al.*, 1993) i podria tenir un paper important en la resposta desmoplàsica característica d'aquest tipus de tumor, tal i com suggereixen estudis realitzats en xenoinplants (Lohr *et al.*, 2001).

2.2.5. Família dels factors de creixement epidèrmics (EGF) i els seus receptors

Els factors de creixement epidèrmics són proteïnes que controlen la diferenciació i la proliferació cel·lular. Els quatre receptors de la família estan formats per un domini extracel·lular, una regió hidrofòbica transmembrana i una regió citoplasmàtica tirosina quinasa. El receptor d'EGF clàssic es coneix com a EGF-RI (Epidermal Growth Factor Receptor) HER-1 o erbB-1. La resta dels tres receptors són HER-2 (erbB-2 o el proto-oncogen neu), HER-3 (erbB-3) i HER-4 (erbB-4). L'estimulació del receptor d'EGF causa canvis conformacionals en el receptor, activació de la tirosina quinasa, fosforilació de proteïnes i estimulació de diverses vies de senyalització (Harding and Burtneess, 2005).

En el teixit pancreàtic normal, EGF i el seu receptor (EGF-RI) es troben a la membrana i al citoplasma de moltes cèl·lules ductals i acinars (Friess *et al.*, 1994). La seva sobreexpressió és una característica força comuna al càncer de pàncreas (Durkin *et al.*, 2003), es detecta a partir del PanIN 1A i està associada amb una supervivència curta (Yamanaka *et al.*, 1993).

En càncer de pàncreas HER-2/neu es troba amplificat i sobreexpressat amb una incidència variable (10-60%) (Safran *et al.*, 2001; Stoecklein *et al.*, 2004). HER-2/neu correlaciona de forma positiva amb el grau d'hiperplàsia, essent feble en el PanIN-1A i de moderat a fort en la hiperplàsia papil·lar atípica i el PDAC (Tomaszewska *et al.*, 1998). La sobreexpressió de HER-3 correlaciona amb la progressió de la malaltia i redueix la supervivència postoperatòria (Friess *et al.*, 1995), mentre que els nivells de HER-4 es mantenen en valors comparables entre el pàncreas normal i els tumors avançats, però en estadis primerencs dels PDAC poden disminuir (Graber *et al.*, 1999).

2.2.6. Alteracions de baixa freqüència

A més a més de les alteracions descrites, el càncer de pàncreas acumula una gran quantitat d'alteracions genètiques de menor freqüència.

Entre un 10 i un 15% dels tumors presenten una amplificació gènica en el locus 10q13, que es correspondria amb el locus genòmic d'*AKT2* (Cheng *et al.*, 1996).

AKT2 és l'homòleg humà del gen de la proteïna vírica *v-akt* i codifica per una proteïna quinasa serina-treonina altament homòloga a la proteïna quinasa B (*AKT1*). S'activa per EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), FGFb (*basic Fibroblast Growth Factor*) i insulina, el que indica que pot contribuir de forma important a la proliferació cel·lular i la transformació (Franke *et al.*, 1994). Un altre oncogen alterat en un 10% dels casos és *MYB* (Wallrapp *et al.*, 1997).

Per altra banda, els supressors tumorals *LKB1* i *BRCA2* es troben mutats en menys del 10% dels casos de PDAC, però es troben clarament associats als casos d'herència familiar.

Les mutacions somàtiques de *LKB1* en els PDAC esporàdics són rares i es detecten en un 4-6%, tot i que sembla que les taxes d'inactivació són més elevades en els IPMNs. *LKB1* codifica per una quinasa serina-treonina que està involucrada en la regulació de diversos processos com la polaritat cel·lular i el metabolisme, i ha estat relacionat amb vies de senyalització específiques com la de mTOR mitjançant la seva capacitat de regular la quinasa d'AMP (Bardeesy and DePinho, 2002; Ossipova *et al.*, 2003; Baas *et al.*, 2004; Lizcano *et al.*, 2004). De fet, encara no s'ha establert com la pèrdua de *LKB1* promou la tumorigènesi.

BRCA2 es troba altament alterat en tumors de mama, però l'aparició de delecions homozigòtiques en la línia germinal es troba en un 5% dels PDAC (Goggins *et al.*, 1996), tot i que les seves mutacions augmentarien fins a un 17% en els casos d'herència familiar (Murphy *et al.*, 2002). La pèrdua de *BRCA2* apareix en els PanINs amb displàsia severa i PDACs (Goggins *et al.*, 2000). *BRCA2* participa en el manteniment de l'estabilitat genòmica regulant els processos de reparació de l'ADN basats en la recombinació homòloga.

Existeixen altres factors de creixement, com el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), el TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), l'FGF (*Fibroblast Growth Factor*) i el NGF (*Nerve Growth Factor*) que es troben sobreexpressats en pancreatitis crònica i càncer de pàncreas (Yamanaka *et al.*, 1993; Friess *et al.*, 1993; Madro *et al.*, 2004). A més a més, els PDACs també presenten expressió elevada de l'IGF-I (*Insulin Growth Factor I*) tant a les cèl·lules tumorals com a l'estroma i activació aberrant del seu receptor a les cèl·lules tumorals (Ouban *et al.*, 2003).

3. Tractament del càncer de pàncreas

El càncer de pàncreas presenta un índex de supervivència molt baix, degut sobretot al diagnòstic en estadis avançats de la malaltia, a la naturalesa agressiva d'aquest tumor i a una resposta molt pobre als tractaments actuals. Avui en dia, el diagnòstic precoç és pràcticament impossible, degut a la seva localització anatòmica, a l'absència de símptomes fins als estadis avançats i a la manca de marcadors adequats i específics.

Actualment, la resecció del tumor localitzat és la única esperança de cura, però és tan sols aplicable a un 20% dels pacients, ja que la majoria presenten la malaltia en un estadi localment avançat o metastàtic inoperable. En aquests casos els pacients només es poden sotmetre a teràpia pal·liativa del dolor. Durant l'última dècada, el fàrmac més emprat ha estat la gemcitabina, que ha representat una millora de l'esperança de vida dels pacients de 5.6 mesos en front dels 4.4 mesos del 5-fluorouracil (5-FU), així com, un increment en l'índex de qualitat de vida (*Clinical Benefit Response*, que inclou: guany de pes, disminució del tractament contra el dolor i una millora de l'estat del pacient) (Burriss and Storniolo, 1997). Malgrat aquests tractaments, menys del 20% dels pacients continuen vius al cap d'un any, mentre que 5 anys després del diagnòstic no arriben al 5% (Warshaw and Fernandez-del Castillo, 1992; Van Cutsem *et al.*, 2004).

Els malalts amb un tumor resecable (menys del 20%) són sotmesos generalment a una pancreatoduodenectomia o cirurgia de Whipple. Aquesta és la tècnica més utilitzada i consisteix en l'extracció del cap del pàncreas junt amb el duodè, la vesícula biliar i el conducte secretor. En aquest tipus d'operació es deixa part del pàncreas perquè pugui seguir funcionant i es connecta a l'intestí prim (Brooks and Culebras, 1976; Lawrence and Ghosh, 1977). Un cop resecat el tumor, els pacients són tractats en adjuvència, ja que aquesta ajuda a reduir el risc de recidiva o a retardar-la (ESPAC-1). Actualment, també s'està realitzant un estudi comparatiu entre l'adjuvència amb 5-fluorouracil i àcid folínic respecte gemcitabina (ESPAC-3, v2). Per altra banda, també s'està analitzant l'efecte de la quimioteràpia neoadjuvant (abans de la cirurgia) amb la idea de disminuir el tamany del tumor per facilitar la cirurgia i tenir més possibilitats d'eliminar el tumor completament. La radioteràpia post-operatòria també ha estat assajada, però aquesta mostra pitjors resultats que la quimioteràpia, ja sigui sola o en combinació amb aquesta (ESPAC-1).

Actualment s'estant duent a terme diversos assajos clínics amb la finalitat de millorar la detecció i el tractament del càncer de pàncreas. Alguns dels assajos clínics que s'estan realitzant en adjuvència comprenen la comparació dels efectes de la quimioteràpia amb gemcitabina sola o combinada amb capecitabina (GEMCAP), la comparació de la gemcitabina sola o amb neo-adjuvència amb cisplatí (SONG) i el ja esmentat ESPAC-3. Per altra banda, alguns dels estudis pel tractament del càncer de pàncreas en estadi avançat consisteixen en: la

combinació d'un virus atenuat que permet l'expressió del citocrom P-450 (MetXia-OB83) amb la ciclofosfamida, la comparació de la gemcitabina sola amb la combinació amb la dalteparina (un anticoagulant) (FRAGEM), l'administració d'una vacuna per aquells tumors que expressen l'antigen carcinoembrionari a la membrana (ACVA), l'administració d'una vacuna (GV1001) contra els tumors amb la telomerasa activa o la comparació entre la gemcitabina sola o combinada amb erlotinib (un inhibidor de l'activitat tirosina quinasa del receptor d'EGF). De fet, l'erlotinib ha estat aprovat recentment als Estats Units pel tractament de càncer de pàncreas avançat i a Europa té la llicència des del gener d'aquest any.

4. Transportadors de nucleòsids

Els requeriments metabòlics tant de nucleòsids i nucleòtids com de les seves bases corresponents poden obtenir-se mitjançant tres vies diferents: dieta, síntesi *de novo* i via de recuperació. Les purines i les pirimidines poden ser sintetitzades *de novo* a través d'una via que suposa un elevat cost energètic i que està restringida a alguns tipus cel·lulars. Un mecanisme alternatiu és la via de recuperació o *salvage* que, a partir de la recuperació de bases i nucleòsids preformats, permet mantenir els nivells de nucleòtids amb un menor consum energètic. Aquesta via és imprescindible en aquelles cèl·lules que no poden realitzar la síntesi *de novo*, com les cèl·lules de la medul·la òssia, algunes cèl·lules cerebrals, eritròcits, leucòcits, entre altres (Rudolph, 1994).

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

Històricament, els transportadors de nucleòsids s'han classificat en base a les seves característiques cinètiques. Això ha portat a assumir que, com a mínim, existeixen set activitats de transport diferents responsables de la captació d'aquests substrats. Dos d'elles es caracteritzen per realitzar un transport de tipus equilibratiu, independent de sodi, mitjançant difusió facilitada gràcies al gradient transmembrana de concentració. Les cinc restants es corresponen amb activitats concentratives i sodi-dependents, que contribueixen a l'acumulació de nucleòsids a l'interior cel·lular amb la conseqüent despesa energètica. Tanmateix, amb la recent clonació dels diferents sistemes de transport s'ha obtingut una proporció diferent de transportadors equilibratius i concentratius de la que s'havia descrit cinèticament, ja que, fins a aquest moment s'ha clonat quatre transportadors equilibratius i tres concentratius.

4.1. Transportadors equilibratius

Els sistemes de transport equilibratiu són proteïnes que faciliten la difusió dels nucleòsids a través de la membrana plasmàtica a favor del seu gradient de concentració. Són transportadors independents de sodi i bidireccionals, és a dir, permeten tant l'influx com l'eflux del solut. Tot i que presenten una àmplia especificitat de substrat, acceptant tant purines com pirimidines, es caracteritzen per una baixa afinitat amb constants aparents que varien en el rang micromolar alt (100-800 μ M). A la taula 3 i la figura 7 s'exposen les característiques cinètiques dels sistemes equilibratius.

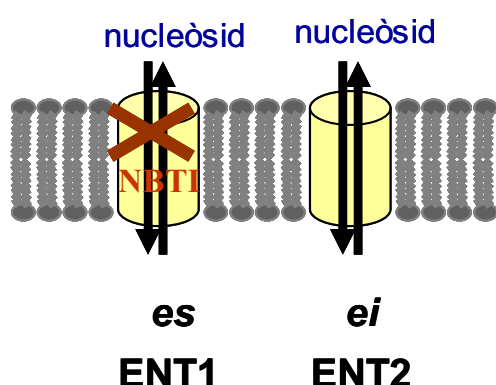


Fig. 6. Agències cinètiques de transport de nucleòsids equilibratius i entitats moleculars que les identifiquen. *es*: transport equilibratiu sensible a NBTI. *ei*: transport equilibratiu insensible a NBTI. ENT: entitats moleculars “equilibrative nucleoside transporter”

Cinèticament, s’han descrit dos grans sistemes que es diferencien segons la seva sensibilitat a un anàleg estructural de l’adenosina, la nitrobenziltioinosina o NBTI. Així, es parla de transportadors equilibratius sensibles (*es*), inhibibles per concentracions de NBTI de l’ordre nanomolar, i transportadors equilibratius insensibles (*ei*), no inhibibles fins i tot a concentracions superiors a 1 μ M. La quantitat d’anàleg que s’uneix al transportador és proporcional al grau d’inhibició observat, amb una estequiometria inhibidor/transportador de 1:1. Aquesta característica ha fet que la NBTI s’hagi utilitzat de manera rutinària com a lligand

Transportadors equilibratius			
Activitat	ADNc	Substrat (K _m)	Inhibidor
<i>es</i>	hENT1	Ado (40 μ M)	
		Guo (140 μ M)	NBTI
		Ino (170 μ M)	(0.4 nM)
		Urd (260 μ M)	dipirid.
		Tyd (300 μ M)	(5 nM)
		Cyd (580 μ M)	
<i>ei</i>	hENT2	Ado(100 μ M)	
		Ino (50 μ M)	NBTI
		Urd (250 μ M)	(2.8 μ M)
		Tyd (710 μ M)	dipirid.
		Cyd(5610 μ M)	(356 nM)
		Guo(2700 μ M)	
		nucleobases	

Taula 2. Propietats cinètiques dels transportadors de nucleòsids equilibratius.

per a caracteritzar i quantificar el nombre de transportadors presents a la membrana plasmàtica (Jarvis *et al.*, 1980; Tse *et al.*, 1985).

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

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

L'estructura predita per a la família de transportadors equilibratius consta de 11 hipotètics dominis transmembrana connectats per regions hidrofíliques curtes, a excepció de dos grans *loops* compresos entre els dominis transmembrana 1/2 i 6/7, que contindrien tres possibles llocs de N-glicosilació (Fig 8).

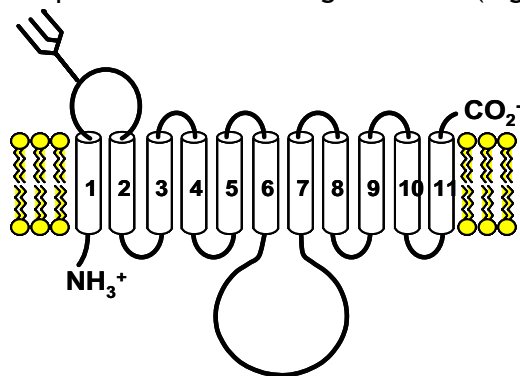


Fig. 7. Estructura molecular predita per a la família gènica de transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs).

Recentment, s'han identificat dues noves isoformes denominades ENT3 i ENT4 en teixits humans i murins (Hyde *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2004), ambdues amb una àmplia distribució tissular. Tant hENT3, de 475 aminoàcids, com hENT4, de 530 aminoàcids, presenten una baixa homologia amb hENT1, 29% i 18%, respectivament. hENT3 es caracteritza per presentar un domini N-terminal de 51 aminoàcids que conté dues regions dileucina, similars als dominis de localització en endosomes/lisosomes, que li confereixen una localització intracel·lular. hENT3 té una àmplia especificitat de substrat i transporta nucleòsids i adenina amb baixa

afinitat, però, a diferència dels altres transportadors equilibratius, és relativament insensible als inhibidors NBTI, dipiridamol i dilazep. A més, és altament dependent del pH, amb un pH òptim de 5.5, el que és consistent amb la seva localització en compartiments intracel·lulars amb pH àcid, com els lisosomes. La isoforma hENT4 va ser identificada en una anàlisi de seqüències del genoma i malgrat que inicialment va ser caracteritzat com un transportador de baixa afinitat de monoamines, s'ha demostrat que és capaç de transportar adenosina (Baldwin *et al.*, 2004).

4.2. Transportadors concentratius

Els sistemes de transport concentratius es classifiquen en funció de la seva especificitat de substrat, de manera que es coneixen fins a cinc subtipus diferents, tal i com s'indica en la taula 4. Com ja s'ha comentat prèviament, es tracta d'entitats dependents del gradient transmembrana de sodi que en condicions fisiològiques duen a terme únicament l'influx de substrats, amb la conseqüent acumulació intracel·lular i despesa energètica (Figura 9).

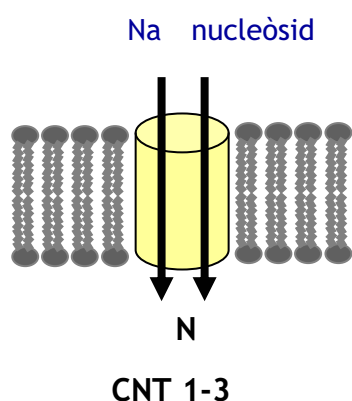


Fig. 8. Agències cinètiques de transport de nucleòsids concentratius i entitats moleculars que les identifiquen. N: transport concentratiu. CNT: entitats moleculars “concentrative nucleoside transporter”

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

Taula 3. Propietats cinètiques dels transportadors de nucleòsids concentratius.

Els dos sistemes majoritaris, **N1** i **N2**, són mútuament excloents per a la permeabilitat a formicina B (anàleg poc metabolitzable de la inosina) i timidina, respectivament. Anteriorment, **N1** es coneixia amb el nom de **cif**, sistema concentratiu insensible a NBTI que accepta formicina B com a substrat. La seva especificitat es restringeix a nucleòsids púrics i uridina. De la mateixa manera, **N2** s'anomenava **cit**, sistema concentratiu insensible a NBTI que accepta timidina com a substrat. Actualment sabem que s'encarrega del transport de pirimidines i tot i que inicialment es va determinar que podia transportar adenosina, recentment s'ha comprovat mitjançant tècniques d'electrofisiologia que és capaç d'unir-la però no de transportar-la (Larrayoz *et al.*, 2004). Finalment, el tercer dels sistemes de transport descrits en primera instància, **N3**, era antigament conegut com **cib**, degut a la seva àmplia especificitat de substrat, podent transportar tant formicina B com timidina. Respecte a l'estequiometria d'aquests sistemes de transport, s'ha descrit que el sistema **N1** presenta una estequiometria Na^+ /nucleòsid 1:1, mentre que la del sistema **N3** és de 2:1. En el cas de l'estequiometria del sistema **N2** hi ha divergència en els resultats, ja que per mètodes d'electrofisiologia s'han determinat estequiometries 2:1 (Larrayoz *et al.*, 2004) i 1:1 (Smith *et al.*, 2004).

Els dos sistemes dependents de sodi **N4** i **N5** s'han descrit amb posterioritat en tipus cel·lulars molt concrets. **N4**, caracteritzat en vesícules de vora en raspall de ronyó humà, accepta purines i pirimidines, però no formicina B ni inosina (Gutierrez and Giacomini, 1993). **N5**, la única activitat concentrativa sensible a la inhibició per NBTI i dipiridamol definida fins el moment, correspon a una activitat de transport sodi-dependent preferent per guanosina. Ha estat detectada en cèl·lules humanes NB4 de leucèmia promielocítica aguda (Flanagan and Meckling-Gill, 1997) i en limfòcits B humans (línies cel·lulars Raji i BSL-1) (Soler *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 2000).

No obstant, amb el projecte de seqüenciació del genoma humà completat, s'ha realitzat un anàlisi extensiu de les bases de dades per tal de trobar nous gens de la família dels CNTs amb resultats negatius. Aquestes dades apunten que els transportadors no clonats **N4** i **N5** formarien part d'una altra família gènica o serien variants dels CNTs o ENTs ja clonats (Kong *et al.*, 2004).

Malgrat al principi es va definir una topologia de 14 dominis transmembrana, estudis realitzats en base a la generació d'anticossos van cap a una nova predicció de 13 hèlix transmembrana (Hamilton *et al.*, 1997; Felipe *et al.*, 1998). Aquesta hipòtesi va ser confirmada per Hamilton i col·laboradors (2001) en definir la distribució subcel·lular i la topologia de rCNT1. Inequívocament una o ambdues de les asparagines $\text{Asn}^{605/648}$ situades en l'extrem carboxílic de la proteïna estarien glicosilades, fet que confereix la seva ubicació a l'espai extracel·lular. Els potencials llocs de N-glicosilació en l'extrem amino-terminal o entre els dominis transmembrana (hèlix 4 i 5) es mantindrien sense cadenes d'oligosacàrids. El model proposat és, en conseqüència, un model amb 13 dominis transmembrana,

amb l'extrem amino-terminal citoplasmàtic i l'extrem carboxi-terminal extracel·lular (Fig. 10).

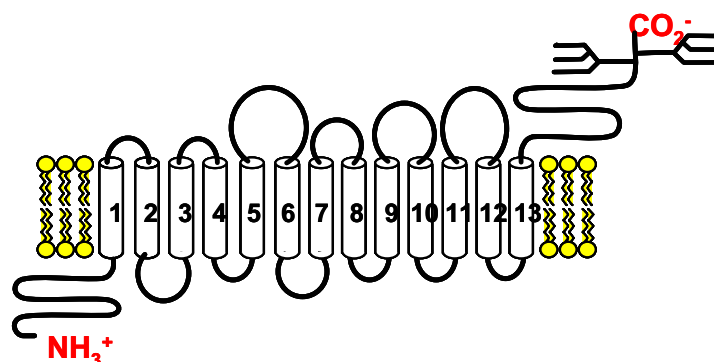


Fig. 9. Estructura molecular predita per a la família gènica de transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs).

4.3. Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids

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

Estudis de missatger i de proteïna han demostrat que ENT1 es troba expressat de manera ubiqua en els teixits humans i de rosegadors, malgrat que la seva abundància varia entre els diferents teixits (Griffith and Jarvis, 1996; Griffiths *et al.*, 1997a). Anàlogament, ENT2 s'expressa en una gran varietat de teixits, com cervell, cor, placenta, pàncreas, ronyó i múscul esquelètic, on és particularment abundant (Griffiths *et al.*, 1997b; Crawford *et al.*, 1998). Els transportadors ENT3 i ENT4 presenten també una àmplia distribució tissular, pràcticament ubiqua. De fet, ENT3 és particularment abundant en placenta, d'on ha estat clonat, i tal i com s'ha comentat prèviament presenta una localització intracel·lular (Baldwin *et al.*, 2004).

El primer transportador de nucleòsids clonat, CNT1 presenta un patró d'expressió ampli, malgrat que els seus nivells d'expressió són menors dels observats pels transportadors equilibratius (Valdes *et al.*, 2000; Pennycooke *et al.*, 2001). Comparat amb CNT1, CNT2 sembla tenir una distribució tissular més àmplia. Estudis de *Northern blot* han demostrat la seva expressió en cor, fetge, múscul esquelètic, ronyó, intestí, pàncreas, així com en leucòcits normals i en un gran nombre de teixits i línies cel·lulars tumorals (Wang *et al.*, 1997; Pennycooke *et al.*, 2001). Mitjançant RT-PCR i estudis recents d'hibridació *in situ*, s'ha

demostrat també la seva presència en cervell (Anderson *et al.*, 1996; Guillen-Gomez *et al.*, 2004). La distribució de hCNT3 es va analitzar mitjançant un *array* d'ARN. Els nivells d'expressió més elevats es van trobar en un gran nombre de teixits com glàndula mamària, pàncreas, medul·la òssia i tràquea, tot i que també es van detectar nivells baixos d'expressió en fetge, pulmó, placenta i cor, entre altres (Ritzel *et al.*, 2001).

4.4. Regulació dels transportadors de nucleòsids

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

5. Paper farmacològic dels transportadors de nucleòsids

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

5.1. Fàrmacs anàlegs de nucleòsids

Els derivats de nucleòsids utilitzats en la quimioteràpia formen un important grup d'antimetabòlits administrats en el tractament de càncers hematològics i de tumors sòlids. Aquests compostos mimetitzen els nucleòsids naturals en la captació i el metabolisme i per tant són incorporats a l'ADN, produint la inhibició de la seva síntesi i la terminació de la cadena. A més a més alguns poden, alhora, inhibir enzims clau del metabolisme de purines i pirimidines, inhibir la síntesi d'ARN o activar directament la cascada de les caspases, efectes que en darrera instància produiran la mort de la cèl·lula.

Existeixen diferents tipus d'anàlegs de nucleòsids que poden classificar-se en base al tipus de modificacions que presenten sobre el nucleòsid natural o al tipus de base modificada (purina o pirimidina)(Fig.6). Tots els anàlegs de nucleòsids presenten unes etapes comunes en la seva metabolització; el transport mitjançant transportadors específics, l'activació per quinases com la dCK permetent la retenció de la forma monofosforilada a l'interior cel·lular, la formació de metabòlits trifosfat actius i la desfosforilació mitjançant les 5'-nucleotidases (5'-NT).

Adicionalment, cada anàleg posseeix unes propietats específiques que poden explicar les diferències d'activitat mostrades en les diverses malalties. Així, per exemple, els principals anàlegs de purina, fludarabina (9- β -D-arabinosil-2-fluoroadenina) i cladribina (2-clorodesoxiadenosina), que són utilitzats majoritàriament en el tractament de leucèmies i limfomes, també poden exercir el seus efectes citotòxics sobre cèl·lules quiescents actuant sobretot en la reparació de l'ADN, més que en la replicació.

Els anàlegs de pirimidines són la gemcitabina (dFdC, 2',2'-difluorodesoxicitidina), la 5'-DFUR (5'-desoxi-5-fluorouridina), derivat del fàrmac capecitabina, i la nucleobase 5-fluorouracil (5-FU).

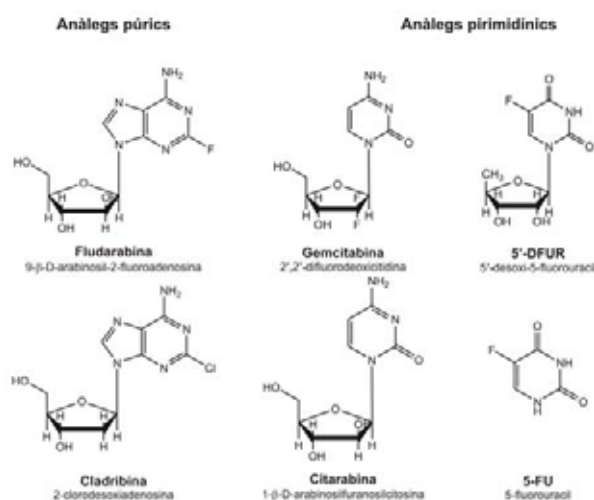


Fig. 10. Principals anàlegs de nucleòsids emprats en quimioteràpia.

En la taula 2 es mostren les principals aplicacions dels anàlegs de nucleòsids més utilitzats en clínica, així com les dosis més habituals.

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

Taula 4. Anàlegs de nucleòsids emprats en quimioteràpia. Modificada de Galmarini et al., 2002a

Com ja s'ha comentat anteriorment els fàrmacs més utilitzats pel tractament sistèmic del PDAC són antimetabòlits, derivats d'anàlegs de nucleòsids, concretament fluoropirimidines com la gemcitabina o el 5-FU.

5.1.1. 5-fluorouracil

El 5-fluorouracil (5-FU) és un anàleg d'uracil amb un àtom de fluor en la posició C5 que té activitat antitumoral en pacients amb càncer colo-rectal, de mama i de cap i coll. El 5-FU entra ràpidament a la cèl.lula per un mecanisme encara no descrit, si bé es postula que podria ser per difusió passiva (Wohlhueter *et al.*, 1980). Aquest agent necessita la seva activació metabòlica a 5-fluorodesoxuridina monofosfat (5-FdUMP), 5-fluorouridina trifosfat (5-FUTP) o 5-fluorodesoxuridina trifosfat (5-FdUTP). El 5-FU és catabolitzat principalment per la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) produïnt el metabòlit inactiu 5-fluorodihidouracil. Els efectes d'aquests compostos inclouen la inhibició de la timidilat sintasa (TS) per part de la forma monofosfat, 5-FdUMP, que produeix una depleció dels nucleòtids de timidina amb una inhibició subsegüent de la síntesi i reparació

de l'ADN. A més a més, s'incorporen a l'ARN provocant un processament i funció anòmales i la forma trifosfat 5-FdUTP s'incorpora a la cadena naixent d'ADN (Galmarini *et al.*, 2002a).

5.1.2. Capecitabina

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

5.1.3. Gemcitabina

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

La gemcitabina exerceix els seus efectes a diferents nivells. D'una banda, la dFd-CTP s'incorpora a l'ADN durant la seva replicació i tot seguit s'afegeix un nucleòtid natural addicional, evitant així la reparació de l'ADN per escissió d'un parell de bases. Aquest procés és conegut com la terminació emmascarada de la cadena i impedeix alhora que les ADN polimerases continuïn la síntesi (Gandhi *et al.*, 1995).

D'altra banda, la gemcitabina inhibeix la síntesi de l'ADN indirectament mitjançant la inhibició de la ribonucleòtid reductasa (RR), bloquejant d'aquesta manera la via de síntesi de *novo* de dNTPs. La depleció del nivell intracel·lular de dCTP resultant potencia alhora l'acció de la gemcitabina a l'augmentar la seva incorporació a l'ADN i l'activitat de la dCK, ja que aquesta està regulada pels nivells de dCTP (Heinemann *et al.*, 1995). Els nivells de dCTP no són els únics afectats, sinó que també es veuen deplecionats els de dATP i dGTP, fins i tot en un major grau (Smid *et al.*, 2001). Finalment, la gemcitabina és capaç

d'incorporar-se a l'ARN (Ruiz van Haperen *et al.*, 1993). A més a més, inhibeix directament la CDD i la dCMP desaminasa, disminuint així l'eliminació dels nucleòtids de gemcitabina (Plunkett *et al.*, 1995). S'ha demostrat que la dFdC inhibeix en un 90% l'activitat de la timidilat sintasa (TS), contribuint així a la depleció de dTMP (Ruiz van Haperen *et al.*, 1995). Amb aquestes característiques, l'acumulació del fàrmac és més eficient i la retenció a l'interior cel·lular de la forma trifosfat és major, millorant així la seva citotoxicitat.

El mecanisme pel qual produeix mort cel·lular és majoritàriament l'apoptosi, malgrat que els aconteixements moleculars concrets encara no han estat determinats (Bouffard and Momparler, 1995). S'ha proposat que l'apoptosi induïda per dFdC podria estar relacionada amb la incorporació de dFdCTP tant a l'ADN mitocondrial com al nuclear (Beausejour *et al.*, 2002). El fet que l'enzim mitocondrial timidina quinasa 2 (TK2) posseeixi una gran capacitat de fosforilar dFdC recolza aquesta hipòtesi (Wang *et al.*, 1999).

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

Tot i que en els darrers anys l'estudi del transport d'anàlegs de nucleòsids ha avançat força, calen encara més estudis per a completar la identificació dels transportadors específics responsables de la seva captació, i sobretot, les afinitats amb les que són transportats. En la **taula 5** es mostra la selectivitat de substrat i el patró farmacològic, encara incomplet, dels transportadors de nucleòsids.

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

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

Taula 5. Transport d'anàlegs de nucleòsids

S: substrat. Entre parentèsi, si s'ha descrit, s'indica la K_m . inh: no s'ha determinat si és substrat, però inhibeix el transport. NT. no es transporta. NT^a: no es transporta, però inhibeix el transport. Els espais en blanc corresponent a interaccions no determinades fins al moment.

Referències: Chandrasena *et al.*, 1997; Ritzel *et al.*, 1997; Lum *et al.*, 2000; Schaner *et al.*, 1999; Lostao *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000; Galmarini *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001; Cano-Soldado *et al.*, 2004; King, 2005

5.2.1. Estudis *in vitro*

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

Els estudis de cèl·lules deficientes en transportadors de nucleòsids també han generat evidències de la seva importància en la sensibilitat a anàlegs. La mutagènesi i selecció de cèl·lules de ronyó de porc PK-15 deficientes en transport va permetre aïllar unes cèl·lules 100 cops més resistents a tubercidina, citarabina i 5-fluorodesoxiuridina que la línia parental. Addicionalment, aquestes cèl·lules no transportaven ni timidina ni uridina i havien perdut els llocs d'unió d'alta afinitat per NBTI, corresponents a ENT1 (Aran and Plagemann, 1992). La línia cel·lular derivada de leucèmia CEM és sensible a l'acció dels anàlegs de nucleòsids gemcitabina, citarabina i troxacitabina, mentre que la línia deficient en dCK és resistent als tres anàlegs. Per contra, la línia deficient en transportadors de

nucleòsids és únicament resistent a gemcitabina i citarabina, però no a troxacitabina. L'estudi de la captació de troxacitabina va demostrar que aquest no era mitjançat per transportadors de nucleòsids, sinó que es produïa per difusió passiva, el que explica les diferències de sensibilitat entre anàlegs (Gourdeau *et al.*, 2001). Mackey i col·laboradors van analitzar la toxicitat a gemcitabina en diferents línies cel·lulars. Les seves dades van confirmar que les cèl·lules deficientes en transportadors de nucleòsids presentaven una resistència a gemcitabina, que podia arribar fins a 1800 vegades. En concordança, la inhibició dels transportadors equilibratius amb dipiridamol en aquelles cèl·lules sensibles a gemcitabina les feia resistents a la seva acció (Mackey *et al.*, 1998). Contràriament, un anàlisi similar fet en 3 línies cel·lulars de tumor de pàncreas i una de bufeta no va trobar cap tipus de correlació entre l'expressió d'ENT1 i la sensibilitat a gemcitabina (Rauchwerger *et al.*, 2000).

El National Cancer Institut (NCI) conté informació sobre sensibilitat a una gran varietat de fàrmacs en un ampli nombre de línies cel·lulars. Aprofitant aquestes dades, es va analitzar en 50 línies cel·lulars l'expressió dels 7 transportadors de nucleòsids clonats i els resultats obtinguts es van comparar amb les sensibilitats descrites en aquestes línies tant pels anàlegs de nucleòsids com per altres fàrmacs. Les anàlisis no van trobar cap correlació amb els anàlegs de nucleòsids, no obstant, n'hi havia entre l'expressió de CNT1 i la toxicitat a 2-metilguanina i entre ENT2 i la hidroxigua (Lu *et al.*, 2002). De manera similar, es van analitzar 60 línies cel·lulars mitjançant *microarrays* d'ADN específics per transportadors i els nivells d'expressió gènica resultants es van comparar amb la sensibilitat a 119 fàrmacs. A diferència de l'estudi anterior, en aquest existia una correlació positiva entre ENT1 i la sensibilitat als anàlegs azacitidina i inosina-glicodialdehid. A més, la inhibició d'ENT1 disminuïa l'efecte citotòxic d'aquests, el que demostrava el paper del transportador en la seva sensibilitat. Addicionalment, l'expressió de CNT1 correlacionava amb la sensibilitat a 6-mercaptapurina i la de CNT3 amb la de gemcitabina, citarabina i tioguanina (Huang *et al.*, 2004).

El fet que els transportadors equilibratius siguin bidireccionals fa que aquests també puguin eliminar el fàrmac de l'interior cel·lular, per tant la inhibició de l'eflux podria augmentar l'efecte citotòxic. En aquest sentit, en cèl·lules tumorals humanes la inhibició dels transportadors equilibratius amb dipiridamol, després d'un tractament de dues hores amb citarabina, potencia fins a 3 cops la sensibilitat a l'anàleg, el que ve recolzat per un augment d'ara-CTP intracel·lular (Chan, 1989). Resultats similars es van obtenir en la línia cel·lular de leucèmia L1210, en la que el dipiridamol potencia la citotoxicitat a 2-clorodesoxiadenosina. Addicionalment, en cèl·lules L1210 deficientes en ENT1, la presència de NBTI no afecta a la sensibilitat al fàrmac, mentre que en cèl·lules que expressen ENT1 i CNT2 la inhibició produeix una baixada de tres cops de la IC₅₀ (Crawford *et al.*, 1990).

Tots els estudis detallats fins ara analitzen únicament el paper dels transportadors equilibratius, en concret d'ENT1. Malgrat que els transportadors

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

5.2.2. Estudis clínics i anàlisis *ex vivo*

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

La relació entre la resistència clínica a citarabina i el transportador hENT1 ha estat, de lluny, la més estudiada. Les primeres evidències daten del 1982, quan Wiley i col·laboradors van observar en cèl·lules de leucèmies mieloblàstica i limfoblàstica agudes (LMA i LLA) que la captació de citarabina correlacionava amb el nombre de llocs d'unió de NBTI, mesura de la quantitat de transportadors ENT1. Addicionalment, aquells pacients que tenien baixos nivells d'hENT1 no responien de manera efectiva a la teràpia amb citarabina (Wiley *et al.*, 1982). Similarment, en cèl·lules aïllades de leucèmies agudes, la sensibilitat a fludarabina, citarabina i cladribina correlacionava amb l'abundància cel·lular d'ENT1 (Gati *et al.*, 1997). Wright i col·laboradors (Wright *et al.*, 2002) van utilitzar la unió del compost fluorescent SAENTA per quantificar el nombre de transportadors hENT1 en LLA infantil. En aquest cas però, tot i que es va obtenir una correlació positiva amb la sensibilitat a citarabina, la correlació amb la cladribina va ser negativa.

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

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

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

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

Amb l'objectiu de determinar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a fludarabina es van analitzar en 56 mostres de pacients de leucèmia limfàtica crònica (LLC) els nivells d'expressió d'ARNm dels transportadors responsables de la seva captació, hENT1, hENT2 i hCNT3. Els transportadors equilibratius no van mostrar cap tipus de relació, en canvi i sorprenentment, una major expressió de hCNT3 correlacionava amb un augment del risc de progressió de la malaltia. Addicionalment, aquests pacients tenien una resposta completa a la teràpia amb fludarabina menor. L'anàlisi de la localització de la proteïna va demostrar que aquesta no es trobava en la membrana, sinó que es localitzava en el citoplasma, per tant, no estaria implicada en la captació de la fludarabina a l'interior cel·lular (Mackey *et al.*, 2005).

L'anàlisi de l'expressió de hCNT1 en noranta tumors de mama demostra que el marcatge és majoritàriament citoplasmàtic. A més, el percentatge de cèl·lules positives es correlaciona amb una menor supervivència a llarg termini, suggerint que hCNT1 seria indicatiu de mala prognosi.

La **taula 6** resumeix els estudis realitzats de correlacions clíniques entre l'expressió de transportadors de nucleòsids i la sensibilitat a anàlegs.

Transp.	Tècnica	Malaltia	Fàrmac	Correlació	Referència
hENT1	Unió NBTI	LMA, LLA	ara-C	+	Wiley, 1982
hENT1	Unió NBTI	LMA, LLA	ara-C, 2CdA, Fara-A	+	Gati, 1997
hENT1	SAENTA	LLA	ara-C	+	Wright, 2002
hENT1	mRNA	LMA	ara-C	+	Galmarini, 2002
hENT1	mRNA	LLA	ara-C	+	Stam, 2003
hENT1	anticòs	T. pàncreas	dFdC	+	Spratling, 2004
hENT1	mRNA	LLA	2CdA	no	Stam, 2003
hENT1	anticòs	HD		no	Reiman, 2002
hENT2	anticòs	LLC	Fara-A	+	Molina-Arcas, 2005
hCNT3	anticòs	T. pàncreas	dFdC	no	Spratling, 2004
hCNT3	anticòs	LLC	Fara-A	-	Mackey, 2005
hCNT1	anticòs	T. mama	CMF	-	Gloeckner-Hofmann, 2006

Taula 6. Correlacions clíniques entre els transportadors de nucleòsids i la sensibilitat a anàlegs.

HD: malaltia de Hodgkin; ara-C: citarabina; 2-CdA: cladribina; Fara-A: fludarabina; dFdC: gemcitabina; CMF: teràpia combinada ciclofosfamida-metrotexat-5fluorouracil.
 +: correlació positiva; -: correlació negativa; no: no s'ha trobat cap tipus de correlació.

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

dificultats tècniques associades a la quantificació d'aquestes per contaminació dels clons neoplàsics amb teixit normal (Pastor-Anglada *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 1999).

5.3. Metabolisme dels anàlegs de nucleòsids

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

5.3.1. Enzims anabòlics

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

Els nucleòsids púrics també poden ser fosforilats per l'enzim mitocondrial **desoxiguanosina quinasa** (dGK). De manera similar a la dCK, fosforila els substrats naturals desoxiguanosina, desoxiadenosina i desoxiinosina i anàlegs com la gemcitabina (Sjoberg *et al.*, 1998).

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

5.3.2. Enzims catabòlics

Les **5'-nucleotidases** (5'-NT) desfosforilen els desoxinucleòtids per hidròlisi de l'enllaç éster generant el corresponent nucleòsid. Constitueixen una família d'enzims que difereixen en la seva localització subcel·lular i especificitat de substrat. L'ecto-5'-NT o CD73 es localitza a la membrana plasmàtica i degrada els

nucleòtids extracel·lulars a nucleòsids, de manera que poden ser transportats a l'interior de la cèl·lula i reutilitzats (Resta *et al.*, 1998). Existeixen dues 5'-NT majoritàries amb localització intracel·lular que es diferencien per la seva afinitat pel substrat, la 5'-NT de baixa K_m i la d'alta K_m (cN-I i cN-II, respectivament). La cN-II és específica de monofosfats púrics i és activada per ATP, mentre que els substrats de la cN-I són els monofosfats pirimidínics i la seva activitat és inhibida per ATP (Spychala *et al.* 1989). Darrerament, s'han descrit altres 5'-NT amb diferents localitzacions i especificitats, però el seu impacte en la desfosforilació d'anàlegs de nucleòsids no ha estat analitzat (Hunsucker *et al.*, 2001).

5.3.3. Ribonucleòtid reductasa

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

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

La RR de cèl·lules de mamífer es compon d'homodímers de dues subunitats diferents, R1 i R2, que formen l'enzim heterotetramèric actiu. La subunitat gran R1 de 85 kDa conté el centre actiu i els llocs d'unió al substrat, controlant, per tant, l'activitat catalítica i l'especificitat de substrat (Brown and Reichard, 1969). L'activitat de la RR ve regulada pel nivell de la subunitat petita de 45 kDa, R2, el qual varia al llarg del cicle cel·lular. La síntesi d'aquesta subunitat comença a l'inici de la fase S del cicle cel·lular i s'acumula lentament fins a la mitosi tardana on és degradada ràpidament. La subunitat R2 conté un radical lliure d'un àtom de ferro en el seu centre actiu que és essencial per a la seva activitat.

Recentment ha estat descobert un gen que codifica per a una nova subunitat de la RR, la **p53R2**, que està directament regulat per p53 (Tanaka H *et al.* 2000; Xue *et al.* 2003). El gen p53R2 té un elevat grau de similitud (80%) amb la subunitat R2 i pot formar complexos actius amb la subunitat R1. L'expressió de la subunitat p53R2, i no la R2, s'indueix de forma p53 dependent en resposta a dany a l'ADN. Així doncs, les cèl·lules deficientes en aquesta subunitat són més sensibles a l'acció dels agents que danyen l'ADN.

Tot això, suggereix l'existència de dues vies per a l'obtenció de dNTPs per a la síntesi d'ADN: una a través de la subunitat R2, involucrada en el manteniment normal de dNTPs per a la replicació de l'ADN durant les fases S/G₂ de forma dependent del cicle cel·lular, i l'altra, amb la p53R2 proporcionant els dNTPs per a la reparació de l'ADN en cèl·lules quiescents de forma dependent de p53 (Yamaguchi T et al, 2001; Lozano G et al, 2000).

De totes maneres, encara no queda clar com es regulen de forma coordinada aquestes dues subunitats, ja que p53 pot interactuar amb ambdues subunitats a nivell proteic per regular l'activitat de la RR. La p53 s'uneix a p53R2 i a R2 en cèl·lules quiescents, però després d'irradiar-les amb ultraviolats, aquestes es dissocien de p53 i s'uneixen a R1. p53R2, R2 i R1 es traslladen al nucli formant un complex actiu que proporciona dNTPs per a la reparació de l'ADN (Xue *et al.*, 2003).

5.4. Mecanismes de resistència a anàlegs de nucleòsids

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

5.4.1. Alteracions en el metabolisme dels nucleòsids

La **desoxicitidina quinasa (dCK)** és essencial per l'activació de molts anàlegs de nucleòsids. De fet, la resistència adquirida a aquestes substàncies ha estat atribuïda en molts casos a la deficiència d'aquest enzim.

En estudis de línies cel·lulars de càncer d'ovari humà s'ha relacionat la deficiència en dCK amb la resistència a gemcitabina (Ruiz van Haperen *et al.*, 1994; Ruiz van Haperen *et al.*, 1995; Kroep *et al.*, 1998). L'establiment de línies cel·lulars resistents a gemcitabina per exposició continuada a aquesta han estat relacionades amb una clara disminució o manca total de dCK en línies de càncer d'ovari i de càncer de pulmó (Ruiz van Haperen *et al.*, 1994; Achiwa *et al.*, 2004). Per altra banda, cèl·lules amb resistència adquirida a altres anàlegs de nucleòsids

poden al seu temps presentar resistència creuada a gemcitabina (Heinemann *et al.*, 1988; Bergman *et al.*, 1999; Dumontet *et al.*, 1999a).

La TK2 es capaç de fosforilar tant la gemcitabina com la desoxicitidina, tot i que l'especificitat per la gemcitabina constitueix únicament un 5-10% respecte la que té per la desoxicitidina. Per tant un increment en la relació dCK/TK2 porta a una relació dFdCTP/dCTP augmentada, contribuint així a augmentar l'activitat de la gemcitabina. S'ha vist que una activitat TK2 baixa pot predir una elevada sensibilitat a gemcitabina (Nielsen *et al.*, 1995).

La dCK juga un paper clau en l'activació de la gemcitabina i la seva activitat correlaciona amb la sensibilitat al fàrmac. Aquestes característiques fan que la dCK sigui un bon candidat per a la teràpia gènica (Manome *et al.*, 1996). En aquest sentit, ha estat suggerit que la manca de la seva activitat abans del tractament pot ser utilitzada com a un paràmetre predictiu (Kroep *et al.*, 2002).

Les **5'-nucleotidases** (5'-NT) s'oposen a l'acció de les quinases al catabolitzar la reacció de producció de nucleòsid a partir de nucleòtids. Per tant, a diferència de les quinases, un excés d'activitat confereix resistència als anàlegs de pirimidines (Hunsucker *et al.*, 2001). A la línia cel·lular d'eritroleucèmia K562 es va observar un augment de l'activitat 5'-NT associada amb la resistència a gemcitabina (Dumontet *et al.*, 1999b). La transfecció de cèl·lules HEK 293 amb el gen de 5'-NT I disminueix la sensibilitat a gemcitabina amb un factor de 22 (Hunsucker *et al.*, 2001).

La **ribonucleòtid reductasa** (RR) és inhibida per diversos anàlegs de nucleòsids, entre ells la gemcitabina (Lawrence *et al.*, 1997). Així doncs una manca d'efecte inhibitori o una activitat augmentada de l'enzim poden produir resistència (Goan *et al.*, 1999). De fet, existeixen mutacions en el centre al·lostèric de l'enzim que provoquen una resistència al control negatiu exercit pel dATP (Caras and Martin, 1988). En aquest context, una major activitat de la RR produeix un augment dels nivells de dNTPs que competeixen amb els anàlegs en la incorporació a l'ADN. Addicionalment, l'augment de dCTP inhibeix la dCK, contribuint d'aquesta manera a augmentar la resistència (Ohno *et al.*, 1988).

5.4.2. Alteracions de les vies apoptòtiques

L'objectiu final del tractament amb anàlegs de nucleòsids és que els danys cel·lulars que produeixen acabin conduint la cèl·lula a l'apoptosi. Per tant, defectes en la inducció de la maquinària apoptòtica, causarien per tant resistència al tractament. El dany causat sobre el DNA pels anàlegs de nucleòsids en la seva forma trifosfat es detecta per la proteïna p53, i per tant, les mutacions en el gen TP53 poden ser un mecanisme de resistència a la quimioteràpia amb anàlegs de nucleòsids (Wattel *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1997; Elsaleh *et al.*, 2001). Alhora, la pertorbació de la integritat mitocondrial s'ha suggerit com a important en la inducció d'apoptosi per anàlegs de nucleòsids (Marzo *et al.*, 2001). Així, les proteïnes de la família Bcl-2, inhibidores o activadores de

l'apoptosi, quan es troben desregulades es poden veure relacionades amb mecanismes de resistència. De fet, Bax i Bcl-2 s'han vist correlacionades en estudis clínics (Zaja *et al.*, 1998) encara que altres estudis no han trobat cap tipus de correlació (Thomas, 1996 #226 (Morabito *et al.*, 1997)).

5.4.3. Resistència a multi-drogues

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

Malgrat que un dels principals mecanismes descrits de resistència associats a MRPs és la sobreexpressió del gen MDR-1 (*multidrug resistance-1*), que codifica per la glicoproteïna-P, no s'ha demostrat que aquesta proteïna transporti anàlegs de nucleòsids. La capacitat d'exportar nucleòtids i, per tant, algunes formes fosforilades d'anàlegs de nucleòsids només s'ha determinat en tres proteïnes de la família ABC, MRP4, MRP5 i MRP8. De fet, existeix controvèrsia sobre la capacitat de MRP4 o MRP5 per induir resistència a anàlegs de nucleòsids antitumorals. Chen i col·laboradors (2001) no van trobar cap relació entre la sobreexpressió de MRP4 a NIH3T3 i la sensibilitat a cladribina, mentre que, altres estudis han posat de manifest una resistència significativa a citarabina, cladribina, gemcitabina i 5-fluorouracil per expressió heteròloga de MRP5 (Davidson *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2005). D'altra banda, l'expressió de MRP4 confereix resistència a diversos antivírics derivats de nucleòsids com l'AZT, però només a un antineoplàsic, la cladribina (Schuetz *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2003). Finalment, l'expressió de MRP8 disminueix la sensibilitat al 5-fluorouracil (Guo *et al.*, 2003). Tanmateix, degut a la dificultat de realitzar experiments de transport amb aquestes proteïnes, només s'ha demostrat el transport directe a través de MRP5 i MRP8 de les formes fosforilades del 5-fluorouracil (Guo *et al.*, 2003; Pratt *et al.*, 2005). El fet que siguin proteïnes de recent clonació i que el seu estudi acabi tot just de començar, fa que encara no s'hagin realitzat anàlisis de correlacions *in vivo*.

6. Comunicació intercel·lular

6.1. Unions de tipus Gap

La comunicació cèl·lula-cèl·lula mediada per unions de tipus Gap juga un paper important en el desenvolupament tissular, la diferenciació i la proliferació cel·lular mitjançant la regulació de la transducció de senyals i el cicle cel·lular. Aquestes unions es troben a tots els tipus cel·lulars dels vertebrats excepte a cèl·lules sense nucli com els eritròcits i les plaquetes, algunes neurones, fibres de múscul esquelètic madures i espermatozous (Willecke *et al.*, 2002).

Les unions gap són agrupaments de canals intercel·lulars que acoblen directament les cèl·lules adjacents (Fig 11). Aquests canals transmembrana de 15 Å de diàmetre permeten el pas cèl·lula-cèl·lula de diversos tipus de molècules hidrofíliques petites de fins a 1kDa com els ions inorgànics, metabòlits, nucleòtids, nucleòtids cíclics, segons missatgers, entre altres (Bruzzone *et al.*, 1996; Kumar and Gilula, 1996).

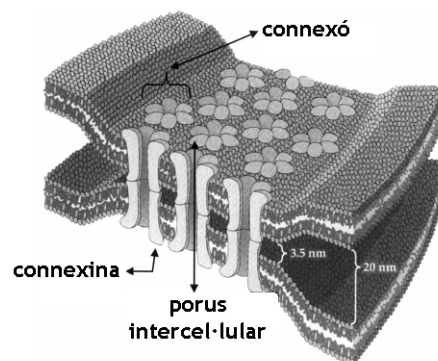


Fig. 11. Esquema de les unions de tipus gap.

Cada canal està format per dos hemicanals anomenats connexons. Aquests, estan constituïts per sis connexines (Cx) i poden ser homomèrics o heteromèrics.

6.2. Connexines

Actualment, en humans, s'han identificat 20 isoformes diferents de connexines, encara que la seva implicació en càncer només ha estat estudiada en algunes. Cada connexina mostra una expressió específica dependent del tipus cel·lular o del teixit, tot i que, molts òrgans i tipus cel·lulars expressen més d'una isoforma i les seves unions gap poden contenir més d'una isoforma. El patró d'expressió de les connexines s'altera durant el desenvolupament i en diverses situacions patològiques, el que produeix alteracions en l'acoblament cel·lular.

Les diferents connexines comparteixen algunes característiques relacionades amb la seva topologia i la capacitat de formar canals. Totes les connexines contenen 4 segments transmembrana, i el seu domini amino i carboxi-terminal estan localitzats al citoplasma (Milks *et al.*, 1988) (Fig. 12).

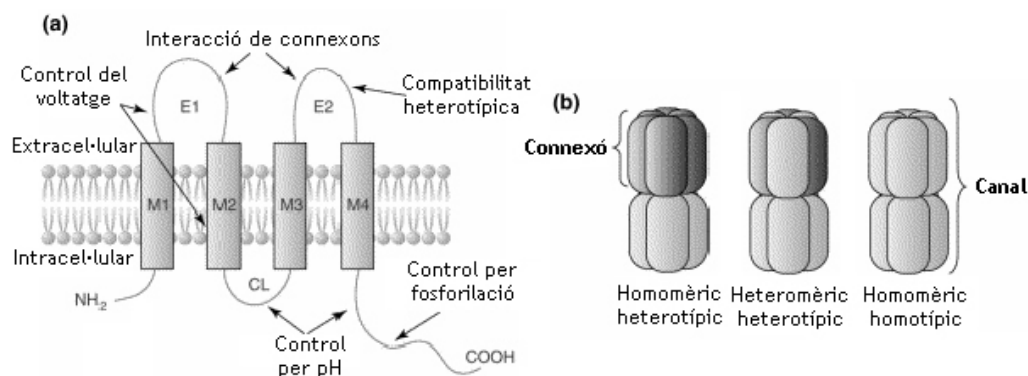


Fig. 12. Elements que formen les unions de tipus gap. a. Topologia de connexina tipus. b. Tipus de canals. Adaptat de Rabionet R et al, 2002.

Les connexines es poden classificar en dos grans grups anomenats α i β en funció de la seva seqüència (Kumar and Gilula, 1992). Les connexines d'un subgrup només es poden acoblar amb els membres del mateix subgrup tot i que, amb algunes excepcions (Harris, 2001). Els heteromers funcionals formats entre connexines del subgrup α inclouen Cx50 i Cx46 (Jiang and Goodenough, 1996), Cx43 i Cx37 (Brink *et al.*, 1997), Cx43 i Cx56 (Berthoud *et al.*, 2001) i Cx40 i Cx43 (He *et al.*, 1999). I els del subgrup β inclouen Cx32 i Cx26 (Bevans *et al.*, 1998) i Cx26 i Cx30 (Ahmad *et al.*, 2003). En aquesta línia la Cx43 (α) i la Cx26 (β) són incompatibles (Gemel *et al.*, 2004) així com la Cx43 (α) i la Cx 32 (β) (Guerrier *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1997; Das Sarma *et al.*, 2001). Per altra banda, la Cx45 pot formar combinacions heterotípiques (Elenes *et al.*, 2001) i heteromèriques (Martinez *et al.*, 2002) amb Cx43.

6.3. Connexines i progressió tumoral

Tradicionalment, la disminució de les unions Gap i/o les connexines ha estat relacionada amb el procés carcinogènic com a tret fenotípic general (Yamasaki *et al.*, 1996; Mesnil, 2002) tot i que, es fa difícil saber en quin estadi té lloc l'alteració. En molts casos, l'expressió disminuïda de connexines sembla ser un fenomen primerenc que ocorre en cèl·lules displàstiques o lesions precanceroses on s'ha hipotetitzat que podria contribuir a la seva progressió neoplàsica. Aquest seria el cas de la Cx43 que es troba molt disminuïda en regions displàstiques de cèrvix humà en relació al teixit normal (King *et al.*, 2000). L'hiperplàsia

d'endometri també mostra una expressió anòmala a la baixa de Cx26 i Cx32 (Saito *et al.*, 2001). En la mateixa línia, la manca de detecció d'unions Gap per criofractura en tumors de tiroides (adenomes i carcinomes) anirien en la línia d'un esdeveniment primerenc que afavoreix l'expansió clonal de cèl·lules anormals cap al càncer (Cochand-Priollet *et al.*, 1998).

Malgrat que, la disminució de l'expressió de connexines i la manca d'unions Gap en adenomes o en regions displàsiques de lesions precanceroses s'ha observat en un gran nombre de teixits, aquesta, no es pot assumir com a una norma general. Sovint la situació és més complexa i depèn dels teixit que es consideri.

Així doncs, a la laringe, no s'ha observat una diferència obvia en l'expressió de connexines; la Cx26 (capes parabasal i intermèdia), la Cx30 i la Cx43 (capes basal, parabasal i inferior) tenen un nivell d'expressió similar en teixit normal i lesions precanceroses. En contraposició, en algunes lesions displàsiques de laringe s'ha observat una sobreexpressió d'aquestes (Schneider *et al.*, 2002).

També s'ha observat un augment en l'expressió de Cx26 en un anàlisi histològic de 130 mostres de pacients de càncer de pròstata entre les àrees benignes i les canceroses (Tate *et al.*, 2006). En aquest sentit, en càncer de mama s'ha trobat una expressió augmentada de Cx43 en el teixit tumoral (Kanczuga-Koda *et al.*, 2003; Jamieson *et al.*, 1998); així com, un increment de Cx26 i Cx43 a les metàstasis de nòduls limfàtics, suggerint una contribució positiva a la metastatització (Kanczuga-Koda *et al.*, 2006).

6.4. Unions i efecte adjacent

La teràpia amb gens suïcides mitjançada pel gen de la timidina quinasa del virus de l'herpes simplex (HSV-tk) ha demostrat la seva capacitat d'eradicar cèl·lules tumorals en models *in vitro* i *in vivo*, així com en alguns assajos clínics quan s'exposen a l'anàleg de nucleòsid ganciclovir (GCV) (Culver *et al.*, 1992; Klatzmann *et al.*, 1998). Un cop el ganciclovir és fosforilat per la HSV-tk a l'interior de la cèl·lula, aquest és incorporat a les cadenes d'ADN que s'estan sintetitzant i provoca la seva finalització prematura, conduint les cèl·lules a la mort. Els experiments duts a terme amb aquesta combinació han posat de manifest que, encara que, tan sols una petita fracció de cèl·lules expressi el gen de la timidina quinasa l'efecte citotòxic del ganciclovir afecta a les cèl·lules adjacents. Aquest fenomen es coneix amb el nom d'efecte adjacent (*bystander effect*) (Moolten and Wells, 1990; Freeman *et al.*, 1993) (Fig. 13).

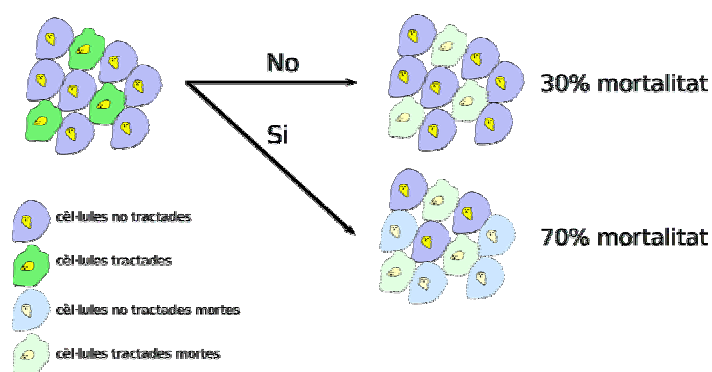


Fig. 13. Esquema de l'efecte adjacent. Quan aquest es produeix la mortalitat és superior al percentatge de cèl·lules tractades.

Aquest efecte adjacent és mediat o pot ser significativament augmentat per la comunicació intercel·lular duta a terme per les unions Gap tant *in vitro* com *in vivo* (Bi *et al.*, 1993; Mesnil *et al.*, 1996; Mesnil *et al.*, 1996; Makinen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Sembla que les formes del ganciclovir fosforilades per la HSV-tk i les quinases cel·lulars podrien passar directament a través de les unions, de la mateixa forma que ho fan els nucleòtids (Bi *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 1998; Yamasaki and Naus, 1996). En aquest sentit, s'ha demostrat que l'exposició de cèl·lules tumorals murines a fàrmacs que regulen positivament la formació d'unions gap, com ara l'apigenina, la lovastatina o l'àcid retinoic, indueix un augment en l'efecte adjacent del sistema HSV-tk/GCV, tant *in vitro* com *in vivo* (Park *et al.*, 1997; Touraine *et al.*, 1998). D'altra banda, el tractament amb fàrmacs que regulen negativament la formació d'unions gap, com l'àcid 18- α -gliciretínic (AGA), també provoca una inhibició d'aquest efecte (Mesnil *et al.*, 1997; Robe *et al.*, 2000; Carrio *et al.*, 2001).

El paper de les unions gap en l'efecte adjacent del sistema HSV-tk/GCV també ha estat demostrat mitjançant la modulació de l'expressió ectòpica de l'expressió de connexines en models *in vitro* i *in vivo*. D'una banda, l'augment de les unions Gap per transducció del ADNc de Cx26 a cèl·lules derivades de càncer de pàncreas correlaciona amb un increment en l'efecte citotòxic del sistema (Carrio *et al.*, 2001). D'altra banda, la transducció del ADNc de la Cx43 a cèl·lules tumorals implantades en el teixit subcutani de ratolins immunodeprimits és suficient per induir una regressió tumoral molt elevada tenint en compte el percentatge de cèl·lules que expressen el gen de la tk (Dilber *et al.*, 1997; Duflot-Dancer *et al.*, 1998).

7. Teràpia gènica

Malgrat els avenços introduïts en els darrers anys en la quimioteràpia, la radioteràpia i la cirurgia en el tractament contra el càncer, en molts casos aquests s'han demostrat insuficients. Així doncs, en tumors que per la seva naturalesa són molt difícils de tractar o reseca com els de pulmó i cervell o bé, en els que la seva detecció és tardana com els de pàncreas i ovari les teràpies actuals són ineficients. Per tant, la necessitat d'avançar cap a noves aproximacions terapèutiques que ens permetin vèncer aquest obstacles queda patent.

En aquest sentit, la teràpia gènica pot ser una eina molt potent per desenvolupar noves estratègies. Aquesta engloba un gran nombre d'estratègies que tenen en comú l'ús de material genètic per modificar les cèl·lules. Per tal que la teràpia gènica tingui èxit cal transferir el material genètic de forma eficient, específica i segura a la cèl·lula diana.

Els sistemes de transferència es poden dividir en dos grans grups vectors virals i vectors no virals. Aquests han de complir uns requeriments mínims que els facin aptes per a la seva utilització. La seva producció ha de ser senzilla i a gran escala i ha de poder actuar sobre la cèl·lula diana independentment de si aquesta es divideix o està quiescent. A més a més, és important que els efectes adversos sobre el pacient i la generació de la resposta immune siguin mínims.

Els virus són transportadors d'ADN naturals que poden introduir de manera molt eficient ADN forà a la cèl·lula hoste. Els vectors virals més utilitzats per generar vectors de transferència són: els adenovirus, els retrovirus (oncoretrovirus i lentivirus) i els adenoassociats. Els adenovirus (àmpliament descrits més endavant) es poden produir en grans quantitats, permeten la inserció de transgens de mida relativament alta i transdueixen de forma eficient cèl·lules quiescents i cèl·lules en divisió sense incorporar l'ADN al genoma de l'hoste. A més a més, l'administració clínica de dosis baixes o intermèdies són ben tolerades; a dosis elevades s'observa, per contra, toxicitat hepàtica (Christ *et al.*, 2000; Everett *et al.*, 2003). El principal inconvenient dels adenovirus com a vectors de transferència gènica *in vivo*, és la resposta immunològica i inflamatòria que generen a causa de l'expressió de proteïnes víriques en les cèl·lules infectades (Ali *et al.*, 1994). Per altra banda, els retrovirus es poden integrar de manera estable al genoma de la cèl·lula hoste, el que comporta el risc de que es produeixin insercions mutacionals com la disrupció d'un gen supressor o l'activació d'un protooncogen. A més a més, les quantitats que es poden produir són clarament més baixes que les que s'obtenen amb els adenovirus i alguns d'ells només poden infectar cèl·lules en divisió. Els vectors retrovirals derivats dels lentivirus permeten solucionar aquest problema.

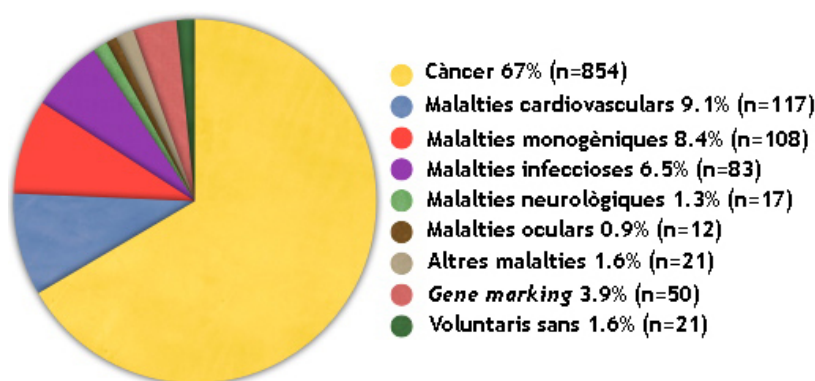
Malgrat l'ampli ventall de possibilitats que aporta la teràpia gènica, en aquesta tesi s'ha escollit els vectors adenovirals com a sistema de introducció del material genètic. Aquests, com ja s'ha esmentat abans, es poden produir en grans quantitats, es mantenen de forma episòmica a la cèl·lula hoste i en el cas dels

adenovirus no defectius la lisi induïda per la infecció viral produeix la mort de les cèl·lules tumorals diana, el que els converteix en un sistema adequat pel tractament de cèl·lules tumorals.

Avui en dia, 2/3 parts dels assajos clínics que s'estan duent a terme són pel tractament del càncer (Fig. 15), i d'aquests quasi el 40% utilitza vectors adenovirals (Wiley Database, 2004; <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Actualment pel que respecte al tipus d'estratègia, la teràpia gènica aplicada al càncer es pot dividir en sis grans blocs: (1) compensació de les mutacions, (2) quimioteràpia molecular, (3) immunopotenciació genètica, (4) modulació genètica de la resistència/sensibilitat, (5) inhibició de l'angiogènesi i (6) teràpia oncolítica o viroteràpia.

Malalties tractades en els assajos clínics de teràpia gènica



Tipus de gens transferits en els assajos clínics

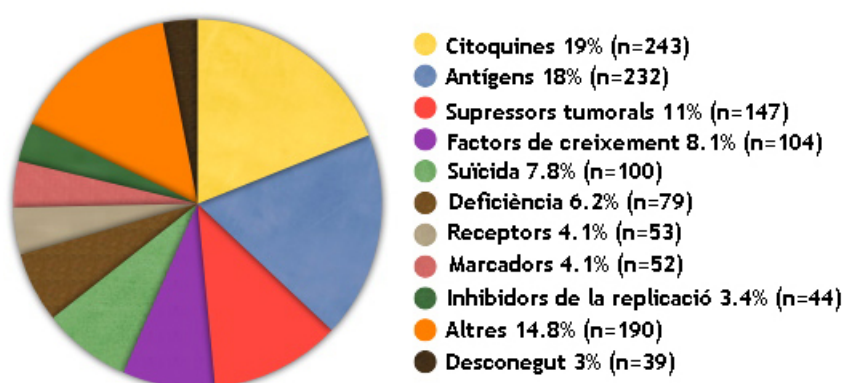


Fig 14. Distribució de les malalties tractades i tipus de gens transferits en assajos clínics de teràpia gènica. Extret de Wiley Database, 2004; <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

7.1. Compensació de les mutacions

El procés carcinogènic es caracteritza per alteracions en l'expressió dels supressors tumorals i els oncogens. Com ja s'ha comentat a l'apartat de càncer de pàncreas les alteracions d'alguns gens supressors tumorals (p53, p16) són freqüents.

A quasi el 12% dels assajos clínics de teràpia gènica en càncer, els gens introduïts a les cèl·lules diana són supressors tumorals (Wiley Database, 2004; <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). Els més utilitzats són p53, pRb, BRCA1, APC, INK4a, PTEN i ARF; tots ells tenen en comú la seva implicació en el control del cicle cel·lular i l'apoptosi i entre ells destaca p53 com el més emprat.

La infecció amb Ad-p53 inhibeix el creixement *in vitro* i induïx l'apoptosi de diferents tipus de cèl·lules canceroses: de pulmó (Swisher *et al.*, 1999), de colon (Spitz *et al.*, 1996), de cap i coll (Clayman *et al.*, 1998), d'ovari (Modesitt *et al.*, 2001), de mama (Parker *et al.*, 2000) i de pàncreas (Cascallo *et al.*, 2000). En un assaig clínic internacional, els pacients de càncer d'ovari agrupats de forma aleatòria per ésser tractats amb quimioteràpia convencional o la combinació amb p53, el grup de p53 va patir una elevada mortalitat inesperada (Zeimet and Marth, 2003). En contra a aquests resultats desencorajadors, en càncer de pròstata la reintroducció de p53 va produir un augment en l'apoptosi (Pisters *et al.*, 2004). En glioma també s'han obtingut resultats satisfactoris (Lang *et al.*, 2003). Normalment, l'aproximació més freqüent consisteix en combinar l'expressió de p53 amb quimioteràpia. Experiments *in vitro* han demostrat que l'expressió de p53 funcional sensibilitza les cèl·lules als citostàtics clàssics com el cisplatí i la doxorubicina (Ganjavi *et al.*, 2005; Pagliaro *et al.*, 2003). Resultats del nostre grup demostren que la combinació de l'Adp53 amb la gemcitabina produeix inhibició del creixement i inducció d'apoptosi tant en models *in vitro* com *in vivo* en tumors subcutanis de cèl·lules tumorals pancreàtiques (Cascallo *et al.*, 2000 i Cascallo *et al.*, 2005).

Per altra banda, quan les alteracions es produeixen per sobreexpressió dels oncogens, els vectors adenovirals es poden utilitzar per reintroduir oligonucleòtids antisentit que poden bloquejar l'expressió de l'oncogen (Yang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001). De fet, la combinació de la reintroducció de p53 i la inhibició del ribozim erbB2 s'ha demostrat eficaç en un model de càncer de bufeta (Irie *et al.*, 2006).

7.2. Quimioteràpia molecular

La quimioteràpia molecular o teràpia de gens suïcides consisteix en la introducció de gens que codifiquen per enzims necessaris per la metabolització de

pro-drogues no citotòxiques i convertir-les en productes citotòxics. Els sistemes més utilitzats són el ja esmentat ganciclovir/HSV-tk, la citosina deaminasa d'*Escherichia coli* i la 5-fluorocitosina.

En els últims temps s'han dut a terme diversos assajos clínics en fase I o I/II utilitzant diversos vectors per transferir el gen de timidina quinasa a diferents tipus de tumors com el melanoma maligne (Klatzmann *et al.*, 1998), l'adenocarcinoma de pròstata (Herman *et al.*, 1999), el mesotelioma pleural (Serman *et al.*, 1998), el glioma maligne (Immonen *et al.*, 2004; Sandmair *et al.*, 2000) i en tumors cerebrals primaris o d'origen metastàtic (Trask *et al.*, 2000). Tenint en compte els resultats obtinguts en aquests assajos clínics, es pot concloure que és possible transferir de forma segura el gen de la HSV-tk a una gran varietat de neoplàsies mitjançant la injecció intratumoral de vectors retrovirals i adenovirals. L'administració posterior de GCV no comporta una toxicitat significativa.

7.3. Immunopotenciació genètica

El desenvolupament de càncer indica que el sistema immunològic és ineficient per reconèixer i respondre de forma adequada als antígens tumorals. Això, és degut a la dèbil immunogenicitat de les cèl·lules tumorals i al fet que durant el procés carcinogènic no es produeix ni inflamació ni dany tissular que pugui ser reconegut com a perill per l'organisme. La immunopotenciació genètica consisteix en aconseguir una immunització activa contra els antígens associats als tumors mitjançant la transferència d'aquests o dels components cel·lulars del sistema immunològic. Els assajos clínics que introdueixen els gens que codifiquen per citoquines diferents són quasi una quarta part (24%, Wiley Database, 2004; <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

La resposta immune antitumoral pot ser augmentada per la introducció de la interleuquina-12 (IL-12) a les cèl·lules tumorals (Barajas *et al.*, 2001).

Una altra aproximació, la vacunació, consisteix en la immunització activa o la modulació dels components del sistema immunològic per millorar la seva capacitat de reconèixer i rebutjar els antígens tumorals. La utilització d'aquesta estratègia només és possible en tumors que expressin antígens específics. Després de la presentació dels antígens tumorals al sistema immunològic de l'hoste, els efectors d'aquest han de poder destruir les cèl·lules tumorals que els expressin (Henderson *et al.*, 2005).

7.4. Modulació genètica de la resistència/sensibilitat

La manca d'eficàcia de la quimioteràpia actual és deguda a la baixa expressió de proteïnes necessàries per a la seva activació o bé a l'augment de les que

participen en la seva detoxificació. En aquest sentit, el 5-fluorouracil (5-FU), àmpliament usat en el tractament del càncer de pàncreas, presenta resistències que dificulten l'èxit de la teràpia. L'expressió de l'uracil fosforibosil transferasa (UPRT) permet superar la resistència. La transducció d'UPRT mitjançant un adenovirus replicatiu en un model de disseminació intraperitoneal de càncer de pàncreas combinat amb el tractament amb 5-FU disminueix la càrrega tumoral sense efectes adversos (Oonuma *et al.*, 2002).

Per altra banda, la transducció de la deoxicitidina quinasa en un model de glioma sensibilitza les cèl·lules al tractament amb citarabina tan *in vitro* com *in vivo* (Manome *et al.*, 1996).

7.5. Inhibició de l'angiogènesi

L'angiogènesi consisteix en la formació de nous vasos sanguinis a partir de la vasculatura madura pre-existent. Aquest procés és imprescindible per la supervivència dels tumors de més d'1 mm de diàmetre i contribueix a la progressió tumoral i a les metàstasis. Independentment de l'origen del tumor, aquests poden ser tractats inhibint l'angiogènesi. En aquesta aproximació, les cèl·lules diana són les endotelials normals i genèticament estables i, per tant, no poden desenvolupar resistències. Ha estat descrit que la destrucció d'una cèl·lula endotelial que participa en el procés angiogènic produeix la mort d'unes 100 cèl·lules tumorals. Les cèl·lules endotelials activades que participen en el procés angiogènic expressen receptors específics i marcadors en la seva superfície (Ruoslahti, 2002). Aquestes molècules poden ser emprades com a receptors diana cap als que els adenovirus que contenen el transgèn terapèutic poden ser redirigits (Popkov *et al.*, 2005).

7.6. Teràpia oncolítica o viroteràpia

La viroteràpia o teràpia viral del càncer es basa en la lisi selectiva de la cèl·lula tumoral i es fonamenta en la propietat inherent del virus de lisar la cèl·lula per replicació de les pròpies partícules víriques. En aquesta aproximació el virus s'amplifica per si sol i es propaga pel tumor a partir de la infecció inicial d'unes poques cèl·lules. Així doncs, l'èxit de la mateixa es basa en el fet que la replicació viral es restringeixi a la cèl·lula tumoral. Existeixen diverses estratègies de redireccionament per tal d'assegurar la restricció de la replicació viral a la cèl·lula tumoral. Aquestes estratègies es poden dividir en tres grans grups. La primera consisteix en la utilització de lligands heteròlegs bi-específics que s'uneixen a ambdós, el vector viral i a una diana de la superfície cel·lular. La segona estratègia utilitza vectors virals genèticament modificats on el lligand

cel·lular es troba incorporat. La tercera inclou la construcció de vectors quimeres recombinants on la càpside proteica d'un virus s'intercanvia per la d'un altre.

Diversos virus atenuats, dissenyats per replicar en teixits de forma específica, han estat utilitzats en assajos clínics per aconseguir l'oncolisi específica de diverses neoplàsies. Entre aquests s'inclouen adenovirus (Habib *et al.*, 2002; Freytag *et al.*, 2003; Makower *et al.*, 2003; Chiocca *et al.*, 2004; Galanis *et al.*, 2005) i el virus de l'*herpes simplex* (Harrow *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2005; Shillitoe and Pellenz, 2005). A més a més, el major coneixement del cicle viral ha permès la utilització de virus de RNA com el virus de la malaltia de Newcastle, el de l'estomatitis vesicular o els reovirus entre altres (Baxi *et al.*, 2000; Csatory *et al.*, 2004; Lichty *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2004).

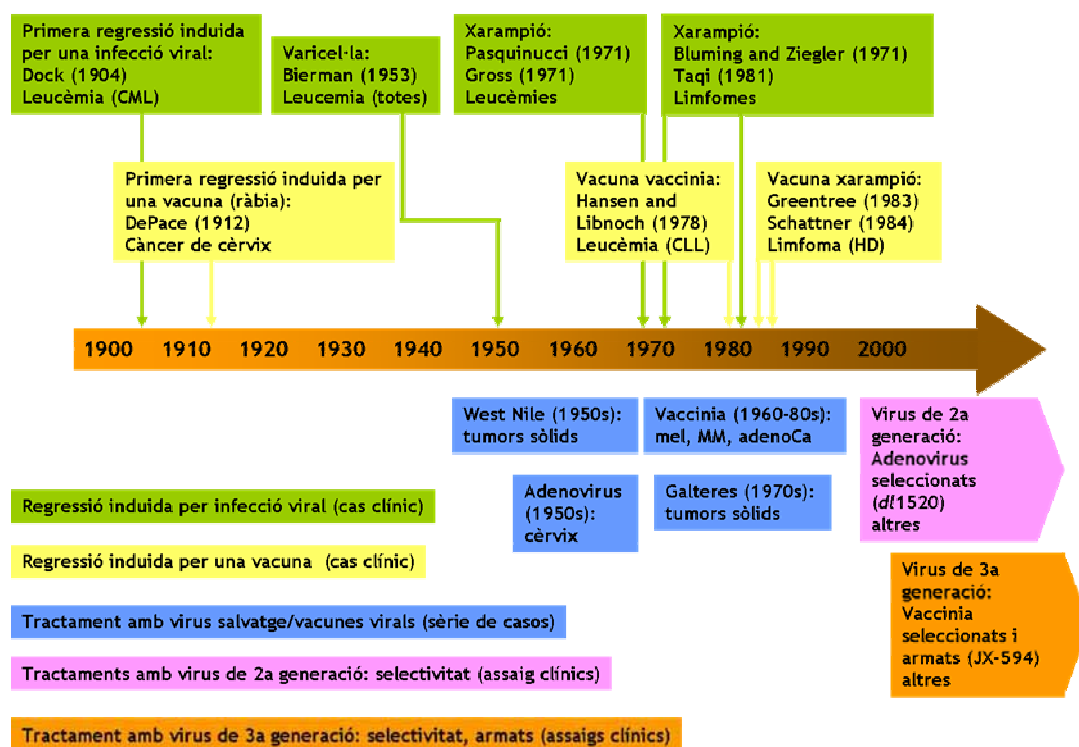


Fig. 15. Història de l'aplicació clínica dels virus en càncer. Adaptat de Liu TC *et al.* 2007.

8. Agents adenovirals per a la viroteràpia oncolítica

Els vectors basats en els adenovirus han esdevingut els candidats d'elecció per la viroteràpia oncolítica *in vivo*. De totes maneres, aquests no tenen una predilecció natural per les cèl·lules tumorals.

8.1. Característiques generals dels adenovirus

8.1.1. Estructura viral i biologia molecular

Els adenovirus van ser descoberts fa més de mig segle per Rowe i els seus col·laboradors mentre intentaven cultivar teixit adenoide (Rowe *et al.*, 1953). Els adenovirus són virus d'ADN sense embolcall lipídic amb una càpside icosaèdrica (Fig. 16). La càpside està formada per 252 subunitats anomenades capsòmers, 240 proteïnes de l'hexó (II) i 12 proteïnes del pentó (III). A més a més, també conté les proteïnes pIIIa, pVI, pVIII i pIX.

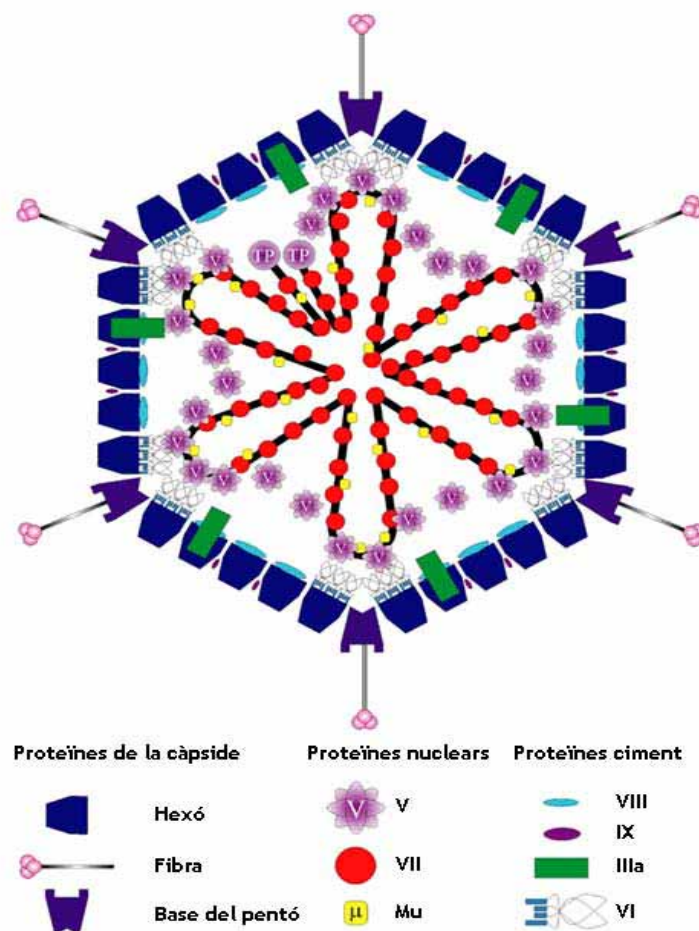


Fig. 16. Estructura proteica de l'adenovirus. Les localitzacions de les proteïnes de la càpside o majoritàries i de les proteïnes ciment. Adaptat de Russell WC 2000.

A cada vèrtex de la càpside hi ha una proteïna del pentó rodejada per 5 hexons. El pentó actua com a ancoratge per la proteïna de la fibra que sobresurt del virus com una antena. La fibra (IV) és un homotrimer on tres polipèptids idèntics es col·loquen amb orientació paral·lela i conté tres dominis estructurals i

funcionals diferents: l'N-terminal que uneix de forma no covalent la fibra al pentó, la C-terminal o domini knob responsable de la unió al receptor i el shaft que té una llargada variable en funció del serotip adenoviral. A la natura es poden trobar 51 serotips diferents que es classifiquen en 6 grups. Els adenovirus poden causar infeccions agudes del tracte respiratori alt, febre faringoconjuntival, conjuntivitis i gastroenteritis, però no presenten potencial oncogènic en humans.

El genoma adenoviral està format per ADN lineal de doble cadena flanquejat per repeticions terminals invertides (ITRs; *Inverted Terminal Repeats*) de 100-140 pb de llarg que actuen com elements en *cis* durant la replicació del genoma viral. La proteïna terminal que es troba covalentment unida a l'extrem 5', serveix com a encebador inicial per a la replicació. A més a més, de l'ADN el centre nucleoproteic conté les proteïnes pV, pVI, pVII i mu.

El genoma adenoviral es troba organitzat en unitats transcripcionals, 5 primerenques (E1A, E1B, E2, E3 i E4), 4 intermèdies (Iva2, IX, VAI i VAII) i una tardana. La primera proteïna que s'expressa quan arriba al nucli de l'hoste és la E1A. Aquesta proteïna activa en *trans* les altres unitats transcripcionals primerenques, el producte de les quals indueix l'entrada de la cèl·lula a la fase S del seu cicle per crear un ambient adequat per a la replicació viral (Berk, 1986). La proteïna E1B s'uneix a p53, Bak i Bax (Sundararajan *et al.*, 2001) i inhibeix l'apoptosi dependent de p53 permetent la supervivència de les cèl·lules infectades. La unitat E2A codifica proteïnes incloses en la replicació del genoma viral com l'ADN polimerasa, la proteïna pre-terminal i la proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla (de Jong *et al.*, 2003). La proteïna E3 trastorna la resposta immune de l'hoste i permet la persistència de les cèl·lules infectades (Bennett *et al.*, 1999), mentre que la unitat E4 codifica proteïnes que participen en el control del cicle cel·lular i la transformació (Tauber and Dobner, 2001). Els gens de la fase tardana es transcriuen en forma d'un llarg transcrit precursor des del *major late promoter* (MLP) i codifiquen per les proteïnes estructurals de la càpside (Zhang and Imperiale, 2003).

L'assemblatge de les partícules virals al nucli comença unes 8 hores després de la infecció i esdevé en la producció d'una progènie 10^4 - 10^5 partícules per cèl·lula, que són alliberades de la cèl·lula com a partícules madures unes 30-40 hores més tard mitjançant la lisi de la cèl·lula (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).

8.1.2. Unió i entrada a la cèl·lula hoste

El primer receptor responsable de la unió de tots els serotips adenovirals excepte els del grup B, és el *Coxsackie-adenovirus receptor* (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997; Roelvink *et al.*, 1999; Tomko *et al.*, 1997). A més a més, l'adenovirus pot utilitzar altres molècules com a receptors com el *major histocompatibility complex I* (MHC I) i els glicosaminoglicans d'heparan sulfat (Dehecchi *et al.*, 2001).

La infecció de la cèl·lula comença amb la unió de gran afinitat del virus al CAR per la porció knob de la proteïna de la fibra seguida de la internalització de la partícula. Un motiu RGD exposat al pentó s'uneix amb baixa afinitat a les integrines α_v de la superfície cel·lular ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_v\beta_1$), desencadenant l'endocitosi del virus (Meier *et al.*, 2002; Nemerow and Stewart, 1999; Stewart *et al.*, 1997; Wickham *et al.*, 1993). Mentre l'adenovirus entra indueix macropinosi, que tot i que no és crucial per la seva entrada, juga un paper important en el seu alliberament de la vesícula endosomal. Un cop al citoplasma, els virions es desplacen pels microtúbuls cap al nucli on s'uneixen al complex del porus nuclear (Meier and Greber, 2004) i entren al nucli.

Així doncs, la transducció de les cèl·lules tumorals depèn en gran part de l'expressió del receptor CAR (Fuxe *et al.*, 2003), en concordança, la transducció augmenta a mesura que ho fa l'expressió del receptor (Hemminki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Sachs *et al.*, 2004). També s'ha vist que alguns agents quimioterapèutics com el cisplatí, poden induir l'expressió de CAR fins i tot a dosis baixes (Hemminki *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2004).

A més a més, la biodistribució de l'adenovirus no només depèn dels nivells de CAR (Alemany and Curiel, 2001). L'administració intravenosa d'aquests provoca en ratolins l'acumulació al fetge, la melsa, el cor, els pulmons i els ronyons, encara que aquests teixits no tenen perquè ser necessàriament els que expressin més CAR. Les cèl·lules de Kupffer del fetge tenen un paper important en l'aclariment dels adenovirus del corrent sanguini (Schiedner *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002).

8.2. Adenovirus replicatius condicionals

El disseny dels adenovirus replicatius condicionals (CRAd, *Conditionally Replicative Adenovirus*) es basa en el fet que molts càncers tenen mutacions en els gens de p53 i pRb. El 1996, Bischoff i col·laboradors (Bischoff *et al.*, 1996) van generar un adenovirus deficient en E1B per tal d'aconseguir l'oncolisi de forma específica. Aquest adenovirus (dl1520 o ONYX-015) conté una deleció de 827 parells de bases a E1B55kD (i una deleció parcial d'E3) que li hauria de permetre replicar només a les cèl·lules defectives en p53 (50% dels tumors), tot i que aquest principi també ha estat qüestionat (Harada and Berk, 1999). Malgrat tot, aquest adenovirus ha mostrat una elevada activitat antitumoral tant *in vitro* com *in vivo*, utilitzant models murins de càncer (Ganly *et al.*, 2001; Portella *et al.*, 2002; Georger *et al.*, 2003). El potencial preclínic mostrat va fer que es portessin ràpidament a assajos clínics, on actualment s'està testant en diversos tipus de tumors inclosos el de cap i coll recurrents (Ganly *et al.*, 2000; Nemunaitis *et al.*, 2001), el de pàncreas (Mulvihill *et al.*, 2001), el colorectal (Reid *et al.*, 2001), el d'ovari (Vasey *et al.*, 2002) i l'hepatobiliar (Makower *et al.*, 2003). De totes maneres, la resposta clínica ha estat variable, segurament degut al fet, que la replicació de l'ONYX-015 es veu clarament disminuïda respecte l'adenovirus

salvatge, probablement degut a la implicació de la proteïna E1B en la transcripció dels gens de la fase tardana (Harada and Berk, 1999).

Per altra banda, l'Ad5- Δ 24 conté una deleció de 24 pb de la regió E1A, que és la responsable de la unió a pRb. Un adenovirus amb aquesta deleció presenta dificultats per superar el punt de control del cicle cel·lular G₁-S i per tant només replicarà eficientment en cèl·lules que tinguin mutacions a la via de pRb-p16, el que és freqüent a les cèl·lules tumorals (Fueyo *et al.*, 2000). Altres adenovirus oncolítics han estat testats en assajos clínics de fase I. Així el CV706 ha estat dissenyat per replicar de forma específica en cèl·lules tumorals positives per l'antigen específic de pròstata (DeWeese *et al.*, 2001) amb l'expressió dels gens necessaris per a la replicació sota el control de l'esmentat antígen.

A més a més, aquests adenovirus replicatius també poden ser dotats de gens terapèutics que els permetin augmentar l'oncolisi. L'Ad5-CD/TKrep és un adenovirus similar a l'ONYX-015, però també conté un gen de fusió de la citosina desaminasa i la HSV-tk que permet la combinació de la viroteràpia amb la teràpia de gens suïcides (Freytag *et al.*, 2002).

8.3. Direccionament dels adenovirus

Un dels obstacles comuns en la teràpia gènica contra el càncer és la diferenciació entre la cèl·lula normal i la tumoral. En aquest sentit, s'estan realitzant diversos estudis per intentar identificar molècules que s'expressin de forma diferencial a la superfície de la cèl·lula tumoral, el que permetrà redirigir els adenovirus, i la resta de vectors emprats en teràpia gènica, cap a la cèl·lula tumoral.

Existeixen dues maneres de dirigir els adenovirus: el direccionament transduccional, pel qual el vector es dirigeix directament cap a les cèl·lules tumorals i el direccionament transcripcional, que restringeix l'expressió del transgèn a teixits concrets.

8.3.1. Direccionament transduccional

El direccionament transduccional inclou les modificacions genètiques i químiques dels adenovirus amb la finalitat de modificar el seu tropisme pel receptor natural cap al receptor escollit. L'estratègia ideal consisteix en bloquejar la unió al receptor CAR i introduir un nou tropisme cap a un receptor o algun altre marcador que s'expressi de forma diferencial a la superfície de la cèl·lula tumoral (Everts and Curiel, 2004).

Existeixen dos mètodes: el genètic, també conegut com el d'un component, i el físic o de dos components.

El direccionament genètic consisteix en la incorporació de lligands que reconeguin receptors cel·lulars específics i/o bloquegin la unió a CAR.

El 1998 Krasnykh i cols identificaren el *HI-loop* al monòmer knob com un lloc potencial per la modificació genètica de la fibra de l'adenovirus. El *HI-loop* està exposat al knob de la fibra, presenta un cert grau de flexibilitat i no té un paper significatiu en les interaccions intermoleculares que poden influir en l'estabilitat de la fibra (Barnett *et al.*, 2002; Krasnykh *et al.*, 1998; Krasnykh *et al.*, 2000). El *HI-loop* permet la inserció de pèptids de fins a quasi 100 aminoàcids amb efectes negatius mínims per a la integritat del virió. El pèptid inserit al *HI-loop* més conegut és l'RGD, motiu d'unió a integrines α_v (Dmitriev *et al.*, 1998). La inserció de pèptids que contenen el motiu RGD a la proteïna de la fibra augmenten la unió a integrines a la superfície de la cèl·lula sense alterar l'estructura tridimensional de la fibra ni la seva capacitat per trimeritzar (Belousova *et al.*, 2002; Krasnykh *et al.*, 1998).

Els lligands també es poden inserir al domini C-terminal de la proteïna IX (Dmitriev *et al.*, 2002), al C-terminal de la proteïna de la fibra (Wickham *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 1999), i al L1-loop de la proteïna de l'hexó (Vigne *et al.*, 1999). Per altra banda, a la natura existeixen serotips adenovirals que no s'uneixen al receptor CAR, el que permet el redireccionament de l'adenovirus 5 mitjançant el canvi de la proteïna de la fibra per una anàloga d'un altre serotip (Denby *et al.*, 2004; Rea *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2003).

El direccionament físic és un mètode que consisteix en la conjugació amb l'adenovirus d'una molècula bi-específica que s'uneix específicament a la fibra bloquejant la unió a CAR i al mateix temps amb un receptor o molècula de la cèl·lula diana.

8.3.2. Direccionament transcripcional

El direccionament transcripcional restringeix l'expressió del gen introduït a unes cèl·lules concretes, i s'aconsegueix col·locant el gen d'interès sota el control d'un promotor específic de teixit o de tumor. Després de la transducció d'aquests adenovirus, el transgèn tan sols s'expressarà a les cèl·lules tumorals que tinguin els factors de transcripció adequats per l'activació del promotor (Robson and Hirst, 2003). De totes maneres cal anar en compte a l'escollir el promotor, ja que pot ser que aquest perdi la seva especificitat al ser introduït al genoma viral (Ambriovic *et al.*, 1997).

9. Models preclínic de cancer de pàncreas

Qualsevol tipus de nova teràpia que es vol testar, ha de passar un seguit de proves que en determinin la seva eficàcia *in vitro*. Un cop determinat el seu efecte potencial aquesta s'ha d'assajar en models *in vivo* abans de poder-los dur a la clínica. Actualment, existeixen diferents models preclínic de càncer de pàncreas que permeten l'estudi de noves teràpies. Els models més emprats són els

que es basen en l'establiment de tumors d'origen humà en ratolins immunodeprimits. La majoria consisteixen en l'inòcul subcutani de línies cel·lulars originalment derivades de tumors pancreàtics. Aquest model presenta una limitació clara, ja que l'entorn on es desenvolupa no té res a veure amb l'entorn real del tumor original. Això es pot solucionar mitjançant l'establiment dels tumors al pàncreas del ratolí, el que permet la seva irrigació i interacció amb un entorn més proper al del pacient, alhora que permet la formació de metàstasis. Tot i això, aquest tipus de models provenen generalment de línies cel·lulars totalment adaptades a créixer en un entorn artificial i la seva capacitat de reproduir les característiques reals del tumor són limitades.

Un gran avenç de la última dècada en la biologia del càncer ha estat el reconeixement de les interaccions dinàmiques entre el tumor i l'hoste (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cèl·lules tumorals estan subjectes als senyals positius i negatius de l'entorn incloent les cèl·lules estromals, les proteïnes de la matriu, l'endoteli, les cèl·lules del sistema immunoògic i les cèl·lules epitelials veïnes. Això no invalida els models establerts a partir de línies cel·lulars, però és obvi que presenten limitacions clares per determinar l'efecte de les teràpies sobre els elements extrínsecs a la mateixa cèl·lula.

El model murí de PDAC ha de reflexar les alteracions genètiques del tumor humà així com les seves característiques histològiques i moleculars. A més a més, ha de poder reproduir el patró metastàtic i ha de reproduir els efectes dels fàrmacs emprats en humans. Aquests models es poden dividir en: ratolins manipulats genèticament per desenvolupar tumors al pàncreas o ratolins als quals se'ls inoculen cèl·lules o implanten fragments tumorals al teixit subcutani o al pàncreas.

9.1. Models murins manipulats genèticament

Aquests models es caracteritzen pel desenvolupament *in situ* del tumor en un ratolí immunocompetent. Durant els darrers anys s'han realitzat diferents intents de reproduir el model de progressió del càncer de pàncreas en ratolins modificats genèticament. Així doncs, s'ha vist que ratolins *knockout* amb mutacions constitutives o condicionals dels gens supressors de tumors DPC4 (Yang *et al.*, 2002), BRCA2 (Suzuki *et al.*, 1997), p16^{INK4a}/ARF (Serrano *et al.*, 1996), i TP53 (Donehower *et al.*, 1992) no desenvolupen cap PanIN o PDAC, suggerint que cap mutació única d'aquests supressors inicia el càncer de pàncreas. Al mateix temps, ratolins amb oncogens alterats han demostrat la seva capacitat per desenvolupar càncer de pàncreas exocrí, però aquest no reproduïen les característiques bàsiques dels PanINs o del PDAC posant de nou de manifest les dificultats per establir un model genèticament modificat que representi d'una manera clara el càncer de pàncreas humà. La majoria dels models transgènics publicats consisteixen en l'expressió d'oncogens i factors de creixement amb promotors

heteròlegs la majoria actius a les cèl·lules acinars del pàncreas (Tuveson and Hingorani, 2005). El primer que segueix una progressió similar als PanIN humans s'ha generat mitjançant l'expressió condicional d'un al·lel de k-ras mutat. Aquest desenvolupa tumors amb histologia similar als humans amb un 100% de penetrància a edats avançades després d'una llarga latència, el que corrobora la complexitat d'aquest tumor i el paper de k-ras en els inicis del procés carcinogènic (Hingorani *et al.*, 2003). Un dels models que més s'aproxima al model de progressió tumoral humà consisteix en la mutació condicional de l'oncogen k-ras i el supressor tumoral p53. Aquests desenvolupen PDAC avançat a edats primerenques amb un 100% de penetrància i recapitulen característiques de la malaltia en humans com poden ser similaritats histopatològiques en el teixit neoplàsic, localització d'algunes metastàsis i caquèxia (Hingorani *et al.*, 2005). De totes maneres, el moment en el que els ratolins desenvolupen el tumor és molt variable degut al fet que aquestes dues mutacions són insuficients i per tant, requereixen l'aparició d'altres alteracions. Això dificulta la utilització d'aquests models per l'anàlisi pre-clínic de fàrmacs i els fa uns bons candidats per l'anàlisi de les alteracions necessàries pel desenvolupament del PDAC.

9.2. Models murins establerts a partir de cèl·lules o teixit humà

Aquests models es poden classificar segons el material de partença o segons el lloc de l'inòcul.

El material de partença per establir els tumors poden ser línies cel·lulars o bé teixit tumoral i aquests alhora es poden inocular al teixit subcutani o bé, a l'òrgan d'origen, en aquest cas el pàncreas. Els tumors establerts al teixit subcutani a partir de línies cel·lulars presenten una elevada reproductibilitat i permeten analitzar els efectes d'una teràpia concreta en un model tridimensional conegut i ben caracteritzat. Tanmateix, aquest no permet analitzar les interaccions tumor-hoste al no estar localitzat al pàncreas. Aquesta limitació es pot solucionar implantant les cèl·lules directament o bé, una porció del tumor subcutani ja establert al pàncreas. Aquest model permet l'angiogènesi i l'establiment de metastàsis però, continua sense reflexar la complexitat cel·lular i histològica del PDAC.

En aquest sentit, els models establerts a partir de teixit tumoral pancreàtic preservarien les característiques histològiques del tumor. Seguint aquestes premisses i amb la finalitat de tenir una plataforma que permeti l'anàlisi de noves teràpies, recentment ha estat posat a punt un model establert a partir de l'implant subcutani de teixit tumoral fresc en ratolins atímics (Rubio-Viqueira B *et al.* 2006). Aquests tumors no presenten variacions significatives en els principals gens alterats en el PDAC en les primeres generacions i permeten obtenir grans quantitats de material. De totes maneres, aquest model no està establert al

pàncreas, i per tant no es troba en un entorn adequat i no reproduïx una de les característiques bàsiques d'aquest tumor, les metastàsis.

Seguint aquesta línia, des de la passada dècada algun grup ha establert models ortotòpics a partir de fragments tumorals procedents directament del pacient (Reyes G et al 1996). Aquest darrer treball, va posar de manifest que els tumors així implantats presentaven una elevada estabilitat genètica i la capacitat d'establir un patró de metastàsis definit. Aquest model permet mantenir els adenocarcinomes de pàncreas in vivo i per tant esdevé una font de teixit quasi inesgotable per a la realització de diversos estudis. Una de les aplicacions més interessants és el testatge i la validació de protocols nous o ja establerts per determinar l'eficàcia de fàrmacs.