

TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS

CARMEN LLUÍS, JOSEPA MALLOL, JULIÀ BLANCO, JOAN SAYÓS, FRANCISCO CIRUELA I RAFAEL FRANCO*

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona. C. Martí i Franquès, 1. 08071 Barcelona.
fax núm.: 34-3-4021219; tel.: 34-3-4021208; correu electrònic: r.franco@ub.es*

*Autor per la correspondència.

Paraules clau: Transport de nucleòsids, purines, adenosina, uridina.

INTRODUCCIÓ

La presència de transportadors específics per a nucleòsids ha estat descrita en nombrosos tipus cel·lulars. Els factors que justifiquen l'existència d'aquests transportadors són diversos. En primer lloc hi ha cèl·lules, com ara eritròcits, neurones o cèl·lules del tracte gastrointestinal, que són deficientes en la síntesi *de novo* de purines i pirimidines i, per tant, llur supervivència depèn de la captació dels compostos. En segon lloc, hi ha cèl·lules que tenen la capacitat de transportar alguns metabolits d'un compartiment a l'altre. Un exemple és el de les cèl·lules renals que tenen com a principal missió la reabsorció de compostos com els nucleòsids, per ésser reutilitzats per l'organisme. En tercer lloc, l'existència a l'espai extracel·lular de receptors d'adenosina i d'enzims del metabolisme purínic en la majoria de tipus cel·lulars, necessita un mecanisme de translocació de nucleòsids entre l'interior

i l'exterior de la cèl·lula que col·labori en el control de les concentracions extracel·lulars dels compostos. Totes aquestes raons no sols justifiquen sinó que fan realment necessaris els transportadors de nucleòsids en les cèl·lules animals.

Qualsevol fenomen de transport implica la transferència d'un substrat a través d'una membrana cel·lular i té lloc per tres mecanismes diferents: la difusió simple, la difusió facilitada i el transport actiu. En el cas dels nucleòsids s'ha de fer una distinció entre transport i incorporació cel·lular (*uptake*). Transport és el pas d'un solut d'un costat a l'altre de la membrana. La incorporació abraça el transport i la metabolització intracel·lular (o intravesicular) del compost transportat. En aquest article hem posat èmfasi en el transport, si bé experimentalment és, de vegades, molt difícil de destriar el transport de nucleòsids de la incorporació (*uptake*).

DIFUSIÓ SIMPLE DE NUCLEÒSIDS

La difusió simple d'una molècula a través d'una bicapa lipídica és, per definició, no concentrativa, insaturable en augmentar la concentració de substrat, no inhibible per inhibidors específics, i bidireccional; el procés depèn únicament de la hidrofobicitat i de la grandària de la molècula a transportar. Es dona per suposat que aquest tipus de transport no requereix cap proteïna transportadora i mostra una forta dependència de la temperatura.

La difusió simple de l'adenosina és quantitativament una ruta minoritària, que podria arribar a ésser important si el gradient de concentració entre ambdós costats de la membrana fos molt gran. La velocitat de pas dels nucleòsids per difusió simple és lenta comparada amb els sistemes de difusió facilitada i és insuficient en la majoria de situacions fisiològiques.

EL TRANSPORT EQUILIBRATIU DE NUCLEÒSIDS

El transport per difusió facilitada de tipus passiu és també un procés no concentratiu i bidireccional, per tant és un procés equilibratiu. A diferència de la difusió simple, la difusió facilitada requereix la presència d'una proteïna de membrana que sigui la responsable de la translocació del substrat, per tant, és un fenomen saturable en augmentar la concentració de substrat i té inhibidors molt específics.

El transport equilibratiu dels nucleòsids adenosina i d'uridina, que és el que més s'ha estudiat, és molt ràpid, de gran capacitat, àmplia especificitat de substrat i reversible. Els valors de K_m per diferents nucleòsids naturals i sintètics es mostren a la taula I. El sistema és ubic i s'ha descrit en nombrosos

tipus cel·lulars animals. La resposta d'aquest sistema a la inhibició per la nitrobenziltioinosina (NBTI, 6-(4[-nitrobenzil]tio)-9-beta-D-ribofuranosilpurina) ha permès la subdivisió del transportador equilibratiu de nucleòsids en dues formes: la forma sensible a NBTI (que s'inhibeix a concentracions nanomolars del compost) i la forma resistent a NBTI (inhibible a concentracions micromolars de NBTI). Basant-se en aquest fet, Crawford i Belt (1991) proposaren una nomenclatura per als transportadors nucleosídics: la forma sensible a NBTI s'anomena *es* (equilibratiu i sensible a NBTI) i la forma resistent, *ei* (equilibratiu i insensible a NBTI). La distribució d'ambdós tipus de transportadors és variable en funció del tipus cel·lular i de l'espècie en estudi.

Transportadors sensibles i insensibles a NBTI

L'NBTI (Figura 1), un potent inhibidor del transport d'adenosina i d'altres nucleòsids, s'uneix amb alta afinitat (< 5 nM) als llocs d'unió de la membrana plasmàtica que s'acoblen funcionalment a alguns sistemes de transport nucleosídic de tipus *es* (o en són part). Els llocs d'unió de NBTI causen el bloqueig del transport de nucleòsids en els sistemes *es* (Jarvis i Young, 1980). Aquesta hipòtesi ha estat avalada per diverses evidències experimentals: la K_d de la unió de NBTI en aquests llocs d'elevada afinitat és aproximadament del mateix ordre que la constant d'inhibició del transport ($K_i < 2$ nM, Plagemann i Wolhueter, 1980; Young i Jarvis, 1983; Griffith *et al.*, 1992; Doherty i Jarvis, 1993). A més, el temps necessari per a la unió de l'NBTI als llocs d'alta afinitat i el necessari per a causar la inhibició del transport són del mateix ordre.

Diversos derivats nucleosídics, relacionats estructuralment amb l'NBTI, són també

TAULA I. Constants de Michaelis-Menten pel transport equilibratiu de nucleòsids naturals i anàlegs a cèl·lules de mamífers.

Nucleòsid	K_m (μM)	Referència
Adenosina	50-150	Lum <i>et al.</i> , 1979.
5'-Metiltioadenosina	74, 184	Stoeckler i Li, 1987
Timidina	150-250	Wohlkueter i Plagemann, 1982
Uridina	170-300	Plagemann <i>et al.</i> , 1981
Deoxicidina	500-700	Plagemann i Wohlkueter, 1980
Citidina	2000-4000	Plagemann i Wohlkueter, 1980
2-Cloroadenosina	20-40	Jarvis <i>et al.</i> , 1985
8-Azidoadenosina	80	Jarvis <i>et al.</i> , 1986
5-Iodo-2'-deoxiuridina	90	Mahony i Zimmerman, 1984
5'-Deoxiadenosina	115	Kessel, 1978
Tubercidina	50-120	Plagemann i Wohlkueter, 1983
Tricicilil nucleòsid	156	Plagemann i Wohlkueter, 1983
Tiazofurina	170	Monks <i>et al.</i> , 1985
Citosina arabinosid	250-750	Koren <i>et al.</i> , 1979
3-Deazauridina	250	Dahlig-Harley <i>et al.</i> , 1984
6-Azauridina	3600	Belt i Weoch, 1983
Deoxicoformicina	> 10000	Chen <i>et al.</i> , 1984

potents inhibidors del transport de nucleòsids i poden competir amb l'NBTI en experiments d'unió. Entre ells tenim els 9-beta-D-pentafuranòsids de 6-tiopurines, com la nitrobenziltioguanosina (NBTG) i els substituents en N⁶ de l'anell de purina com l'^N⁶-(p-azidobenzil)adenosina (Figura 1, Paterson *et al.*, 1983). Actualment és un fet ben establert que és el grup lipofílic nitrobenzil el responsable de la més gran afinitat de l'NBTI (i anàlegs) respecte a l'afinitat que presenten els substrats naturals. El grup nitrobenzil sembla interaccionar amb una zona hidrofòbica de la molècula del transportador.

Diferents fàrmacs amb activitat vasodilatadora són, també, potents inhibidors del transport equilibratiu de nucleòsids. L'efecte farmacològic és degut a l'acumulació d'adenosina extracel·lular que provoca la relaxació de la musculatura del vas sanguini. Els reactius més emprats han estat el dipiridamol, el dilazep i el diazepam (Figura 1, Kolassa *et al.*, 1971; Miras-Portugal *et*

al., 1986; Jarvis *et al.*, 1983). El lloc d'unió i el mecanisme molecular d'activació d'aquests inhibidors no nucleosídics no són prou coneguts. El que sí se sap és que, en una mateixa preparació, el dipiridamol presenta més llocs d'unió que l'NBTI, la qual cosa resulta sorprenent i inexplicable fins al moment (Deckert *et al.*, 1994 *citació*). Una altra observació interessant és que els inhibidors no nucleosídics mostren una variabilitat en llur comportament que no es veu reflectida en canvis d'especificitat pels substrats naturals. Aquest fet suggereix que els inhibidors no interaccionen exclusivament amb el transportador, sinó que també reconeixen algun component de l'entorn del transportador.

El primer estudi immunològic aparegut a la literatura, que indica aparentment que hi ha una gran homogeneïtat de seqüència entre els transportadors equilibratius sensibles a NBTI de diferents espècies (Kwong *et al.*, 1992). Això es pot explicar considerant un sol gen de què deriven diferents formes del transportador o a partir de diferents

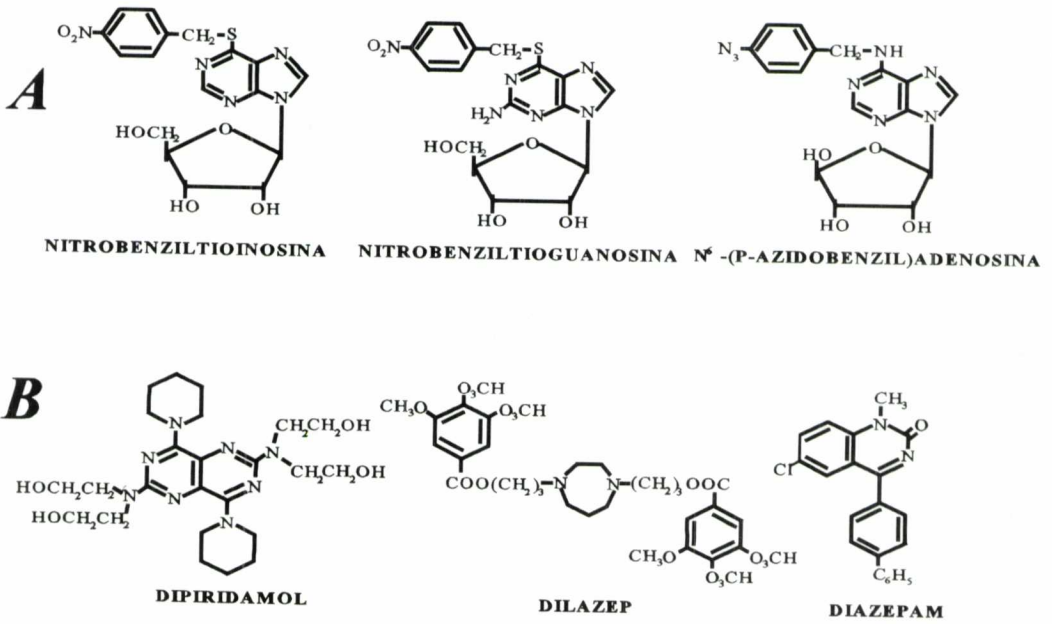


FIGURA 1. Estructures dels inhibidors del transport nucleosídic equilibratiu. Relacionats (A) i no relacionats (B) estructuralment amb l'adenosina.

gens que codifiquin molècules amb elevada homologia de seqüència. Sorprenentment, el mateix anticòs, emprat per a localitzar el transportador *es* de les membranes luminals de trofoblast de placenta, no reconeix el transportador present a les membranes contraluminals que també és sensible a NBTI (Barros *et al.*, 1995). Els autors suggereixen que hi pot haver tota una família de proteïnes provinents de gens diferents però amb un mateix lloc de reconeixement per a NBTI. La confirmació de quines són les hipòtesis més correctes requereix esperar a la clonació de tots els transportadors equilibratius. De moment la clonació del transportador equilibratiu no ha estat possible si bé Boumah *et al.* (1994) han aconseguit expressar un transportador de coriocarcinoma humà sensible a NBTI en oòcits de *Xenopus laevis*.

Hi ha sistemes model que presenten curves dosi-resposta que són bifàsiques per

a la inhibició per NBTI del transport d'adenosina. Un percentatge del transport és inhibït amb un valor de IC_{50} als voltants de 0,25 nM, mentre que la resta es manté insensible fins i tot a concentracions més elevades de 1 μ M. Els estudis de sensibilitat dels transportadors de nucleòsids davant el p-cloromercurifenil sulfonat (p-CMBS) han demostrat que el transportador NBTI-insensible és inhibït a concentracions micromolars del reactiu. Al contrari, el transportador NBTI-sensible no es veu afectat pel p-CMBS. La inhibició que exerceix el p-CMBS és revertida per ditiotreitòl i beta-mercaptoetanol i també els substrats són capaços de protegir-lo de l'efecte de l'inhibidor. Tot això suggereix la presència d'un grup tiol al centre de reconeixement de nucleòsids en el transportador insensible a NBTI (Tse *et al.*, 1985; Plagemann i Woffendin, 1984). Actualment, hi ha contro-

vèrsia amb relació a si els transportadors nucleosídics *es* i *ei* representen dues formes de la mateixa molècula o són dues entitats que provenen de gens diferents.

Caracterització del transportador nucleosídic equilibratiu

El transportador sensible a NBTI (*es*) d'eritròcits humans ha estat purificat (Jarvis i Young, 1981) mitjançant el mateix procediment emprat per a purificar el transportador de sucres (Wheeler i Hinkle, 1985). El mètode de purificació inclou la cromatografia de bescanvi iònic i dona un bon rendiment amb graus de purificació compresos entre 10 i 15 vegades. En les fraccions del purificat, el transportador de nucleòsids no representa més d'un 3% i el major percentatge de proteïna correspon al transportador de

glucosa (Rampal *et al.*, 1986). Gràcies als experiments de fotomarcatge amb [3 H]NBTI, el transportador de nucleòsids s'ha identificat com una proteïna de membrana amb heterooligosacàrids, amb un pes molecular de 45-65 kD segons el grau de glicosilació (Lienhard *et al.*, 1984; Ciruela *et al.*, 1994). El transportador equilibratiu de nucleòsids no sols co-purifica sinó que co-migra amb el transportador equilibratiu de glucosa quan es fa electroforesi en gels de poliacrilamida (Kwong *et al.*, 1986). Més recentment, el transportador de eritròcit de porc ha estat purificat quasi a homogeneïtat mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic seguida d'una cromatografia d'immunoafinitat amb anticossos dirigits contra el transportador de glucosa que retenen pràcticament tot el transportador de sucres (Kwong *et al.*, 1988). El transportador obtingut s'ha utilitzat per generar anticossos policlonals que

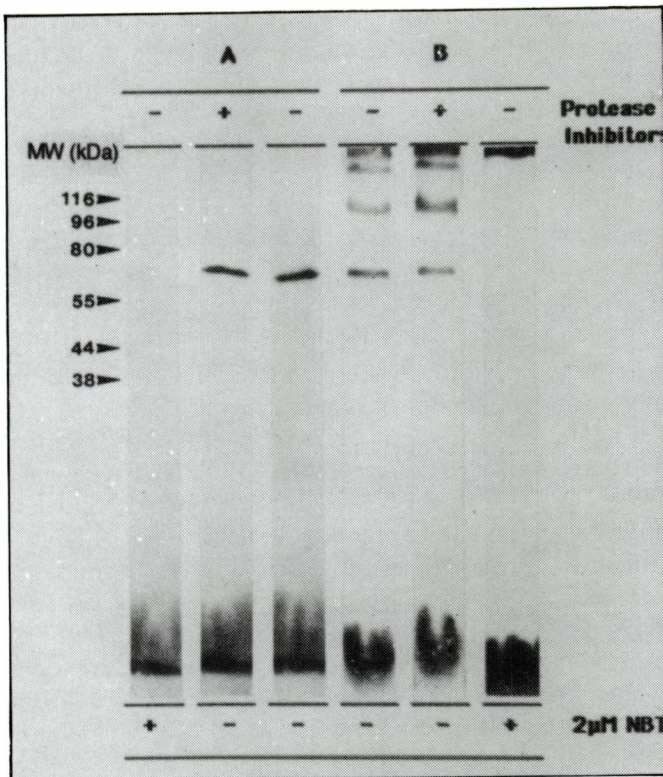


FIGURA 2. Electroforesi en SDS-PAGE del transportador nucleosídic fotomarcat amb [3 H]NBTI. Les membranes d'epiteli tapissat de ronyó de porc (0,7 mg proteïna/mL) es fotomarcaren amb [3 H]NBTI 5nM en presència o absència de NBTI 2mM amb o un cocktail d'inhibidors de proteases o sense. Les membranes se solubilitzaren amb tampó d'electroforesi durant 1 minut a 100 °C (A) o bé 1 hora a 37 °C (B). Extret de Ciruela *et al.*, 1994, amb permís.

reconeixen la macromolècula de procedència humana, de porc, de conill i de rata (Kwong *et al.*, 1992). Els estudis de digestió amb tripsina i endoglicosidasa F s'han emprat com a prova per analitzar les diferències moleculars que presenta la macromolècula de diferents espècies (home, porc, cobai i rata) i de diferents teixits (eritròcit, fetge i pulmó). Dels resultats aportats per Kwong *et al.*, 1993 es pot extrapolar que les diferències més grans de pes molecular es deuen a diferents graus de glicosilació, sempre dins d'una elevada analogia estructural interespecie i interteixit. Donat el comportament anàleg dels transportadors de glucosa i de nucleòsids pel que fa a la mobilitat electroforètica i al desenvolupament cromatogràfic es pot especular que ambdues macromolècules tenen una estructura similar. Els dos transportadors equilibratius de glucosa clonats, d'hepatoma humà (Mueckler *et al.*, 1985) i de cervell de rata (Birnbbaum *et al.*, 1986), presenten un perfil d'hidrofobicitat consistent en una disposició de dotze dominis transmembrana. Això permet pensar que el transportador equilibratiu de nucleòsids pertany a la família de transportadors que tenen dotze dominis transmembrana.

Regulació del transport nucleosídic equilibratiu

Actualment, es coneixen alguns dels mecanismes de regulació del transportador equilibratiu que, de nou, són molt similars als presentats pel transportador de sucres (Baldwin, 1993; Gould i Holman, 1993). Els mecanismes de regulació a curt termini es basen en la regulació pel mateix substrat, per l'ATP i per mecanismes de fosforilació-defosforilació del transportador. Els mecanismes de regulació a mig i llarg termini són conseqüència de variacions de la velocitat de síntesi proteica, d'una recirculació entre

els transportadors dels reservoris intracel·lulars i de la membrana plasmàtica i/o de possibles modificacions de la molècula del transportador.

Ciruela *et al.*, (1994) han solubilitzat i fotomarcats amb [³H]NBTI el transportador *es* de vesícules d'epiteli tapissat de ronyó, i han posat de manifest que la macromolècula pot presentar diferents graus d'agregació. Com es mostra en la figura 2, a més de la banda de 65 kD que correspon al monòmer del transportador, hi ha dues bandes de 110 i 230 kD que poden correspondre, respectivament, a dímers i tetràmers de la mateixa molècula. La funcionalitat dels agregats del transportador s'ha pogut demostrar emprant com a substrat L-adenosina, que és un isòmer no natural i no metabolitzable. El transportador *es* de cèl·lula cromafínica presenta una cinètica sigmoidal amb L-adenosina amb cooperativitat positiva i un coeficient de Hill de 4,9 (Casillas *et al.*, 1993a). Basant-se en aquests resultats, Casillas *et al.* (1993) han proposat un model mnemònic que suggereix que a baixes concentracions de nucleòsid (qualsevol isòmer: D- o L-) el transportador no és funcional mentre que es torna més actiu com més gran és la concentració del nucleòsid.

La fosforilació del transportador *es* induïx una disminució de la capacitat de transport (V_{\max}) sense variació apreciable en l'afinitat pel substrat. La regulació per fosforilació-defosforilació ha estat descrita en cèl·lules cromafíns (Sen *et al.*, 1990; Miras-Portugal *et al.*, 1991) en cèl·lules S49 (Nagy *et al.*, 1991) i en cèl·lules LLC-PK₁ (Sayós *et al.*, 1994). En cèl·lules cromafíniques, que són un bon model de cèl·lula neuronal, els activadors de l'adenilat ciclase (:forscolina) o els activadors de la proteïna quinasa A, i els anàlegs de l'AMPc donen lloc a una inhibició del transport així com a una disminució dels llocs d'unió de NBTI. La inactivació del transportador seria conseqüència de llur

fosforilació amb una disminució de la $V_{m\grave{a}x}$ del transport (sense modificació de la K_m) i una disminució de la unió màxima pel [3 H]NBTI (Sen *et al.*, 1990). La proteïna quinasa A també és la responsable de la regulació del transport d'adenosina que es produeix en cèl·lules LLC-PK₁ que deriven d'epiteli renal de porc. En aquestes cèl·lules el transport equilibratiu és pràcticament l'únic present i és molt actiu en cèl·lules no confluents. Quan les cèl·lules creixen fins a confluència, el transport, així com els centres d'unió de NBTI, desapareixen (Taula II). Aquesta «aparent» desaparició de molècules de transportador es reproduïx quan les cèl·lules s'incuben amb clorofenil-AMPc (Figura 3). Els resultats són indicatius del fet que el transportador de la cèl·lula confluent s'ha inactivat per fosforilació mitjançant la proteïna quinasa dependent d'AMPc (Sayós *et al.*, 1994).

La diferenciació cel·lular també implica una regulació del transport de nucleòsids a conseqüència d'una expressió diferencial de les macromolècules que hi participen. Jones *et al.* (1994) han demostrat que les cèl·lules

no diferenciades de neuroblastoma humanes acumulen formicina mitjançant el transportador sensible a NBTI. Quan s'indueix la diferenciació, aquestes cèl·lules mostren un increment en la incorporació de formicina que és degut a un augment d'expressió funcional de formes *ei*, és a dir, resistents a la inhibició per NBTI.

La cèl·lula cromafínica és un bon model per a estudiar si els factors que afecten els fenòmens d'exocitosi afecten també el transport de nucleòsids. Els secretagogs (carbacol, acetilcolina, nicotina, etc.) inhibeixen la incorporació d'adenosina a la cèl·lula de manera semblant a com ho fan els esters de forbol. Basant-se en aquests resultats, Delicado *et al.* (1991) han proposat una regulació del transportador per la proteïna quinasa C. La necessitat de regulació conjunta de l'exocitosi i el transport d'adenosina pot ésser deguda a la necessitat de tornar a incorporar l'adenosina extracel·lular que resulta de la hidròlisi de l'ATP lliurat per exocitosi.

En cèl·lules S49 s'ha correlacionat l'estat de fosforilació del transportador amb llur

TAULA II. Uptake de [3 H]adenosina i unió de [3 H]NBTI al llarg del creixement de les cèl·lules LLC-PK₁.

	DIES TRANSCORREGUTS DESPRÉS D'UN PLAGATGE				
	4	6	7	10	13
UPTAKE DE [3 H]ADENOSINA SENSIBLE A NBTI. (pmol/mg proteïna)	0,31±0,04	0,35±0,05	0,21±0,02**	0,16±0,02**	0,04±0,01**
UNIÓ DE [3 H]NBTI: K_d (nM)	0,7±0,3	0,6±0,1	0,8±0,2	> 15	> 15
$B_{m\grave{a}x}$ (pmol/mg proteïna)	0,36±0,09	0,22±0,02	0,22±0,06**	< 0,2 [#]	< 0,2 [#]

*p < 0,05 **p < 0,005 respecte als controls de 4 dies.

[#] La unió específica del [3 H]NBTI 1nM és inferior l'1 % del control.

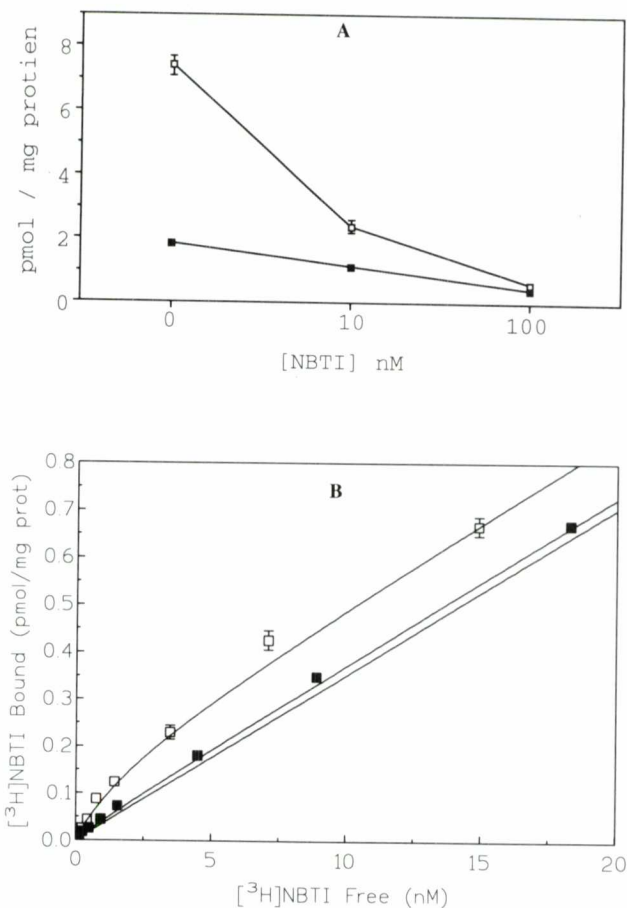


FIGURA 3. Efecte del clorofenil-(AMPc) sobre l'uptake de $[^3\text{H}]$ adenosina (A) i sobre la unió de $[^3\text{H}]$ NBTI (B) en cèl·lules LLC-PK₁. Cèl·lules subconfluentes (3-4 dies després del placatge) s'incubaren amb clorofenil-AMPc 100mM en absència de Na⁺ (■). En aquestes condicions, es va mesurar l'uptake de $[^3\text{H}]$ adenosina 0,25mM en presència i en absència de NBTI (A) així com la unió de $[^3\text{H}]$ NBTI (B). En ambdós casos s'efectuaren controls en absència de clorofenil-(AMPc) (□). Extret de Sayós *et al.*, 1994, amb permís.

sensibilitat davant la inhibició del transport per etanol. Això s'ha demostrat treballant amb cèl·lules S49 mutants que no tenen proteïna quinasa dependent d'AMPc o que no produeixen increments d'AMPc en resposta a l'activació d'un receptor acoblat positivament a l'adenilat ciclase. Aquestes cèl·lules han estat la clau per comprovar que és necessària la fosforilació d'un component del transportador de nucleòsids mitjançant la proteïna quinasa A per tal que la inhibició

del transport per etanol tingui lloc (Nagy *et al.*, 1991).

Un altre mecanisme de regulació a curt termini és exercit per l'ATP. El grup de Miras-Portugal (Casillas *et al.*, 1993b; Delicado *et al.*, 1994) ha demostrat que la presència d'ATP, o anàlegs no metabolitzables, origina un augment del nombre de centres d'unió de NBTI i incrementa la $V_{\text{màx}}$ del transport d'uridina en cèl·lules cromafíniques. Aquest fet suggereix un paper mo-

dulador de l'ATP en el transport de nucleòsids que no és degut als productes d'hidròlisi del nucleòtid sinó a l'existència d'un centre d'unió d'ATP a la mateixa molècula del transportador. Tots els mecanismes de regulació trobats pel transportador de nucleòsids són similars als descrits pel transportador de glucosa que presenta sensibilitat a les proteïnes quinases A i C (Witters *et al.*, 1985; James *et al.*, 1989) i un centre d'unió d'ATP (Hebert i Carruthers, 1986; Carruthers, 1990).

El transportador de nucleòsids sembla que té una regulació a mig termini que consisteix en la recirculació entre el reservori intracel·lular i el reservori de la membrana plasmàtica. Per analogia a d'altres transportadors, se suposa que el *pool* intracel·lular oscil·la entre el 20 % i el 50 % del nombre total de transportadors (Liang i Johnstone, 1992). L'únic estudi de *down-regulation* ha estat portat a terme amb cèl·lules cromafíniques on l'NBTI «cross-linkat» a la membrana plasmàtica produeix la desaparició transitòria de la molècula del transportador.

El transport de nucleòsids té mecanismes de regulació a llarg termini. Així, el factor de creixement neuronal, després de vint-i-quatre hores d'actuació, fa augmentar la capacitat del transport de nucleòsids (Torres *et al.*, 1987) mentre que l'hormona tiroide T_3 indueix la síntesi proteica del transportador que dona lloc a un increment de transportadors funcionals a la superfície de la cèl·lula (Torres *et al.*, 1987; Fideu i Miras-Portugal, 1992). Contràriament, els glucocorticoides, els esteroides sexuals i l'àcid retinoic tenen un efecte inhibidor del transport de nucleòsids en timòcits de rata (Gagne *et al.*, 1980) i en cèl·lules cromafíniques (Fideu i Miras-Portugal, 1993). Ja que el nombre de centres d'unió a NBTI no es veu afectat pels esteroides, sembla que la regulació del transportador per aquestes hormones no és deguda a una disminució de la

síntesi de proteïna o a un increment de la velocitat de la degradació de la macromolècula (Fideu i Miras-Portugal, 1993).

TRANSPORT CONCENTRATIU DE NUCLEÒSIDS

El transport actiu és un procés unidireccional i concentratiu. És també saturable per substrat i implica una despesa energètica per a la cèl·lula. Igual que el transport passiu aquest procés requereix una macromolècula proteica específica. Els sistemes de transport concentratiu per a nucleòsids són actius secundaris atès que no es gasta ATP de forma directa. Aquests sistemes són absolutament dependents d'un gradient de Na^+ de manera que és el gradient el que dona l'energia necessària perquè el nucleòsid entri, contra gradient, dins la cèl·lula. Si se suprimeix el Na^+ el transportador no actua i aquesta és la base per a l'estudi i la diferenciació entre els sistemes de transport equilibratius i concentratius. Una altra característica dels transportadors concentratius és que són insensibles als inhibidors tipus NBTI, dilazep, dipiridamol, etc.

L'especificitat dels transportadors concentratius per a diferents nucleòsids ha permès diferenciar tres tipus de transport actiu: el primer grup presenta una major selectivitat per a nucleòsids de purina i uridina (*cif* o N1; Belt *et al.*, 1992), el segon grup és més selectiu per a nucleòsids de pirimidina i adenosina (*cit* o N2; Crawford i Belt, 1991) i el tercer grup és més inespecífic i pot transportar tant purines com pirimidines (*cib* o N3; Huang *et al.*, 1993). En general, l'afinitat d'aquests transportadors pels diferents substrats és superior a la que presenten els transportadors equilibratius. Com a exemple el transportador *cif* té una K_m per l'adenosina que oscil·la entre 1 i 10 μM .

Es coneix la presència de transportadors

de nucleòsids Na^+ -dependents en diferents tipus cel·lulars i en diferents teixits com ara l'epiteli de jejú (Roden *et al.*, 1988), els enteròcits aïllats de budell prim (Vijayalakshmi i Belt, 1988), l'epiteli de plexe coroide (Spector i Hunton, 1984), el fetge (Ungemach i Hegner, 1978; Ruizmontasell *et al.*, 1992), els esplenòcits (Plagemann i Woffendin, 1989) i els macròfags (Plagemann i Aran, 1990). Hi ha diferents tipus cel·lulars, IEC-6 d'epiteli intestinal de rata, L1210 derivada d'una leucèmia de ratolí i HL-60 derivada d'una leucèmia humana, que també presenten transport actiu de nucleòsids (Jakobs i Paterson, 1986; Dagnino *et al.*, 1991; Belt *et al.*, 1992). Les vesícules d'epiteli tapissat de ronyó i d'intestí (Franco *et al.*, 1990; Williams i Jarvis, 1991; Le Hir i Dubach, 1985) són un bon model d'estudi del transportador concentratiu. Quan s'equilibren les vesícules sense Na^+ i s'incuben amb adenosina en un medi amb Na^+ es produeix el típic *overshoot* que es caracteritza per l'entrada ràpida del nucleòsid que s'acumula, de manera momentània, a una concentració intravesicular que supera a la del medi.

Mitjançant tècniques de biologia molecular, Pajor i Wright (1992) varen clonar un transportador *cib* anomenat SNST1 amb l'ajuda d'una genoteca de ronyó de conill i emprant com a sonda un fragment del transportador de glucosa dependent de Na^+ (SGLT1). SNST1, que té 672 aminoàcids, i que s'expressa únicament en el ronyó i el cor, presenta un 61 % d'identitat i un 80 % d'homologia amb SGLT1. La predicció de l'estructura secundària del transportador suggereix l'existència de dotze fragments transmembrana.

Recentment Huang *et al.* (1994), emprant una biblioteca de cDNA de teixit epitelial de jejú de rata, han aïllat un cDNA que codifica per a un transportador de nucleòsids Na^+ -dependent diferent de l'SNST1 i que s'anomena cNT1. De llur seqüència, se'n pot de-

duir que la proteïna que codifica té 648 aminoàcids i molt probablement es disposaria creuant catorze vegades la membrana. No hi ha similitud entre aquesta proteïna i qualsevol altra de les clonades fins al moment en mamífers. Tanmateix, l'anàlisi d'homologia de seqüència indica una similitud amb la proteïna NUPC que és la responsable del simport protó/nucleòsid en *Escherichia coli*. Funcionalment, la proteïna cNT1 presenta unes característiques similars a la de tipus *cit* (capacitat per a transportar indistintament nucleòsids de purina i de pirimidina) essent el 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT) un bon substrat amb $K_m = 0,49$ mM. Aquesta és la primera evidència que l'AZT entra dins la cèl·lula mitjançant un transportador si bé també es parla que existeix difusió simple per a aquest reactiu tan emprat per combatre la simptomatologia associada a la SIDA. El producte de cNT1 sols s'expressa en l'aparell digestiu i en el ronyó que és un del teixits amb més activitat transportadora de nucleòsids (Huang *et al.*, 1994).

Molt recentment Che *et al.* (1995) han clonat un cotransportador Na^+ -nucleòsid de fetge de rata que correspon al subtipus *cif* i s'anomena SPNT. La seqüència de nucleòtids prediu una proteïna de 659 aminoàcids amb catorze dominis transmembrana. A diferència de cNT1, el gen s'expressa en una gran varietat de teixits. Tanmateix, la similitud de seqüència entre ambdós gens indica que pertanyen a una mateixa família.

PAPER FUNCIONAL DEL TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS

En un model de cèl·lula epitelial d'intestí o de ronyó es poden trobar tots els tipus de transportadors de nucleòsids. En aquestes cèl·lules polaritzades els transportadors equilibratiu i concentratiu coexisteixen a la part luminal mentre que a les membranes

basolaterals el transportador més abundant és l'equilibratiu. Això dóna lloc a un transport transcel·lular de nucleòsids des del filtrat renal o des del bolus digestiu fins a la sang. Seguint amb aquest model cel·lular és senzill adonar-se que, a la part luminal, el transport és preferentment cap a l'interior de la cèl·lula mentre que a les membranes antiluminals el transport té lloc cap a l'espai intersticial. En el cas de l'adenosina hi ha llocs i moments en què l'adenosina extracel·lular prové de la degradació extracel·lular de nucleòtids, mentre que en altres casos l'adenosina pot ésser translocada des de l'interior de la cèl·lula mitjançant el transportador equilibratiu. De fet, la direcció del transport (incorporació o lliurament cel·lular) dependrà de les concentracions de nucleòsid que hi hagi a dintre i a fora de la cèl·lula. En situacions anormals, com és el cas de la

hipòxia, hi ha un allau d'adenosina que s'excreta a l'espai intersticial emprant el transportador equilibratiu.

L'existència de receptors específics d'adenosina a la membrana plasmàtica també fa rellevant el paper dels transportadors de nucleòsids per a facilitar la desaparició del nucleòsid del medi extracel·lular. El paper dels transportadors és clau per determinar a quina serà la concentració efectiva d'adenosina capaç d'interaccionar amb llur receptor. Aquesta participació indirecta en fenòmens de reconeixement molecular i transducció del senyal fa que sigui molt necessària la regulació del transport. Delicado *et al.* (1990) han demostrat en cèl·lules cromafíniques que la mateixa adenosina, en interaccionar amb llur receptor provoca una potenciació del transport equilibratiu per mecanismes de transducció

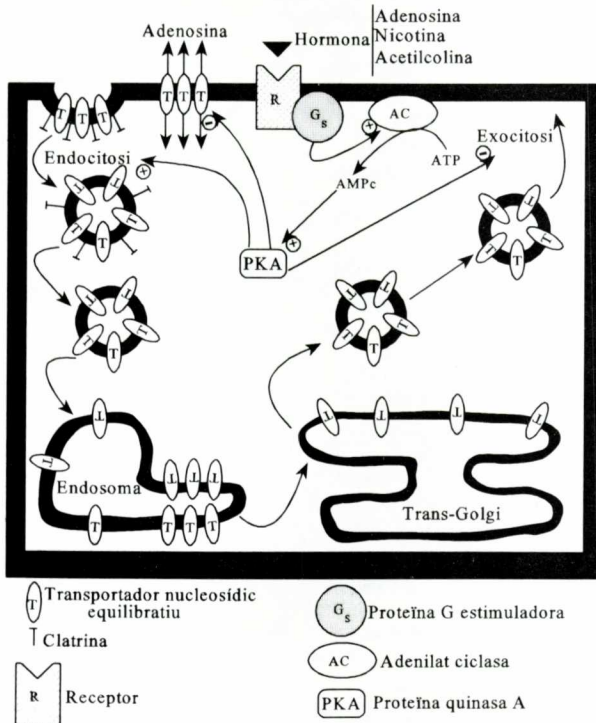


FIGURA 4. Model de regulació del transportador nucleosídic equilibratiu.

del senyal encara desconeguts (Delicado *et al.*, 1990). Això entraria en la lògica de provocar una reducció notable de la concentració una vegada el nucleòsid ha efectuat el seu paper d'autocoid. En la figura 4 es proposa un model de regulació conjunta del transportador i del receptor d'adenosina basat en els mecanismes de fosforilació mitjançant la proteïna quinasa A i els de *down-regulation* del transportador que se suposa que és similar al que té lloc en el transportador de sucres.

BIBLIOGRAFIA

- BALDWIN, S. A. (1993). «Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1154, pàg. 17-49.
- BARROS, L. F.; D. L. YUDILEVICH; S. M. JARVIS; N. BEAUMONT; J. D. YOUNG; S. A. BALDWIN (1995). «Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms». *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.*, núm. 429, pàg. 394-399.
- BELT, J. A.; M. J. SCHELL; J. MIRRO (1992). «Closing comments on studies on nucleoside transport in AML». *Leukemia*, núm. 16, pàg. 488-488.
- BELT, J. A.; A. D. WELCH (1983). «Transport of uridine and 6-azauridine in human lymphoblastoid cells: specificity for the uncharged 6-azauridine molecule». *Mol. Pharmacol.*, núm. 23, pàg. 153-158.
- BIRNBAUM, M. J.; H. C. HASPEL; O. M. ROSEN (1986). «Cloning and characterization of a cDNA-encoding the rat brain glucose transporter protein». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 83, pàg. 5784-5788.
- BOUMAH, C. E.; C. M. HARVEY; A. R. P. PATERSON; S. A. BALDWIN; J. D. YOUNG; C. E. CASS (1994). «Functional expression of the nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter of human choriocarcinoma (BeWo) cells in isolated oocytes of *Xenopus Laevis*». *Biochem. J.*, núm. 299, pàg. 769-773.
- CARRUTHERS, A. (1990). «Facilitated diffusion of glucose». *Physiol. Rev.*, núm. 70, pàg. 1135-1176.
- CASILLAS, T.; E. G. DELICADO; F. GARCIA-CARMONA; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1993a). «Kinetic and allosteric cooperativity in L-adenosine transport in chromaffin cells. A mnemonic transport». *Biochemistry*, núm. 32, pàg. 14203-14209.
- CASILLAS, T.; E. G. DELICADO; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1993b). «Adenosine-5'-triphosphate modulation of nitrobenzylthioinosine binding sites in plasma membranes of bovine chromaffin cells». *Neurosci. Lett.*, núm. 164, pàg. 51-54.
- CHE, M.; D. F. ORTIZ; I. M. ARIAS (1995). «Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na⁺-nucleoside cotransporter». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, pàg. 13596-13599.
- CHEN, S. F.; J. D. STOECKLER; R. E. JR. PARKS (1984). «Transport of deoxycoformycin in human erythrocytes, measurement by adenosine deaminase titration and radioisotope assays». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 33, pàg. 4069-4079.
- CIRUELA, F.; J. BLANCO; E. I. CANELA; C. LLUÍS; R. FRANCO; J. MALLOL (1994). «Solubilization and molecular characterization of the nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1191, pàg. 94-102.
- CRAWFORD, C. R.; J. A. BELT (1991). «Sodium-dependent, concentrative nucleoside transport in Walker 256 rat carcinosarcoma cells». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 175, pàg. 846-851.
- DAGNINO, L.; L. L. BENNETT; A. R. P. PATERSON (1991). «Sodium dependent nucleoside transport in mouse leukemia L1210 cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 6308-6311.
- DAHLIG-HARLEY, E.; A. R. P. PATERSON; M. J. ROBINS; C. E. CASS (1984). «Transport of uridine and 3-deazauridine in cultured human lymphoblastoid cells». *Cancer Res.*, núm. 44, pàg. 161-165.
- DECKER, J.; A. HENNEMANN; B. BEREZNAI; J. FRITZE; R. VOCK; P. J. MARANGOS; P. RIEDERER (1994). «[³H]nitrobenzylthioinosine binding sites at the human parietal cortex and erythrocyte adenosine transporter: A comparison». *Life Sci.*, núm. 55, pàg. 1675-1682.
- DELICADO, E. G.; T. CASILLAS; R. P. SEN; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1994). «Evidence that adenine nucleotides modulate nucleoside transporter function: characterization of uridine transport in chromaffin cells and plasma membrane vesicles». *Eur. J. Biochem.*, núm. 225, pàg. 355-362.
- DELICADO, E. G.; A. RODRIGUES; R. P. SEN; A. M. SEBASTIAO; J. A. RIBEIRO; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1990). «Effect of 5'-(N-Et)carboxamidoadenosine on adenosine transport in cultured chromaffin cells». *J. Neurochem.*, núm. 54, pàg. 1941-1946.
- DELICADO, E. G.; R. P. SEN; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1991). «Effects of forbol esters and secretagogues on nitrobenzylthioinosine binding to nucleoside transporters and nucleoside uptake in cultured chromaffin cell». *Biochem. J.*, núm. 279, pàg. 651-655.

- DOHERTY, A. J.; S. M. JARVIS (1993). «Na⁺-dependent and -independent uridine uptake in a established renal epithelial cell line, OK, from the opossum kidney». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1147, pàg. 214-222.
- FIDEU, M. D.; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1992). «Long term regulation of nucleoside transport by thyroid hormone (T3) in cultured chromaffin cells». *Neurochem. Res.*, núm. 17, pàg. 1099-1104.
- (1993). «Steroid-induced inhibition of adenosine transport in cultured chromaffin cells». *Cell. Mol. Neurobiol.*, núm. 13, pàg. 493-501.
- FRANCO, R.; J. J. CENTELLES; R. K. H. KINNE (1990). «Further characterization of adenosine transport in renal brush-border membranes». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1024, pàg. 241-248.
- GAGNE, D.; F. HOMO; D. DUVAL (1980). «Steroid-induced inhibition of nucleoside uptake in isolated mouse thymocytes». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 603, pàg. 27-35.
- GRIFFITH, D. A.; A. J. DOERTHY; S. M. JARVIS (1992). «Nucleoside transport in cultured LLC-PK₁ epithelia». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1106, pàg. 303-310.
- GOULD, G. W.; G. D. HOLMAN (1993). «The glucose transporter family: structure, function and tissue specific expression». *Biochem. J.*, núm. 295, pàg. 193-205.
- HEBERT, D. N.; A. CARRUTHERS (1986). «Direct evidence for ATP modulation of sugar transport in human erythrocyte ghosts». *J. Biol. Chem.*, núm. 261, pàg. 10093-10099.
- HUANG, Q. Q.; C. M. HARVEY; A. R. P. PATERSON; C. E. CASS; J. D. YOUNG (1993). «Functional expression of Na⁺ dependent nucleoside transport systems of intestine in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. Demonstration that rat jejunum expresses the purine selective system N1 (*cif*) and a second novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 20613-20619.
- HUANG, Q. Q.; S. Y. M. YAO; M. W. L. RITZEL; A. R. P. PATERSON; C. E. CASS; J. D. YOUNG (1994). «Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 17757-17760.
- JAKOBS, E. S.; A. R. P. PATERSON (1986). «Sodium dependent concentrative nucleoside transport in cultured intestinal epithelial cells». *Biochem. Biophys. Res. Com.*, núm. 140, pàg. 1028-1035.
- JAMES, D. E.; J. HIKEN; J. C. LAWRENCE (1989). «Isoproterenol stimulates phosphorylation of the insulin-regulable glucose transporter in rat adipocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 8368-8372.
- JARVIS, S. M.; B. W. MARTIN; A. S. NG (1983). «2-Chloroadenosine, a permeant for the nucleoside transporter». *Biochem. Pharmacol.*, núm. 34, pàg. 3237-3241.
- JARVIS, S. M.; J. D. YOUNG (1980). «Nucleoside transport in human and sheep erythrocytes; evidence that nitrobenzylthioinosine binds specifically to functional nucleoside transport sites». *Biochem. J.*, núm. 190, pàg. 377-383.
- (1981). «Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity». *Biochem. J.*, núm. 194, pàg. 331-339.
- JARVIS, S. M.; J. D. YOUNG; J. S. R. WU; J. A. BELT; A. R. P. PATERSON (1986). «Photoaffinity labeling of the human erythrocyte glucose transporter with 8-azidoadenosine». *J. Biol. Chem.*, núm. 261, pàg. 11077-11085.
- JONES, K. W.; R. J. RYLETT; J. R. HAMMOND (1994). «Effect of cellular differentiation on nucleoside transport in human neuroblastoma cells». *Brain Res.*, núm. 660, pàg. 104-112.
- KESSEL, D. (1978). «Transport of a nonphosphorylated nucleoside, 5'-deoxyadenosine, by murine leukemia L1210 cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 253, pàg. 400-403.
- KOLASSA, N.; K. PFLEGER; M. TRAM (1971). «Species differences in action and elimination of adenosine after dipyrindamole and hexobendine». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 13, pàg. 320-325.
- KWONG, F. Y. P.; S. A. BALDWIN; P. R. SCUDDER; S. M. JARVIS; M. Y. M. CHOY; J. D. YOUNG (1986). «Erythrocyte nucleoside and sugar transport; endo-β-galactosidase and endoglycosidase-F digestion of partially purified human and pig transporters proteins». *Biochem. J.*, núm. 240, pàg. 349-356.
- KWONG, F. Y. P.; A. DAVIS; C. M. TSE; J. D. YOUNG; P. J. E. HENDERSON; S. A. BALDWIN (1988). «Purification of the human erythrocyte nucleoside transporter by immunoaffinity chromatography». *Biochem. J.*, núm. 255, pàg. 243-249.
- KWONG, F. Y. P.; H. E. FINCHAM; A. DAVIES; N. BEAUMONT; P. J. F. HENDERSON; J. D. YOUNG; S. A. BALDWIN (1992). «Mammalian nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transport proteins». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 21954-21960.
- KWONG, F. Y. P.; J. S. R. WU; M. M. SHI; H. E. FINCHAM; A. DAVIES; P. J. E. HENDERSON; S. A. BALDWIN; J. D. YOUNG (1993). «Enzymic cleavage as a probe of the molecular structures of mammalian equilibrative nucleoside transporters». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 22127-22134.
- KOREN, R.; E. SHOHAMI; S. YEROSHALMI (1979). «A kinetic analysis of the uptake of cytosine b-D-araboside

- by rat B77 cells. Differentiation between transport and phosphorylation». *Eur. J. Biochem.*, núm. 95, pàg. 333-339. LE HIR, M.; U. C. DUBACH (1985). «Concentrative transport of purine nucleosides in brush border vesicles of the rat kidney». *Eur. J. Clin. Invest.*, núm. 15, pàg. 121-127.
- LIANG, L.; R. M. JOHNSTONE (1992). «Evidence for an internal pool of nucleoside transporters in mammalian reticulocytes». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1106, pàg. 189-196.
- LIENHARD, G. E.; J. H. GRABB; K. J. RANSOME (1984). «Endoglycosidase-F cleaves the oligosaccharides from the glucose transporter of the human erythrocytes». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 769, pàg. 404-410.
- LUM, C. Y.; R. MARZ; R. M. WOHLHUETER; P. G. W. PLAGEMANN (1979). «Adenosine transport and metabolism in mouse leukemia cells and canine thymocytes and peripheral blood leukocytes». *J. Cell Physiol.*, núm. 101, pàg. 173-200.
- MAHONY, W. B.; T. D. ZIMMERMAN (1984). «An assay for inhibitors of nucleoside transport based upon the use of 5-[¹²⁵I]jodo-2'-deoxyuridine as permeant». *Anal. Biochem.*, núm. 154, pàg. 235-243.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T.; E. G. DELICADO; T. CASILLAS; R. P. SEN (1991). «Control of nucleoside transport in neural cells effect of protein Kinase C activation». A: Harkness, R. A. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII. Part A*. Nova York: Plenum Press, pàg. 435-438.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T.; M. TORRES; P. ROTLLAN; D. AUNIS (1986). «Adenosine transport in bovine chromaffin cells in culture». *J. Biol. Chem.*, núm. 261, pàg. 1712-1719.
- MONKS, A.; V. E. MARQUEZ; D. T. MAO; R. L. CYSYK (1985). «Uptake of 2-beta-D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide (thiazofurin) and analogs by the facilitated transport mechanism of erythrocytes». *Cancer Lett.*, núm. 28, pàg. 1-8.
- MUECKLER, M.; C. CARUSO; S. A. BALDWIN; M. PANICO; I. BLENCH; H. R. MORRIS; W. J. ALLARD; G. E. LIENHARD; H. F. LODISH (1985). «Sequence and structure of a human glucose transporter». *Science*, núm. 229, pàg. 941-945.
- NAGY, L. E.; I. DIAMOND; A. S. GORDON (1991). «c-AMP-dependent protein Kinase regulates inhibition of adenosine transport by ethanol». *Mol. Pharmacol.*, núm. 40, pàg. 812-817.
- PAJOR, A. M.; E. M. WRIGHT (1992). «Cloning and functional expression of a mammalian Na-nucleoside cotransporter. A member of the Sglt family». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 3557-3560.
- PATERSON, A. R. P.; E. S. JAKOBS; E. R. HARLEY; C. E. CASS; M. J. ROBINS (1983). «Inhibitors of nucleoside transport as probes and drugs». A.: Cheng, Y. C.; Goz, B.; Minkoff, M. *The Development of Target-Oriented Anticancer Drugs*. New York: Raven Press, pàg. 41-56.
- PLAGEMANN, P. G. W.; J. M. ARAN (1990). «Na⁺ dependent active nucleoside transport in mouse spleen lymphocytes, leukemia cells, fibroblast and macrophages, but not in equivalent human or pig cells. Dipyridamole enhances nucleoside salvage by cells with both active and facilitated transport». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1025, pàg. 32-42.
- PLAGEMANN, P. G. W.; C. WOFFENDIN (1989). «Na⁺-dependent and Na⁺-independent transport of uridine and its phosphorylation in mouse spleen-cells». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 981, pàg. 315-325.
- PLAGEMANN, P. G. W.; R. M. WOHLHUETER (1980). «Permeation of nucleosides, nucleic acid bases, and nucleotides in animal cells». *Curr. Top. Membr. Transp.*, núm. 14, pàg. 225-330.
- (1983). A: Berne, R. M.; Randall, T. W.; Rubio, R. *Regulatory Function of Adenosine*. Boston: Martinus Nijhoff, pàg. 179-201.
- (1984). «Effect of sulfhydryl reagents on nucleoside transport in cultured mammalian cells». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 233, pàg. 489-500.
- PLAGEMANN, P. G. W.; R. M. WOHLHUETER; J. ERBE (1981). «Facilitated transport of inosine and uridine in cultured mammalian cells is independent of nucleoside phosphorylases». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 640, pàg. 448-462.
- RAMPAL, A. L.; E. K. Y. JUNG; J. J. CHIN; M. R. DEZIEL; H. B. PINKOSFSKY; C. Y. JUNG (1986). «Further characterization and chemical purity assessment of the human erythrocyte glucose transporter preparation». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 859, pàg. 135-142.
- RODEN, M.; K. TURNHEIM (1988). «Sodium pump quantity and turnover in rabbit descending colon at different rates of sodium absorption». *Plug. Archiv. Europ. J. Physiol.*, núm. 413, pàg. 181-189.
- RUZMONTASELL, B.; F. J. CASADO; A. FELIPE; M. PASTORANGLADA (1992). «Uridine transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat liver». *J. Mem. Biol.*, núm. 128, pàg. 227-233.
- SAYOS, J.; J. BLANCO; F. CIRUELA; E. I. CANELA; J. MALLOL; C. LLUÍS; R. FRANCO (1994). «Regulation of nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes». *Am. J. Physiol.*, núm. 257, pàg. F758-766.
- SEN, R. P.; E. G. DELICADO; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1990). «Effect of forskolin and cyclic AMP analog on adenosine transport in cultured chromaffin cells». *Neurochem. Int.*, núm. 17, pàg. 523-528.
- SPECTOR, R.; S. HUNTON (1984). «Specificity and sodium dependence of the active nucleoside transport system in choroid plexus». *J. Neurochem.*, núm. 42, pàg. 1048-1052.

- STOECKLER, J. D.; S. Y. LI (1987). «Influx of 5'-deoxy-5-methylthioadenosine into HL-60 human leukemia cells and erythrocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 9542-9546.
- TORRES, M.; M. F. BADER; D. AUNIS; M. T. MIRAS-PORTUGAL (1987). «Nerve growth factor effect on adenosine transport in cultured chromaffin cells». *J. Neurochem.*, núm. 48, pàg. 233-235.
- TSE, C. M.; J. S. R. WU; J. D. YOUNG (1985). «Evidence for the asymmetrical binding of para-chloromercuriphenyl sulfonate to the human erythrocyte nucleoside transporter». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 818, pàg. 316-324.
- UNGEMACH, F. R.; D. HEGNER (1978). «Uptake of thymidine into isolated rat hepatocytes. Evidence for two transport systems». *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, núm. 359, pàg. 845-856.
- VIJAYALAKASHMI, D.; J. A. BELT (1988). «Sodium-dependent nucleoside transporter in mouse intestinal epithelial cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 263, pàg. 9419-9423.
- WHEELER, T. J.; P. C. HINKLE (1985). «The glucose transporter of mammalian cells». *Ann. Rev. Physiol.*, núm. 47, pàg. 503-517.
- WILLIAMS, T. C.; S. M. JARVIS (1991). «Multiple sodium dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles». *Biochem. J.*, núm. 274, pàg. 27-33.
- WITTERS, L. A.; C. A. VATER; G. E. LIENHARD (1985). «Phosphorylation of the glucose transporter in vitro and in vivo by protein Kinase C». *Nature*, núm. 315, pàg. 777-778.
- WOHLHUETER, R. M.; P. G. W. PLAGEMANN (1982). «On the functional symmetry of nucleoside transport in mammalian cells». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 689, pàg. 249-260.
- YOUNG, J. D.; S. M. JARVIS (1983). «Nucleoside transport in animal cells». *Biosci. Rep.*, núm. 3, pàg. 309-322.