
OBJECTIUS

El transport de nucleòsids ha estat caracteritzat en molts tipus cel·lulars, incloent cèl·lules diferenciades i cèl·lules tumorals. Com ja s'ha referit en la Introducció, es coneixen dos grans grups de sistemes de transport: aquells que mitjancen la difusió facilitada del substrat a través del gradient de concentració (sistemes equilibratius o ENT) i aquells que ho fan de manera concentrativa mercès al gradient extracel·lular de sodi (sistemes concentratius o CNT). La caracterització dels diferents sistemes de transport presents en cèl·lules del sistema immunitari és d'enorme utilitat si tenim en compte que aquests tipus cel·lulars són dependents de les vies de recuperació de nucleòsids i que poden activar-se o proliferar en funció dels seus requeriments funcionals. Resultats obtinguts en el nostre grup de recerca han demostrat que tant macròfags murins com línies cel·lulars derivades de limfòcits B presenten transportadors equilibratius i concentratius i que els seus nivells d'expressió són regulables per estímuls proliferatius i diferenciadors (Soler et al., 1998; 2001a; 2001b).

D'altra banda, els transportadors de nucleòsids són responsables de la captació dels anàlegs de nucleòsids utilitzats en quimioteràpia, pel que les isoformes expressades o els nivells d'expressió d'aquestes poden tenir una importància clínica. De fet, en el moment d'inici d'aquest treball, diversos estudis havien demostrat una relació entre la resistència clínica a citarabina i el transportador hENT1 en leucèmia mieloblàstica i limfoblàstica aguda (Wiley et al., 1982; Gati et al., 1997).

OBJECTIUS

En base als antecedents existents ens vam plantejar com a objectiu principal del present estudi:

Analitzar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a fàrmacs antineoplàsics derivats de nucleòsids, especialment en el tractament de malalties limfoproliferatives.

Per tal d'assolir l'objectiu principal ens vam plantejar els següents objectius concrets:

1. Caracteritzar els transportadors de nucleòsids presents en cèl·lules del sistema immunitari, especialment limfòcits T i B.
2. Analitzar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids en malalties limfoproliferatives.
3. Determinar el paper del transportador hENT1 en la resposta transcriptòmica produïda pel tractament amb fluoropirimidines.
4. Estudiar la regulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids mitjançant el tractament amb anàlegs de nucleòsids.

PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

El plantejament experimental que s'ha seguit per tal d'assolir els objectius esmentats ha suposat la utilització tant de línies cel·lulars com de cultius primaris de cèl·lules mononucleades i cèl·lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica. Alhora ha comportat la utilització de tècniques per a la mesura de l'expressió de proteïna, d'ARNm i de captació de nucleòsids, així com anàlisis transcriptòmics mitjançant microarrays d'ADN.

1. Caracteritzar els transportadors de nucleòsids presents en cèl·lules del sistema immunitari, especialment limfòcits T i B.

Donat que no existien estudis que avaluessin alhora l'expressió de tots els transportadors de nucleòsids en cèl·lules del sistema immunitari ens vam plantejar analitzar els nivells d'expressió de les diferents isoformes en línies cel·lulars derivades de limfòcits T i B, així com en cèl·lules mononucleades i limfòcits T CD4 de donants sans. Per a la caracterització de l'expressió gènica es va posar a punt la PCR a temps real per a les cinc isoformes de transportadors de nucleòsids clonades en el moment d'inici d'aquest treball.

2. Analitzar el paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids en malalties limfoproliferatives.

La primera part de l'estudi va suposar la caracterització cinètica dels transportadors presents en la línia cel·lular derivada de leucèmia pro-limfocítica JVM-2, així com dels transportadors responsables de la captació de l'anàleg de nucleòsid fludarabina. Posteriorment, l'estudi es va estendre a la determinació dels nivells d'ARNm, proteïna i activitat dels transportadors de nucleòsids presents en cèl·lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica. Paral·lelament, es va mesurar la seva sensibilitat a la fludarabina amb l'objectiu de determinar si existia algun tipus de correlació entre el transport i la citotoxicitat. Per complementar els resultats obtinguts, es va realitzar un estudi equivalent amb línies cel·lulars derivades de limfoma de mantell, per tal de comprovar el paper diferencial dels transportadors equilibratius en la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids en funció del tipus de malaltia i del fàrmac administrat.

3. Determinar el paper del transportador hENT1 en la resposta transcriptòmica produïda pel tractament amb fluoropirimidines.

Atenent al paper que, en general, juguen els transportadors equilibratius en la sensibilitat als fàrmacs derivats de nucleòsids ens vam plantejar avaluar el paper del transportador hENT1 en la resposta transcripcional associada a la teràpia amb fluoropirimidines, mitjançant la utilització de microarrays d'ADN. Com a model es va utilitzar la línia cel·lular derivada de tumor de mama MCF7, pel que inicialment es va realitzar una caracterització dels transportadors de nucleòsids presents en la línia, així com de les isoformes responsables de la captació de l'anàleg de nucleòsid 5'-desoxi-5-fluorouridina. L'avaluació del paper d'hENT1 es va realitzar mitjançant la inhibició

farmacològica de la seva activitat amb la NBTI. Els canvis d'expressió gènica obtinguts a través dels experiments de microarrays d'ADN es van validar utilitzant altres tècniques quantitatives o semi-quantitatives.

4. Estudiar la regulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids mitjançant el tractament amb anàlegs de nucleòsids.

Es va voler comprovar la susceptibilitat dels transportadors de nucleòsids de ser regulats mitjançant l'acció de fàrmacs antineoplàsics derivats de nucleòsids. Com a model es va escollir la línia cel.lular, prèviament caracteritzada, MCF7 tractada amb dos fàrmacs amb mecanismes d'acció diferents, la 5'-desoxi-5-fluorouridina i la gemcitabina. Es van avaluar els canvis en els nivells d'ARNm, de proteïna i d'activitat com a conseqüència del tractament.

