

---

***DISCUSSIÓ GENERAL***



Les cèl·lules del sistema immunitari són altament dependents de les vies de recuperació de nucleòsids i, en general, co-expressen transportadors equilibratius i concentratius. Així, les línies cel·lulars derivades de limfòcit B Raji i BLS-1 presenten, en termes d'activitat, un sistema equilibratiu sensible a NBTI (hENT1) i dos sistemes de transport concentratius i sodi-dependents, N1 (hCNT2) i N5 (Soler et al., 1998). Similarment, els macròfags murins de medulla òssia expressen els sistemes equilibratius ENT1 i ENT2 i els concentratius CNT1 i CNT2 (Soler et al., 2001a). Donat que en el moment d'inici d'aquest treball la majoria d'estudis de determinació dels transportadors de nucleòsids presents en cèl·lules del sistema immunitari eren anteriors a la clonació de les entitats moleculars o es basaven únicament en mesures d'activitat, es va analitzar l'expressió dels transportadors de nucleòsids equilibratius (hENT1 i hENT2) i concentratius (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) mitjançant PCR a temps real en cèl·lules del sistema immunitari, essencialment limfòcits B i T. D'aquesta manera, es va observar que tant les cèl·lules mononucleades com la majoria de línies cel·lulars analitzades expressaven les isoformes equilibratives hENT1 i hENT2 i les concentratives hCNT2 i hCNT3, mentre en cap cas es detectava l'expressió de hCNT1. No obstant, la majoria de línies cel·lulars perdien l'expressió de hCNT3, si bé totes presentaven el transportador preferent per purines hCNT2, el que suggeriria un paper important d'aquesta isoforma en aquests tipus cel·lulars.

La utilització de diversos models cel·lulars, cultius primaris i línies cel·lulars establertes, va demostrar nivells d'expressió diferents, associats probablement a l'estat de diferenciació cel·lular, especialment en el cas de les isoformes concentratives. Diverses evidències estableixen que els tipus cel·lulars més diferenciats presenten una major expressió dels sistemes dependents de sodi (del Santo et al., 1998; Fernandez-Veledo et al., 2004). En concordança, la diferenciació de les cèl·lules U937 produïa un augment dels transportadors concentratius, associat a una disminució d'hENT1, mentre que l'activació de la proliferació en limfòcits T CD4 provocava una resposta oposada, amb un clar increment de l'expressió d'hENT1, fet que reafirmaria el paper diferencial dels transportadors de nucleòsids equilibratius i concentratius davant estímuls proliferatius i diferenciadors (Lee et al., 1994; Soler et al., 1998; 2001a). En situacions de proliferació activa, on la cèl·lula presenta una demanda elevada de nucleòsids i nucleòtids per a la síntesi de l'ADN, l'expressió dels transportadors equilibratius de nucleòsids permet la captació dels seus substrats sense despesa energètica ja que, un cop a l'interior cel·lular, els nucleòsids són ràpidament fosforilats creant-se un gradient de concentració molt favorable per a la captació (Cass et al., 1979; Soler et al., 2001a; Aymerich et al., 2004). D'altra banda, l'increment dels transportadors concentratius en situacions de diferenciació estaria associat a una major regulació d'aquests transportadors, tot i que en molts casos es desconex el sentit fisiològic que pot tenir aquesta regulació (Aymerich et al., 2005). Així, per exemple, s'ha comprovat una relació entre el transportador CNT2 i el receptor d'adenosina A1 a través dels canals de  $K^+$  dependents d'ATP, sensors dels nivells intracel·lulars d'ATP/ADP (Duflo et al., 2004). Aquests resultats apuntarien cap a una regulació específica de la captació d'adenosina per part del transportador CNT2 en funció del nivell energètic cel·lular.

La comparació dels nivells d'ARNm dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules mononucleades i limfòcits T CD4 va evidenciar que els tipus cel·lulars que componen la població de cèl·lules mononucleades no presentaven una dotació de transportadors equivalent. A més, els resultats obtinguts van demostrar que existeix una elevada variabilitat en els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids entre individus sans. Variabilitat que havia estat determinada en cèl·lules tumorals (Mackey et al., 2002; Farre et al., 2004), però no en cèl·lules d'individus sans. Addicionalment, en el moment d'inici d'aquest treball, els nivells d'expressió d'hENT1 en cèl·lules de malalts de leucèmies limfoblàstica i mieloblàstica agudes s'havien correlacionat amb la sensibilitat a citarabina (Wiley et al., 1982; Gati et al., 1997), tanmateix aquests estudis no havien avaluat els altres transportadors de nucleòsids.

L'anàlisi dels nivells d'ARNm dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules de pacients de leucèmia limfàtica crònica (LLC) va confirmar que existia una gran variabilitat entre individus, especialment en les isoformes concentratives. En concordança amb les línies cel·lulars de limfòcits B, en tots es casos es mantenia l'expressió de hCNT2 mentre que alguns perdien l'expressió de la isoforma hCNT3. Tanmateix, mentre la línia cel·lular derivada de leucèmia pro-limfocítica JVM-2 presentava activitat de les dues isoformes concentratives, només la meitat dels pacients analitzats mostraven transport dependent de sodi. Addicionalment, el fet que la captació de fludarabina fos únicament mitjançada pels transportadors equilibratius suggeria que les cèl·lules de LLC no presentaven activitat de transport de hCNT3. En concordança, l'anàlisi de la localització de hCNT3 en cèl·lules de LLC ha demostrat que aquest és intracel·lular (Mackey et al., 2005).

La comparació de les dades obtingudes en pacients de LLC va demostrar que no hi havia cap relació entre els nivells d'ARNm de les diferents entitats moleculars i la sensibilitat a fludarabina. Similarment, aquests tampoc guardaven cap correlació amb la quantitat de proteïna ni amb la captació de nucleòsids, el que suggeriria que en aquestes cèl·lules podria haver-hi diferències en l'estabilitat de l'ARNm o en la taxa de traducció, si bé en altres models s'ha postulat una manca de relació entre els nivells d'ARNm i de proteïna (Felipe et al., 1998; Aguayo et al., 2005). D'altra banda, existia una clara correlació entre la sensibilitat *ex vivo* a fludarabina i el transport de fludarabina. El fet que l'acumulació de fàrmac mesurada als 10 segons es correlacionés amb la citotoxicitat a les 48 hores demostra que són els processos mitjançats per transportadors els que determinen la resposta al fàrmac. Malgrat que la fludarabina pot ser captada per hENT1 i per hENT2, la sensibilitat a aquest anàleg de nucleòsid únicament correlacionava amb els nivells de proteïna de la isoforma hENT2. Això podria ser degut, en part, a la baixa expressió del transportador hENT1 en les cèl·lules de LLC (Wiley et al., 1989; Chow et al., 2005) o a la major afinitat de la fludarabina per hENT2, tal com es va demostrar en els estudis d'inhibició. Tanmateix, tenint en compte que les cèl·lules de LLC també transporten fludarabina a través d'hENT1, no es pot descartar una direccionalitat dels nucleòsids en funció del transportador responsable de la seva captació, tal i com es suggereix en estudis realitzats en macròfags (Soler et al., 2001a). Les cèl·lules de LLC es caracteritzen per una població majoritària en fase G<sub>0</sub> del cicle cel·lular, pel que la fludarabina actua principalment inhibint la síntesi de l'ARN o la reparació de l'ADN enlloc d'actuar sobre la replicació (Huang et al., 2000). Aquesta observació dona suport a la idea que els nucleòsids

transportats mitjançant hENT1 actuarien preferencialment sobre la proliferació, mentre que hENT2 podria aportar nucleòsids a l'ARN o fins i tot a la reparació de l'ADN. De fet, els resultats obtinguts descriuen per primera vegada una correlació entre la proteïna hENT2 i la sensibilitat a anàlegs de nucleòsids (Wiley et al., 1982; Galmarini et al., 2002c).

Per tal de corroborar la hipòtesi plantejada es van analitzar els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids equilibratius en línies cel·lulars de limfoma de mantell (LCM), malaltia limfoproliferativa que es caracteritza per una elevada taxa de proliferació, conseqüència d'una sobre-expressió de la ciclina D1 (Campo et al., 2003). L'anàlisi va demostrar uns nivells significativament superiors d'hENT1 en les cèl·lules de LCM respecte les de LLC i una relació oposada en la quantitat d'hENT2, tant en les línies cel·lulars com en les cèl·lules de pacients, avaluades dins el marc de la tesi doctoral de Sílvia Marcé en el servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic. Aquestes dades concorden amb el paper d'hENT1 en proliferació (Cass et al., 1979; Pressacco et al., 1995b) i amb la major expressió d'aquesta isoforma en tipus cel·lulars amb una elevada taxa de proliferació (del Santo et al., 1998; Chow et al., 2005). D'altra banda, el fet que, en comparació amb la LLC, les cèl·lules de LCM presentessin una menor expressió d'hENT2 i alhora una baixa resposta a la fludarabina (Ferrer et al., 2004), ens va dur a analitzar la sensibilitat a altres anàlegs de nucleòsids. La gemcitabina és un derivat de desoxicitidina que s'utilitza principalment en el tractament de tumors sòlids, tot i que també ha demostrat ser efectiu en el tractament de malalties limfoproliferatives (Nabhan et al., 2001). A més, a diferència de la fludarabina, la gemcitabina és molt més afí per al transportador hENT1 que per a hENT2 (Mackey et al., 1999). La determinació de la resposta citotòxica de les cèl·lules de LCM a la gemcitabina va demostrar que aquestes necessitaven dosis menors de gemcitabina que de fludarabina per aconseguir el mateix efecte. Addicionalment, el transport d'uridina i de gemcitabina, mitjançat majoritàriament per hENT1, correlacionava tant amb els nivells d'ARNm com de proteïna de la isoforma hENT1. Per contra, la captació de fludarabina no guardava cap relació amb els transportadors equilibratius.

L'anàlisi de les dades obtingudes va demostrar una clara correlació entre la sensibilitat a gemcitabina en les cèl·lules de LCM i els nivells d'ARNm i de proteïna d'hENT1 i sobretot amb el transport de gemcitabina mitjançat per hENT1. En canvi, la sensibilitat a fludarabina no guardava cap relació amb l'expressió dels transportadors equilibratius ni amb la seva activitat de transport. En concordança, l'anàlisi de les cèl·lules de pacients realitzat per Sílvia Marcé va donar resultats equivalents. En leucèmia limfoblàstica aguda s'havia demostrat que l'expressió d'hENT1 correlacionava amb la sensibilitat a citarabina però no a la de cladribina (Wright et al., 2002). De fet, la citarabina presenta un mecanisme d'acció similar a la gemcitabina, mentre que el de la cladribina s'aproxima més a la fludarabina (Galmarini et al., 2001b), el que suggeriria que hENT1 jugaria un paper important en la sensibilitat als dos derivats de desoxicitidina, mentre que en el cas dels anàlegs púrics el transportador podria ser hENT2. Diversos autors han demostrat una correlació entre la sensibilitat a la citarabina i a la gemcitabina i l'expressió del transportador hENT1 (Wiley et al., 1982; Galmarini et al., 2002c; Spratling et al., 2004), si bé només en un cas, en el que es van analitzar únicament quatre pacients de leucèmia limfoblàstica aguda, s'ha determinat una relació entre hENT1 i la resposta citotòxica a fludarabina i cladribina (Gati et al., 1997). Tanmateix, en la LCM no es va trobar cap

correlació entre la isoforma insensible a NBTI i la sensibilitat a fludarabina, possiblement degut a què les línies cel.lulars analitzades presentaven una activitat d'aquest transportador pràcticament nul.la. No obstant, no es pot descartar, tal com s'ha suggerit anteriorment, que el transportador implicat en la sensibilitat depengui del mecanisme d'acció del fàrmac i en el LCM els anàlegs de nucleòsids actuen preferentment inhibint la proliferació. Per tant, els resultats obtinguts semblen indicar que en l'estudi del paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat als fàrmacs no s'han de considerar únicament els nivells d'expressió dels transportadors en el tipus de càncer analitzat, sinó també l'anàleg de nucleòsid administrat i el seu mecanisme d'acció en aquell tumor.

Per tal d'aprofundir en aquesta hipòtesi ens vam plantejar analitzar el paper del transportador hENT1 en la resposta transcriptòmica associada al tractament amb la fluoropirimidina 5'-DFUR. El model escollit, la línia cel.lular MCF7, presentava únicament transport equilibratiu, amb una major activitat de la isoforma sensible a NBTI hENT1. De manera similar, la 5'-DFUR era captada pels dos transportadors equilibratius, essent més afí per hENT1. La inhibició farmacològica d'hENT1 disminuïa la sensibilitat a la 5'-DFUR, el que evidenciava la importància del transport mitjançat del fàrmac en la seva citotoxicitat. Anàlogament, la NBTI també protegeix de l'acció de la 5'-DFUR i de la gemcitabina en diverses línies cel.lulars (Mackey et al., 1998; 2002). Malgrat la dosi utilitzada en els experiments de microarrays corresponia aproximadament a la IC<sub>50</sub> quan hENT1 es trobava inhibit, l'addició de NBTI bloquejava total o parcialment la resposta transcripcional associada al tractament amb 5'-DFUR, així com altres efectes del fàrmac com la parada en fase S del cicle cel.lular, el que suggereix que hENT1 és necessari per l'acció citotòxica del 5'-DFUR en les cèl.lules MCF7.

Els estudis de microarrays d'ADN van permetre alhora determinar els canvis en l'expressió gènica com a conseqüència del tractament amb 5'-DFUR. Els resultats van demostrar que la 5'-DFUR activa p53, així com gens dependents d'aquesta proteïna amb funcions diverses en el cicle cel.lular, l'apoptosi o el metabolisme de xenobiòtics, entre d'altres. Aquestes dades concorden amb estudis previs d'anàlisi transcriptòmic on el fàrmac utilitzat havia estat el 5-FU (Troester et al., 2004; Kho et al., 2004), el que demostra que els canvis en l'expressió gènica produïts per la 5'-DFUR són similars als provocats pel 5-FU. Tanmateix, en els treballs en línies cel.lulars generalment es realitzen exposicions llargues al fàrmac que indueixen l'expressió de centenars de gens, mentre que en el nostre model el tractament de 90 minuts regulava únicament 68 gens. En concordança, estudis realitzats *in vivo* han demostrat la regulació d'un baix nombre de gens (Troester et al., 2004; Rosenwald et al., 2004). En base a aquests treballs i tenint en compte la farmacocinètica del fàrmac (Reigner et al., 2003) podem afirmar que el protocol de tractament amb temps curts s'aproxima més al que s'utilitza *in vivo* i és suficient per activar p53, així com gens dependents d'aquesta proteïna.

Entre els gens obtinguts en els experiments de microarrays, n'hi ha dos que no havien estat descrits prèviament com a dianes del 5-FU, pel que requereixen major atenció. L'aquaporina 3 és un canal d'aigua regulable per p73 (Zheng and Chen, 2001). Malgrat no es coneix la seva relació amb el 5-FU, podria estar implicat en l'increment de volum de les cèl.lules com a conseqüència del tractament amb 5'-DFUR i 5-FU. Tot i que existeixen

pocs estudis sobre el paper de l'AQP3 en el càncer, diversos autors han analitzat la relació entre altres tipus d'aquaporina i el desenvolupament del càncer (revisat a Moon et al., 2003), pel que sembla raonable considerar l'AQP3 com un gen candidat per a un estudi amb més profunditat del seu paper en la sensibilitat a 5'-DFUR. D'altra banda, l'acció de la 5'-DFUR produeix la disminució de l'expressió de dues proteïnes ribosomals (RPL3 i RPL10A). La disminució de l'expressió de proteïnes ribosomals com a conseqüència de l'acció de la 5'-DFUR suggereix que part de l'efecte citotòxic del fàrmac aniria a través de la incorporació de les diferents formes fluorades a l'ARN. A més, tant els resultats de microarrays d'ADN com els de PCR a temps real semblarien indicar que la NBTI no bloqueja la disminució transcripcional de RPL3 produïda per l'acció de la 5'-DFUR. Aquestes dades ens permetrien hipotetitzar que és la 5'-DFUR transportada a través d'hENT2 la responsable de la incorporació en l'ARN.

Finalment, ens vam proposar analitzar el paper dels anàlegs de nucleòsids com a moduladors de l'expressió i l'activitat dels transportadors responsables de la seva captació. Els resultats obtinguts en la línia cel.lular MCF7 demostren que el tractament amb gemcitabina o 5'-DFUR regula l'expressió dels transportadors de nucleòsids de manera diferencial. De fet, mentre l'efecte principal de la 5'-DFUR era un increment dels nivells de proteïna i d'activitat de hCNT1, la gemcitabina produïa un augment de l'ARNm de hCNT3 acompanyat d'una disminució del d'hENT1, que es traduïa en els corresponents canvis d'activitat d'ambdues isoformes. La disminució d'hENT1 com a conseqüència del tractament amb gemcitabina és oposada a estudis realitzats amb altres anàlegs de nucleòsids (Pressacco et al., 1995b; Petersen et al., 1996). Tanmateix, el resultat obtingut corroboraria la hipòtesi de que hENT1 és important en proliferació, per tant, en situacions d'aturada del cycle cel.lular es produiria una disminució d'aquest.

Aquests resultats descriuen per primera vegada l'increment dels nivells de transportadors de nucleòsids concentratius com a conseqüència del tractament amb anàlegs de nucleòsids. El fet que dos derivats de nucleòsids regulin transportadors diferents podria ser degut, en part, als mecanismes d'acció d'aquest anàlegs. La 5'-DFUR afecta principalment a la timidilat sintasa disminuint els nivells de dTTP (Houghton et al., 1995), mentre que la gemcitabina inhibeix la ribonucleòtid reductasa alterant, per tant, els *pools* de dNTPs (Galmarini et al., 2001b). En conseqüència, la 5'-DFUR incrementaria l'expressió d'un transportador concentratiu preferent per pirimidines, mentre que la gemcitabina afectaria a un d'àmplia especificitat de substrat. Per tant, la regulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids com a resposta a l'acció dels fàrmacs seria un mecanisme de modulació de les variacions intracel.lulars de nucleòsids i nucleòtids. En concordança, dins el marc de la tesi doctoral de la Dra. Sonia Fernández la depleció d'adenosina, mitjançant l'administració d'adenosina desaminasa, produïa un increment transcripcional i d'activitat de CNT2. No obstant, cal tenir en compte que els efectes citotòxics d'ambdós fàrmacs utilitzats són diferents, ja que mentre la 5'-DFUR activa el receptor de la mort FAS, la gemcitabina actua preferentment a través de la via mitocondrial (Simstein et al., 2003), pel que no es pot descartar un paper d'aquests transportadors en la mort cel.lular. De fet, l'agent pro-apoptòtic LPS produeix un increment de CNT1 i CNT2 en macròfags (Soler et al., 2001b). De manera similar, dins el marc de la tesi doctoral de la Dra. Sonia Fernández, s'ha descrit que el tractament d'hepatòcits amb TGF- $\beta$  augmenta

l'expressió de CNT2. D'altra banda, a part de la importància d'aquests resultats en la comprensió del paper fisiològic dels transportadors de nucleòsids, aquestes dades també poden tenir implicacions terapèutiques, tant en el disseny de teràpies combinades com en els temps de tractament, ja que s'ha demostrat que l'expressió heteròloga d'un transportador concentratiu incrementa la sensibilitat als anàlegs de nucleòsids (Mata et al., 2001; Lang et al., 2001; García-Manteiga et al., 2003).

En conclusió, podem afirmar que els transportadors de nucleòsids equilibratius juguen un paper important en la sensibilitat a fàrmacs antineoplàsics derivats de nucleòsids. Tanmateix, el transportador implicat en la sensibilitat dependrà essencialment del tipus de tumor analitzat i del mecanisme d'acció del fàrmac. Així, mentre en tumors altament proliferatius, com el LCM, hENT1 és important en la sensibilitat a gemcitabina, en tumors amb una baixa taxa de proliferació, com la LLC, és hENT2 el transportador implicat en la sensibilitat a fludarabina. Addicionalment, s'han de tenir en compte les implicacions terapèutiques dels anàlegs de nucleòsids com a moduladors de l'expressió dels transportadors responsables de la seva captació a l'hora de dissenyar els temps de tractament i les teràpies combinades.