I. INTRODUCCIÓ

1. TRANSPORTADORS INTESTINALS.

1.1. MORFOLOGIA FUNCIONAL DE LA MUCOSA DE L'INTESTÍ PRIM.

La mucosa intestinal és el centre metabòlic de l'intestí. Presenta una estructura histològica altament diferenciada, amb una intensa vascularització i una morfologia especialitzada que facilita les seves funcions: activitat secretora i absortiva, barrera mecànica i immunològica i processament de soluts.

1.1.1. Bases estructurals de la mucosa intestinal.

La mucosa intestinal està organitzada amb l'objectiu d'augmentar al màxim la superfície d'absorció mitjançant les vellusitats, que es projecten cap a la llum de l'intestí, i les microvellusitats, presents a la membrana apical dels enteròcits. Es divideix en tres capes: la *muscularis mucosae*, amb deu capes de cèl·lules musculars llises implicades en el moviment de les vellusitats i contracció de les criptes; la làmina pròpia, que conté cèl·lules del sistema immunològic, vasos limfàtics i sanguinis, fibres nervioses desmielinitzades i cèl·lules musculars llises i que presenta funcions immunològiques i motores; i finalment l'epiteli, que es troba en contacte amb la llum intestinal i que també constitueix les criptes.

Aquest tercera capa conté diversos tipus cel·lulars implicats en funcions especialitzades. Es tracta d'un epiteli monoestratificat format principalment per cèl·lules d'absorció o enteròcits, diverses cèl·lules amb funció secretora com les cèl·lules endocrines i les cèl·lules caliciformes, cèl·lules de Paneth, implicades en la regulació de la flora bacteriana intestinal així com en la segregació d'enzims importants per la digestió del contingut intraluminal, i cèl·lules indiferenciades. Les cèl·lules indiferenciades es troben a les criptes i es caracteritzen per presentar una elevada activitat mitòtica. Moltes cèl·lules filles formades a partir d'aquest tipus cel·lular indiferenciat emigren cap a la llum intestinal i durant aquest trajecte pateixen una sèrie de processos de diferenciació que permeten donar lloc a les diferents línies cel·lulars anteriorment anomenades.

1.1.2. L'enteròcit o cèl·lula absortiva intestinal.

Els enteròcits són cèl·lules altament diferenciades. Presenten una membrana apical, formada per microvellusitats que es projecten en forma de fines evaginacions digitiformes augmentant la seva àrea total d'absorció més de 25 vegades, i una membrana basolateral separada de l'anterior a través de les unions d'oclusió o estanques. Les unions estanques formen una barrera de permeabilitat selectiva a través dels epitelis amb una doble funció: d'una banda actuen de barrera contra la lliure difusió de proteïnes de membrana entre els dominis apical i basolateral i en segon lloc constitueixen un sistema de segellat entre cèl·lules veïnes, de tal manera que les molècules hidrosolubles no puguin difondre entre elles.

Les microvellusitats presenten una composició química determinada amb un alt quocient proteic/lipídic i un alt contingut en colesterol i glicolípids, indicant la baixa fluidesa i permeabilitat de la membrana apical. En el glicocàlix es troben un gran nombre d'enzims (disacaridases i peptidases), receptors i proteïnes de transport. Hi ha evidències que la composició de les microvellusitats va variant al llarg de l'intestí; de la mateixa manera, s'observen diferències entre enteròcits madurs i immadurs (Schwarz et al., 1984). Per altra banda la composició bioquímica de la membrana basolateral difereix de l'anterior mostrant un quocient proteic/lipidic menor i un alt contingut en fosfolípids suggerint un grau de permeabilitat superior al de les microvellusitats (Brasitus and Schachter, 1984). Aquesta membrana juga un paper important en l'homeòstasi intestinal i presenta una elevada expressió de l'ATPasa de Na^+-K^+.

1.2. TRANSPORTADORS DE NUTRIENTS.

Els processos d'absorció i secreció duts a terme per l'intestí tenen lloc a la mucosa intestinal. Aquests processos depenen de les propietats de transport de les membranes apicals i basolaterals dels enteròcits i sobre les quals s'exerceixen efectes moduladors per factors extra i intracel·lulars. Generalment les proteïnes transportadores estableixen un gradient electroquímic a través de les membranes i permeten el pas d'electrolits, aminoàcids, dipèptids, monosacàrids, lípids, àcids carboxílics i nucleòsids. Aquestes proteïnes transportadores de membrana poden classificar-se en canals o transportadors (*carriers*) segons el seu mecanisme de transport. Aquests darrers poden dividir-se entre els de difusió facilitada, de transport

actiu primari i de transport actiu secundari en funció dels seus requeriments energètics.

1.2.1. Principals transportadors de nutrients.

Les proteïnes transportadores de membrana es distribueixen estratègicament entre les dues membranes de les cèl·lules epitelials intestinals. Aquesta regionalització fa que les propietats de transport apical i basal difereixin i a la vegada permet una transferència vectorial dels nutrients des de la llum intestinal fins a la circulació a través de la làmina epitelial.

Localitzats a la membrana apical existeixen un gran ventall de sistemes de transport especialitzats en l'absorció dels principals nutrients de la dieta. Així doncs, els enteròcits expressen un gran nombre de transportadors d'aminoàcids (TAAs), alguns dels quals són ubicus mentre d'altres són específics de les membranes de vora en raspall (BBM) intestinals i renals. Els TAAs apicals són els principals responsables de l'absorció d'aminoàcids presents en el lumen intestinal i en canvi els TAAs localitzats a la superfície basolateral de l'enteròcit faciliten la transferència d'aminoàcids entre l'enteròcit i la circulació. No obstant, la majoria dels productes de digestió de proteïnes són pèptids petits. La major part dels di- i tri-pèptids són internalitzats dins les cèl·lules intestinals mitjançant el transportador PEPT1. Es tracta d'un transportador actiu secundari dependent del gradient de protons i en conseqüència requereix la presència de bescanviadors de Na^+/H, situats a la mateixa membrana, que actuen mantenint un pH àcid a nivell de la superfície de la mucosa intestinal. Els di- i tri-pèptids són metabolitzats i convertits en els aminoàcids constituents dins els enteròcits i podran ser transportats al corrent sanguini mitjançant els TAAs localitzats a la membrana basolateral. Cal destacar que fins el moment no s'ha trobat cap transportador d'oligopèptids ubicats a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials intestinals. El principal nutrient de la dieta, els monosacàrids, generalment en forma de glucosa, galactosa i fructosa, són captats a la membrana apical a través del transportador dependent del gradient de sodi SGLT1 i del transportador passiu GLUT5, en el cas de la fructosa. La sortida de monosacàrids cap a la circulació està facilitada per el transportador passiu GLUT2 (Matsumoto et al., 1993). A les membranes dels enteròcits també es poden trobar altres tipus de transportadors, com per exemple el transportador d'anions orgànics OATP3, implicat

en la circulació enterohepàtica recaptant àcids bil·liars i la hormona tiroidea a la membrana apical d'aquestes cèl·lules (Mikkaichi et al., 2004).

Com a norma general, podríem dir que els transportadors actius secundaris com és el cas de SGLT1 i PEPT1 es troben majoritàriament localitzats a la membrana apical de l'enteròcit, permetent una concentració molt més elevada dels substrats a l'interior cel·lular tot i a expenses d'una despesa energètica. Així, l'ATPasa de Na^+-K^+, expressada a la membrana basolateral, és la responsable de mantenir el gradient de concentració intracel·lular de sodi necessari perquè tinguin lloc aquests processos de transport. Per altra banda la sortida dels nutrients absorbits, tant en la seva forma original com en productes de la seva metabolització està principalment mitjançada per transportadors passius o de difusió facilitada que depenen del gradient de concentració del propi substrat.

1.2.2. Regulació del transportadors intestinals.

L'epiteli intestinal presenta una habilitat inherent per adaptar-se a alteracions de l'entorn intern o extern mitjançant canvis tant morfològics com funcionals. De fet l'epiteli intestinal és un dels teixits de l'organisme metabòlicament més actiu. Les cèl·lules immadures de la cripta migren cap els vil·li en un període de 2-4 dies fins donar lloc als enteròcits diferenciats. Addicionalment, s'ha descrit que en resposta a un dany de la mucosa, malnutrició o pèrdua de la superfície absortiva, els enteròcits responen accelerant el seu creixement i alterant l'activitat dels transportadors de nutrients mitjançant tant un increment de la seva síntesi com un augment del nombre de transportadors presents a la superfície cel·lular. Existeixen una gran varietat de senyals implicades en aquest procés, anomenat adaptació, que inclouen hormones, factors de creixement i els propis nutrients (Thiesen et al., 2003). L'efecte de les hormones i els factors de creixement depèn de la font del factor així com de la localització del seus receptors. Quan un lligand es troba al lumen intestinal un receptor suposadament situat a la membrana de vora en raspall mitjançarà el seu efecte. Al contrari, el receptors basolaterals són més accessibles a factors presents en el torrent sanguini.

- **Factors de creixement.**

Un gran nombre de factors de creixement presenten un efecte tròfic sobre el tracte gastrointestinal induint un increment de la proliferació cel·lular però alhora produint canvis morfològics i modulant activitats de transport. S'ha descrit que l'IGF-I, *insulin-like growth factor*, estimula *in vitro* el creixement cel·lular així com el transport de glucosa i aminoàcids (Wheeler and Challacombe, 1997). L'hormona de creixement (GH) estimula el creixement i la diferenciació intestinal, a la vegada que promou l'absorció d'ions, aminoàcids i aigua (Becker et al., 1995).

El factor de creixement epidèrmic (EGF) actua sobre l'epiteli intestinal ajudant a mantenir la integritat de la mucosa sana, no només estimulant la proliferació i migració dels enteròcits sinó també estimulant la seva reparació quan els seus receptors estan exposats a un dany de la mucosa. La secreció d'EGF a l'intestí està sotmesa a un control humoral, colinèrgic i adrenèrgic (Carpenter et al., 1979). L'expressió del seus receptors a l'intestí disminueix gradualment des de la cripta fins als vil·li i s'ha observat que en línies cel·lulars polaritzades, com les cèl·lules Caco-2, la seva localització és estrictament basolateral (Playford et al., 1996). En aquesta mateixa línia cel·lular s'ha demostrat que el tractament a llarg termini amb aquest factor de creixement indueix un augment del transport independent de Na^+ de L-arginina que es correspon a un increment de la síntesi de *novo* del sistema y^+ (Pan et al., 1995), i per altra banda produeix una disminució de l'expressió del transportador de pèptids hPEPT1 (Nielsen et al., 2001). En d'altres models, com l'intestí de rata i de conill, s'ha descrit que la presència d'EGF produeix un increment del transport d'alanina i glutamina (Salloum et al., 1993) i també del transport de glucosa (Hardin et al., 1996).

- **Nutrients com a factors de creixement.**

Els constituents de la dieta produeixen contínuament canvis en els senyals extracel·lulars que reben els enteròcits i que regulen l'expressió de determinats gens, modulant tant la morfologia de l'intestí com la seva funció principal, la funció absortiva. Hi ha evidències que la glutamina no és només una font d'energia pels enteròcits sinó que pot actuar com un factor de creixement incrementant l'absorció de determinats nutrients (Wilmore et al., 2000).

D'altre banda la majoria de transportadors de membrana són regulats pels seus propis substrats. Per exemple, el sistema A, una de les activitats transportadores d'aminoàcids neutres dependents de Na+, s'indueix durant la privació d'aminoàcids i en canvi és regulat negativament pels seus substrats (Mc Givan and Pastor-Anglada, 1994). De manera inversa, les activitats dels transportadors SGLT-1, situat a la membrana apical, i GLUT2, localitzat a la membrana basolateral, augmenten en animals alimentats amb un dieta elevada en carbohidrats (Cheeseman and Harley, 1991; Ferraris and Diamond, 1992). De la mateixa manera el transportador de fructosa GLUT5 augmenta en presència del seu substrat (Corpe et al., 1998). Anàlogament, la presència de dipèptids i de determinats aminoàcids produeix un increment de l'expressió de PEPT1 que s'acaba traduint en una inducció de la seva activitat (Shiraga et al., 1999).

- **Glucocorticoids.**

Els glucocorticoids promouen el desenvolupament i la maduració de la mucosa gastrointestinal modulant múltiples activitats cel·lulars i afavorint les funcions absortives de l'intestí. En aquest sentit, s'ha demostrat que l'administració de glucocorticoids en infants prematurs, en els estadis crítics de maduració, produeix una aparició avançada dels enzims digestius (Iannoli et al., 1998a). En estudis posteriors realitzats en cultius cel·lulars derivats d'epiteli intestinal de rata (IEC-6, IEC-17, IEC-18), s'ha observat una inhibició del creixement cel·lular així com múltiples canvis morfològics associats a un fenotip més diferenciat (Quaroni et al., 1999). Els mateixos autors han demostrat que els glucocorticoids també modulen les propietats de transport en aquestes línies promovent un increment de la captació d'hexoses. De la mateixa manera s'observa un increment de la captació de glucosa en vesícules de vora en raspall d'intestí de conill 24 hores després de l'administració de glucocorticoids. Paral·lelament, en aquest model també s'observa un augment del transport de diferents aminoàcids com glutamina, alanina i arginina (Iannoli et al., 1998). En canvi, Shepherd i col·laboradors han descrit que l'administració de dexametasona en rates produeix una ràpida disminució del transport de glucosa mitjançat per GLUT-2 degut a una disminució del tràfic del transportador cap a la membrana basolateral (Shepherd et al., 2004).

1.2.3 Transport de fàrmacs.

El tracte gastrointestinal continua essent la via més popular i acceptada d'administració de fàrmacs i per tant l'absorció intestinal d'aquests compostos és un camp de continu interès en molts grup de recerca. Tot i que durant molt de temps es creia que l'absorció de fàrmacs administrats oralment es produïa per difusió passiva, actualment se sap que la bioassequibilitat d'un gran nombre de fàrmacs depèn dels diferents sistemes de transport presents a la membrana dels enteròcits. El transportador de pèptids hPEPT1 és el transportador de fàrmacs més ben caracteritzat en aquest teixit. Aquesta proteïna de membrana és responsable d'internalitzar anàlegs de pèptids farmacològicament actius com les cefalosporines, l'acyclovir i l'AZT entre d'altres (Katsura and Inui, 2003). Així mateix, s'han descrit altres famílies de proteïnes transportadores implicades en l'absorció de drogues com els transportadors d'àcids monocarboxílics (MCTs), implicats en la internalització de pravastatina i l'àcid acetil salicílic, les famílies de transportadors d'àcids orgànics (OATs, OATPs) i les famílies de transportadors de nucleòsids (ENTs i CNTs) (Katsura et Inui, 2003; Pastor-Anglada et al., 2005). Conjuntament amb aquests sistemes de transport, a l'epiteli intestinal, així com en tots els tipus cel·lulars, s'expressen membres de la família de les MRPs (*Multidrug Resistance Proteins)*. Les MRPs són bombes d'extrusió dependents d'ATP i juguen un paper crucial en la bioassequibilitat de molts fàrmacs, ja que limiten l'absorció d'aquests compostos mitjançant la seva secreció al lumen intestinal. A la membrana apical dels enteròcits s'expressen la P-glicoproteïna, la BCRP (*breast cancer resistance protein*) i la MRP2, que produeixen una disminució de l'entrada de molts fàrmacs hidrofòbics incluint agents usats en el tractament del càncer, mentre a la membrana basolateral es localitza la MRP3, implicada en la translocació d'àcids bil·liars a la sang. L'absorció o bioassequibilitat dels fàrmacs presenta una elevada complexitat. En primer lloc perquè un mateix fàrmac pot ésser transportat per diferents tipus de transporadors que faciliten tant la seva captació com la seva sortida. Però a més, transportadors, bescanviadors iònics i bombes iòniques interaccionen a fi d'establir la capacitat real de transport.

2. TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.

Els nucleòsids són molècules relativament hidrofíliques i de lenta difusió a través de la membrana plasmàtica, fet que fa imprescindible la presència de transportadors específics de membrana perquè es pugui dur a terme la seva internalització. Els transportadors de nucleòsids són determinants en la regulació de molts processos fisiològics modulant els nivells extracel·lulars dels substrats que internalitzen però alhora representen el camí d'entrada de molts anàlegs citotòxics utilitzats en la teràpia antiviral i del càncer.

2.1. CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.

Històricament, els transportadors de nucleòsids han estat descrits atenent a les seves característiques cinètiques. Aquest fet ha permès assumir que com a mínim existeixen set sistemes diferents responsables de la captació dels nucleòsids. Dos d'ells es caracteritzen per mitjançar un transport equilibratiu independent de sodi i les cinc restants es corresponen amb activitats concentratives i dependents de sodi, que contribueixen a l'acumulació dels seus substrats a l'interior cel·lular a expenses d'un gast energètic (Griffith and Jarvis, 1996; Pastor-Anglada et al., 1998a¸ Baldwin et al., 1999). La classificació dels diferents sistemes que integren cadascun d'aquests grups es mostra a la **figura 1**.

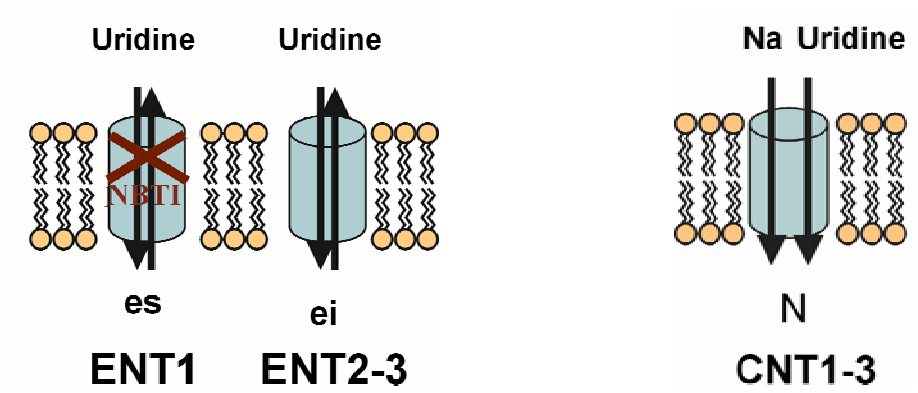

Figura 1. Agències cinètiques del transport de nucleòsids y entitats moleculars que els identifiquen. N: cotransport concentratiu Na+/uridina; **es**: transport equilibratiu sensible a NBTI; **ei**: transport equilibratiu insensible a NBTI. ENTs i CNTs: famílies gèniques o entitats moleculars "*Equilibrative Nucleoside Transporters"* i *"Concentrative Nucleoside Transporters".*

2.1.1. Sistemes equilibratius.

Els sistemes equilibratius són transportadors passius que gràcies al gradient de concentració de substrat faciliten la difusió dels nucleòsids a través de la membrana plasmàtica. Són independents de sodi, permetent tant l'influx com l'eflux del solut. Actuen doncs bidireccionalment i presenten una àmplia especificitat de substrat, acceptant purines i pirimidines. S'han descrit en un gran nombre de cèl·lules, tant normals com tumorals (Belt et al., 1993) i es caracteritzen per presentar una baixa afinitat pels diferents nucleòsids amb *Km* aparents del rang micromolar alt (100-800 μM)

S'han classificat en dos subtipus que es diferencien per la seva sensibilitat a un anàleg estructural de l'adenosina, la nitrobenziltioinosina o NBTI. Es parla doncs del sistema **e**quilibratiu **s**ensible a NBTI o ***es*** i del sistema **e**quilibratiu **i**nsensible a NBTI o ***ei***, essent la *Ki* de l'ordre de nM i superior a 1 μM respectivament. Aquest anàleg de l'adenosina s'usa de manera rutinària com a lligand per caracteritzar i quantificar el nombre de transportadors *es* presents a la membrana plasmàtica ja que s'ha observat que el grau d'inhibició és proporcional a la quantitat de NBTI que s'uneix al transportador amb una estequiometria d'inhibidor/transportador 1:1 (Jarvis and Young, 1980; Shi et al., 1984; Wu and Young, 1984; Tse et al., 1985). Addicionalment, aquest anàleg també s'ha intentat utilitzar com a sonda per a la purificació d'aquest transportador (Jarvis and Young, 1981; Kwong et al., 1987).

Ambdós sistemes, *es* i *ei*, són inhibits pels vasodilatadors dipiridamol i dilazep, encara que el sistema *es* presenta una sensibilitat molt superior (rang nM). Tanmateix, la clonació de les isoformes humanes i de rosegadors ha posat de manifest que la sensibilitat a aquests compostos és altament dependent de l'espècie i s'ha comprovat que els sistemes de rata són molt més resistents que els d'humans i que els de la majoria d'espècies (Griffith and Jarvis, 1996; Sundaram et al., 1998).

Els únics compostos descrits amb una afinitat superior pel sistema *ei* han estat els derivats de l'adenosina 2-halogenats (2-cloroadenosina, 2-fluoroadenosina) i la soluflazina, anàleg de la draflazina, tot i que les seves afinitats absolutes (>200nM) no han permès el seu ús com a possibles sondes. La informació addicional que d'aquí s'extreu és que ambdós subtipus han de presentar dominis d'unió a lligands diferents. En aquest sentit s'ha demostrat que *ei*, però no *es*, pot transportar nucleobases com la

hipoxantina (Osses et al., 1996; Crawford et al., 1998). La hipoxantina és produïda de manera contínua a partir del metabolisme de nucleòtids púrics i suposa una font important de recuperació de l'anell púric, particularment en cèl·lules de la medul·la òssia, en les que pot arribar a concentracions de 30 μM (Tattersall et al., 1983).

2.1.2. Sistemes concentratius.

A diferència de les activitats equilibratives, els sistemes concentratius són transportadors actius secundaris dependents de sodi. Aprofiten l'energia del gradient electroquímic de sodi per cotransportar el substrat en contra de gradient cap a l'interior cel·lular. Així doncs permeten l'acumulació intracel·lular dels nucleòsids transportats a expenses d'una despesa energètica.

Cinèticament s'han caracteritzat cinc sistemes concentratius que es diferencien segons la seva especificitat de substrat. El sistema **N1**, anteriorment anomenat ***cif*** (**c**oncentratiu, **i**nsensible a NBTI que transporta **f**ormicina B), transporta preferentment per purines i accepta com a substrat distintiu la formicina B, anàleg no metabolitzable de la inosina. El sistema **N2**, també anomenat ***cit*** (**c**oncentratiu, **i**nsensible a NBTI que transporta **t**imidina), transporta preferentment pirimidines. Tot i que inicialment es va determinar que podia transportar en alguna mesura adenosina, recentment s'ha comprovat, mitjançant tècniques basades en l'electrofisiologia, que és capaç d'unir aquest substrat però no el pot transportar (Larrayoz et al., 2004). El tercer dels sistemes descrit, **N3** o ***cib***, és un sistema d'àmplia especificitat de substrat que pot transportar tant purines com pirimidines. Respecte a l'estequiometria d'aquests sistemes de transport, actualment es sap que pels sistemes N2 i N3 és de Na^+/nucleòsid 2:1 (Larrayoz et al., 2004) i pel sistema N1 és de 1:1. A concentracions fisiològiques de Na^+, aquests transportadors actuarien prop de la saturació (Ritzel et al., 2001a)

Posteriorment, s'han identificat en tipus cel·lulars concrets dues activitats concentratives més que encara estan en vies de caracterització. **N4** s'ha detectat en vesícules de membrana de vora en raspall de ronyó humà (Gutiérrez et al., 1993) i s'ha descrit que acceptaria selectivament purines i pirimidines però no Formicina B i inosina. **N5**, la única activitat concentrativa inhibida per NBTI i dipiridamol definida fins el moment, ha estat descrita en cèl·lules humanes NB4 de leucèmia promielocítica aguda (Flanagan and Meckling-Gill, 1997) i també ha estat detectada en limfòcits B

humans (Raji i BLS-1) pel nostre grup d'investigació (Soler et al., 1998). Es tracta d'una activitat de transport sodi-dependent i guanosina preferent i, recentment, s'ha demostrat la seva implicació en el transport d'anàlegs d'aquest nucleòsid com l'ara-G (Flanagan et al., 2003). El sistema **N5** s'ha anomenat també ***csg*** en base a la seva condició d'activitat concentrativa, sensible a NBTI i preferent per guanosina.

Els sistemes concentratius i dependents de sodi presenten una elevada afinitat pels seus substrats amb valors de *Km* aparents de l'ordre d'1 a 50 μM. Tots semblen transportar uridina, la majoria accepten adenosina i es caracteritzen, exceptuant el cas concret de N5, per la seva insensibilitat als inhibidors del transport equilibratiu com la NBTI, el dipiridamol i el dilazep. Tot i així, dosis altes de dipiridamol poden produir certa inhibició.

La majoria de cèl·lules animals combinen diversos sistemes de transport de nucleòsids. Tot i que inicialment es pensava que les entitats equilibratives eren majoritàries i les activitats concentratives eren específiques d'epitelis especialitzats, actualment es sap que tots dos tipus de sistemes presenten una àmplia distribució tissular, coexistint en un gran nombre de tipus cel·lulars, tant normals com tumorals. De fet, fins i tot sembla que existeixi un canvi en la dotació d'aquests sistemes de transport a mesura que la cèl·lula progressa cap a la malignitat. A nivell global, Belt i col·laboradors han descrit que un gran nombre de cèl·lules neoplàsiques humanes expressen fonamentalment activitats *es* al contrari del transport concentratiu majoritari en cèl·lules no transformades. Aquest fet s'ha anat estudiant des de fa uns anys amb finalitats quimioterapèutiques (Belt et al., 1993; Yao et al., 1996; Griffiths et al., 1997a; Mackey et al., 1998; Pastor-Anglada et al., 1998a; Baldwin et al., 1999; Hammond et al., 1999)

2.2. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.

La clonació dels diferents sistemes de transport, així com la seva expressió en diferents sistemes heteròlegs, ha permès avançar en el coneixement de les caraterístiques moleculars i estructurals dels transportadors de nucleòsids. Gràcies a la generació d'anticossos específics contra aquestes proteïnes s'han pogut realitzar estudis de distribució i localització subcel·lular així com de regulació.

Sistemes concentratius

Activitat	Gen	cDNA	Proteïna	Substrats	Ref.
N2 (cit)	SLC28A1	**rCNT1** **hCNT1**	648 aa 650 aa	uridina, timidina, citidina	(Giacomini et al.,1993,1994 ; Anderson et al., 1996; Felipe et al., 1997; Ritzel et al., 1997)
N1 (cif)	SLC28A2	**rCNT2** **hCNT2** **mCNT2**	659 aa 658 aa 660 aa	adenosina, guanosina, uridina, inosina	(Anderson et al., 1996; Wang et al., 1997; Ritzel et al., 1997,1998; Patel et al., 2000)
N3 (cib)	SLC28A3	**hCNT1** **mCNT1**	691 aa 703 aa	uridina, citidina, timidina, adenosina, guanosina, inosina	(Ritzel et al., 2001)

Sistemes equilibratius

Activitat	Gen	cDNA	Proteïna	Substrats	Ref.
es	SLC29A1	**rENT1** **hENT1**	457 aa 456 aa	adenosina, guanosina, inosina, uridina, timidina, citidina	(Coe et al., 1996; Griffiths et al., 1997; Ward et al., 2000)
ei	SLC29A2	**rENT2** **hENT2**	456 aa 456 aa	adenosina, inosina, uridina, timidina, citidina	(Yao et al., 1997; Crawford et al., 1998; Ward et al., 2000)

Taula 1. Transportadors de nucleòsids clonats.

2.2.1. SLC 29 Família de transportadors equilibratius.

- **ENT1 (SLC29A1)**

L'estudi de les característiques moleculars dels sistemes equilibratius de transport de nucleòsids es va iniciar molt abans de la seva clonació mitjançant diverses estratègies. Històricament, un dels models cel·lulars usats per la descripció dels sistemes de transport de nucleòsids van ser els eritròcits humans on es va identificar com a únic transportador de nucleòsids el sistema de transport *es*. Mitjançant un assaig d'activitat d'unió a NBTI es va poder purificar i extreure parcialment la proteïna transportadora present en aquestes cèl·lules (Jarvis i Young, 1981). A partir de la informació derivada de la seqüència d'aminoàcids d'aquesta

proteïna es va aïllar un cDNA de placenta humana que codificava per una proteïna glicosilada de 456 residus aminoacídics (50KDa) i es va anomenar **hENT1** (***h****uman* ***E****quilibrative* ***N****ucleoside* ***T****ransporter 1*) (Griffiths et al., 1997a). hENT1 ha estat el primer membre clonat d'una família funcional diferent de la dels CNTs i que comprèn transportadors expressats en un gran nombre de teixits i espècies (Griffiths et al., 1997a). S'han identificat homòlegs en una gran varietat d'eucariotes (llevats, fongs, nemàtodes, plantes, mamífers i també protozous paràsits). El seu gen ha estat mapat en el cromosoma 6p21.1-p21.2 (Coe et al., 1997). La seva corresponent expressió en oòcits de *Xenopus laevis* dóna lloc a una activitat equilibrativa, sodi-independent i sensible a la inhibició per NBTI i dipiridamol. Posteriorment Yao i col·laboradors (1997) van identificar el seu ortòleg de rata mitjançant tècniques basades en homologia de seqüència i expressió funcional dels cDNAs en oòcits de *Xenopus laevis.* El cDNA corresponent a l'activitat funcional *es* **rENT1**, aïllat de pulmó, jejúnum i fetge, presenta un 78% d'homologia de seqüència amb hENT1 i codifica per una proteïna formada per 457 residus.

- **ENT2 (SLC29A2)**

De manera quasi simultània per dos grups d'investigació independents (Griffiths et al., 1997b; Crawford et al., 1998), es va dur a terme el clonatge d'**hENT2**. La seva seqüència nucleotídica prediu una proteïna de 456 residus aminoacídics localitzada majoritàriament en placenta, cervell, cor i teixit ovàric i presenta una homologia de seqüència d'un 50% amb hENT1 i un 88% amb els ortòlegs de rata (**rENT2**) i ratolí (**mENT2**) (Yao et al., 1997; Kiss et al., 2000). hENT2, i de la mateixa manera rENT2, es correspon a la seqüència completa de la forma truncada del producte gènic de resposta proliferativa HNP36. La zona carboxi-terminal del transportador és idèntica a aquesta petita proteïna de 326 residus, descrita en el *GenBank* i de funció encara desconeguda. Comparant les dues seqüències s'ha suggerit que HNP36 és traduïda a partir d'un segon codó d'inici en pauta de lectura oberta d'ENT2. L'expressió transitòria de la seqüència completa i d'una construcció, truncada a 5' i que presenta un 99% d'homologia amb HNP36, demostra que només la primera confereix la capacitat de transport d'uridina a les cèl·lules.

- **ENT3 i ENT4**

Recentment s'han identificat dues noves isoformes anomenades ENT3 i ENT4 en teixits humans i murins (Hyde et al. 2001; Baldwin et al. 2004). Les proteïnes humanes i de ratolí de 475 residus aminoacídics, denominades **hENT3** i **mENT3** respectivament, presenten una identitat del 73% però hENT3 és només un 29% idèntica en seqüència a hENT1. Aquesta proteïna difereix d'hENT1 i d'hENT2 principalment perquè presenta un extrem amino-terminal hidrofílic molt llarg (51AA) que conté dos motius de seqüència dileucina característics de proteïnes endosomals i lisosomals. Sembla doncs que aquesta isoforma resideix de manera predominant dins de compartiments intracel·lulars en comptes de dirigir-se a la superfície cel·lular i la mutació d'aquesta seqüència consens produeix la relocalització de la proteïna a nivell de la membrana plasmàtica. La seva caracterització cinètica ha posat de manifest que es tracta d'un transportador de baixa afinitat per adenosina i uridina essent els valors de *Km* aparents de 40 i 10 vegades superiors als descrits per hENT1 respectivament i la seva activitat és òptima a un pH de 5.5. També cal destacar que el transport mitjançat per ENT3 és menys sensible a la inhibició per NBTI i dipiridamol que el d'hENT1. L'expressió d'hENT3 és ubiqüa, el seu missatger es detecta en un ampli ventall de teixits humans però és particularment abundant a placenta, teixit a partir del qual s'ha pogut clonar (Balwin et al., 2005). **hENT4**, codifica per una proteïna de 530 residus, identificada originalment per anàlisi de bases de dades del genoma, i sembla estar molt allunyada dels altres transportadors de la família. Recentment, s'ha dut a terme la seva caracterització i sembla que es tracta d'un transportador de monoamines de baixa afinitat en comptes d'un transportador de nucleòsids, per això s'ha anomenat alternativament **PMAT** (***P****lasma* ***M****embrane mono****A****mine* ***T****ransporter*), tot i que l'ortòleg de ratolí és capaç de transportar adenosina (Baldwin et al., 2004, Engel et al., 2004). També s'expressa en un gran nombre de teixits humans (Baldwin et al., 2004).

- **Estructura i determinants moleculars de l'especificitat dels ENTs.**

Estudis recents mitjançant mutagènesi de residus susceptibles de glicosilació (Sundaram et al., 2001) han confirmat el model topològic proposat inicialment pels anàlisis de predicció a partir de la seqüència. Així, l'estructura bàsica dels transportadors equilibratius constaria d'11 dominis transmembrana amb l'extrem N-terminal citoplasmàtic i C-terminal extracel·lular. hENT1 presenta un lloc de N-glicosilació en el gran loop extracel·lular entre els dominis transmembrana 1 i 2, i en

canvi hENT2 en conté dos en el mateix loop extracel·lular; tanmateix aquests llocs de glicosilació no semblen ésser essencials per l'activitat dels transportadors (Vickers et al., 1999; Ward et al., 2003)

Amb la finalitat de determinar els dominis responsables de l'especificitat de substrat d'aquests transportadors s'han realitzat estudis basats en la generació de quimeres. Aquests estudis han posat de manifest que la regió entre els dominis transmembrana 3 i 6 és responsable de la sensibilitat o resistència als inhibidors NBTI, dipiridamol i dilazep (Sundaram et al., 1998). D'altre banda la regió entre els dominis transmembrana 1 i 6 sembla responsable de l'habilitat d'hENT2 per transportar desoxinucleòsids, mentre que els dominis 5 i 6 estan implicats en el reconeixement de les nucleobases (Yao et al., 2001b, 2002b). Addicionalment, la generació de mutacions puntuals de diversos residus d'hENT1 han demostrat que la substitució de la Gly^{154} d'hENT1 pel residu equivalent d'hENT2 no afecta l'activitat de transport però suposa la pèrdua de la sensibilitat a NBTI. El procés contrari no sensibilitza hENT2, indicant que a més de la Gly^{154}, altres residus han de participar en la sensibilitat diferencial d'*es* i *ei* a l'inhibidor (Hyde et al., 2001). Resultats més recents han posat de manifest el paper clau que juguen els residus Ser^{160} i Met^{89} d'hENT1 en conferir la sensibilitat a dipiridamol i l'afinitat per adenosina i guanosina respectivament (Endres and Unadkat, 2005).

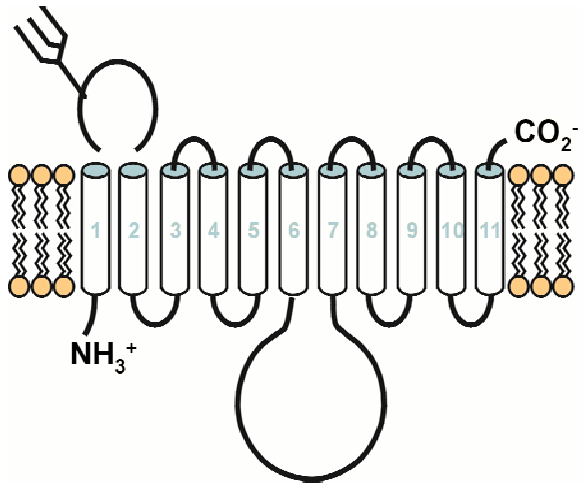

Figura 2. Estructura molecular predita per la família gènica de transportadors equilibratius (ENTs).

2.2.2. Transportadors concentratius (SLC28).

- **CNT1 (SLC28A1)**

Degut a la manca d'inhibidors d'alta afinitat i anticossos dirigits contra els sistemes de transport concentratius, el primer transportador de nucleòsids no es va clonar fins l'any 1994, gràcies a una estratègia d'expressió funcional en oòcits de *Xenopus laevis*. Es tracta d'una aproximació basada en l'activitat de transport i utilitzada de manera rutinària en la clonació de molts transportadors, que degut a la seva baixa proporció relativa davant un nombre total de proteïnes de membrana, no es podien purificar i seqüenciar directament (Huang et al., 1994). A partir d'epiteli de jejúnum de rata es va aïllar un cDNA de 2.4 Kb que corresponia a l'activitat funcional pirimidino-preferent N2. Existien evidències prèvies, per microinjecció de mRNA poliadenilat de mucosa intestinal de conill en oòcits, de l'expressió funcional N2, selectiva per pirimidines i adenosina (Jarvis and Griffith, 1991). Es va observar que aquest sistema transportava timidina de manera saturable i inhibible per uridina i citidina, però no per guanosina, coincidint així amb el sistema expressat per enteròcits intactes i vesícules de membrana. Posteriorment, es va demostrar l'expressió funcional de N2 en oòcits de *Xenopus laevis* per microinjecció de mRNA poliadenilat de còrtex renal humà (Gutierrez and Giacomini, 1993).

Aquest cDNA de 2.4 Kb clonat a partir de jejúnum de rata, que codificava per una proteïna transportadora de nucleòsids de 648 aminoàcids (71 Kda), es va anomenar **CNT1** (***C****oncentrative* ***N****ucleoside* ***T****ransporter* ***1***) i correspon a l'activitat funcional N2. Mitjançant tècniques convencionals de *Northern Blot*, es va detectar, en un inici, la seva presència en ronyó i jejúnum, però no en cor, cervell, pulmó, fetge ni múscul esquelètic. Anàlisis més sensibles de RT-PCR van permetre la seva detecció en mostres de cervell de rata (Anderson et al., 1996). Amb la posterior clonació del seu ortòleg humà, el CNT1 de rata va passar a denominar-se **rCNT1** (***r****at* ***C****oncentrative* ***N****ucleoside* ***T****ransporter* ***1***).

A partir de ronyó humà i mitjançant tècniques de clonació per homologia, es van aïllar tota una sèrie de cDNAs que codifiquen per les isoformes humanes de CNT1 (hCNT1a i hCNT1b) (Ritzel et al., 1997). hCNT1 consta de 650 aminoàcids, amb un 83% d'identitat respecte la seqüència aminoacídica de rCNT1. hCNT1b presenta més d'un 99% d'homologia amb hCNT1a i es creu que aquestes diferències podrien ser

degudes a un polimorfisme gènic, sense afectar l'activitat de transport. El gen s'ha mapat en el cromosoma 15q25-26. Posteriorment a la realització d'aquests estudis, en el nostre grup de recerca es va clonar un cDNA diferent a partir de fetge fetal humà. Aquesta nova seqüència podria ser el resultat d'un processament alternatiu de RNA o bé causa de la utilització de diferents promotors del gen hCNT1 (Mata et al., 2001). Recentment, s'ha observat que la substitució del residu Phe^{316}, situat en el setè domini transmembrana, per a Ala o Tyr produeix un increment de la sensibilitat d'inhibició per guanosina, tot i que no provoca canvis de l'activitat de transport de hCNT1. Addicionalment, mitjançant el genotipat de l'exó 11 de hCNT1 en un ampli nombre de mostres de DNAs humans s'ha trobat una nova variant que conté un canvi en aquest residu, essent His^{316} en comptes de Phe^{316} i la seva expressió en cèl·lules MDCK reprodueix el mateix efecte d'inhibició per guanosina. Els autors suggereixen que l'activitat de transport N4, observada en epiteli renal, podria ser una variant del transportador hCNT1 en la posició Phe^{316} (Lai et al., 2005).

En un principi es creia que l'expressió dels transportadors concentratius, a diferència dels equilibratius, es limitava a epitelis especializats. En efecte, CNT1 es va identificar inicialment en fetge, intestí prim i ronyó, però recentment també s'han detectat baixos nivells de mRNA i de proteïna en la majoria de teixits (Felipe et al., 1998; Valdés et al., 2000; Ngo et al., 2001).

- **CNT2 (SCLA28A2)**

Che i col·laboradors (1995) van clonar un sistema dependent de sodi i preferent per purines a partir de fetge de rata, corresponent a l'activitat descrita com N1. Utilitzant la mateixa estratègia d'expressió en oòcits de *Xenopus laevis*, es va obtenir un cDNA de 2.9 Kb que codificava pel transportador hepàtic i que inicialment es va anomenar **SPNT** (***S**odium-dependent **P**urine **N**ucleoside **T**ransporter*), tot i que posteriorment es va rebatejar com **rCNT2** (***r**at **C**oncentrative **N**ucleoside **T**ransporter **2***). La seqüència nucleotídica prediu una proteïna de 659 aminoàcids (72 KDa).

A partir de ronyó humà i també mitjançant clonatge per homologia Wang i col·laboradors (1997) van identificar l'homòleg humà de **rCNT2**, denominat en aquell moment hSPNT1. Aquesta proteïna de 658 residus aminoacídics és un 81% idèntica a l'ortòleg de rata, tot i que difereix marcadament d'aquest en l'estructura primària de l'extrem amino-terminal a més de presentar un element repetitiu en la regió 3' no

traduïda del cDNA. Paral·lelament a aquests estudis, Ritzel i col·laboradors (1998) van clonar i caracteritzar funcionalment el transportador corresponent a l'activitat funcional N1 a partir d'intestí prim humà, i el van anomenar **hCNT2**. Aquesta proteïna és idèntica a l'anterior, hSPNT1, exceptuant un polimorfisme en el residu 75 (Arg per Ser) i per tant es considera la mateixa isoforma, la qual a partir d'aquest punt denominarem hCNT2. Aquesta proteïna presenta un 72% d'homologia respecte hCNT1 i un 83% amb l'ortòleg de rata. S'han detectat transcrits de hCNT2 en un gran nombre de teixits humans com ronyó, cor, fetge, intestí, múscul esquelètic i pàncrees, fet que podria reflectir la importància d'aquest transportador en la recuperació de nucleòsids procedents de la dieta o d'altres fonts externes. El gen corresponent ha estat localitzat en el cromosoma 15 (Wang et al., 1997).

Posteriorment, una estratègia basada en la tècnica de PCR va permetre aïllar 2653 pb d'un cDNA que codificava per la corresponent isoforma murina mCNT2, la seqüència proteïca de la qual presenta un 93% i un 80% d'identitat amb rCNT2 i hCNT2 respectivament. La transfecció transitòria d'aquest cDNA en cèl·lules COS-1 és coherent amb l'activitat de transport d'uridina N1. El gen de mCNT2, d'aproximadament 13.7 Kb, consta de 15 exons i ha estat mapat en el cromosoma de ratolí 2e3 mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* (Patel et al., 2000).

- **CNT3 (SLC28A3)**

El darrer dels transportadors de nucleòsids concentratius clonats fins el moment és el corresponent a l'activitat funcional N3. En un inici, quan es van clonar els cDNAs humà i murí, degut a la baixa similitud de seqüència amb les famílies dels transportadors CNTs i ENTs i a estudis cinètics inicials en oòcits de *Xenopus* (el transport concentratiu d'uridina era de 7-25 vegades menor respecte el transportador en cèl·lules HL-60), es va pensar que el veritable substrat fisiològic d'aquest transportador no era de naturalesa nucleosídica. Tenint en compte aquest precedent, així com les evidències que descriuen l'activitat N3 en plexe coroideu de conill (Wu et al., 1994), oòcits de *Xenopus laevis* microinjectats amb mRNA de jejúnum de rata (Huang et al., 1993), cèl·lules de leucèmia humana (Vijayalakshmi et al., 1992) i cèl·lules de microglia de rata (Hong et al., 2001), es van buscar entitats del tipus CNT com a potencials representants d'aquest sistema de transport. Això ha portat a la identificació d'ESTs (*Expressed Sequences Tags*) les quals codifiquen per regions,

parcialment solapades, corresponents a l'extrem carboxi-terminal del nou CNT humà, diferent de hCNT1/2 i no identificat prèviament.

El cDNA corresponent a la seqüència completa d'aquest transportador potencial s'ha obtingut mitjançant tècniques de 5'-RACE i RT-PCR a partir de missatger de cèl·lules HL-60 diferenciades amb ésters de forbol (PMA), que constitueixen una font definida d'activitat N3, i de glàndula mamària, que va ser l'origen d'un dels ESTs identificats. El cDNA obtingut codifica per una proteïna de 691 aminoàcids (77Kda) que s'ha atribuit a **hCNT3** i que ha permès, addicionalment, identificar els ESTs corresponents a l'extrem carboxi-terminal de la isoforma murina, a partir de glàndula mamària de ratolí. En aquest cas, la seqüència completa es va obtenir a partir de fetge i codifica per una proteïna, **mCNT3**, de 703 aminoàcids (Ritzel et al., 2001b). En concordança amb la resta de CNTs, ambdues isoformes mantenen una homologia entre elles del 79% però presenten una pobre similitud estructural amb hCNT1 i hCNT2 (48 i 47% en la seva estructura primària) amb diferències marcades majoritàriament en els extrems. L'anàlisi d'expressió gènica de hCNT3 revela la presència del seu mRNA en intestí prim, medul·la òssia, pàncrees, glàndula mamària, tràquia, próstata, fetge, ronyó, cor i cervell. El gen d'aquest transportador es troba en el cromosoma 9q22.2 (Ritzel et al., 2001a).

- **Estructura i determinant moleculars de l'especificitat dels CNTs.**

Estudis teòrics desenvolupats en base a la recent generació d'anticossos apunten cap a una nova predicció de 13 dominis transmembrana, a diferència de la primera topologia de 14 dominis transmembrana predita (Felipe et al., 1998). L'evidència principal és l'obtenció de dues bandes en *Western Blot* de membranes d'oòcits injectades amb el mRNA de rCNT1, la mobilitat de les quals augmenta amb el tractament d'endoglicosidasa-F. Aquest fet és indicador de com a mínim una N-glicosilació que, suggereix la presència d'un domini carboxi-terminal extracel·lular i, per tant, una topologia de 13 hèlix transmembrana. Posteriorment, es va definir la distribució subcel·lular i la topologia de rCNT1 (Hamilton et al., 2001). Inequívocament, una o ambdues de les $Asn^{605/648}$ situades a l'extrem carboxílic de la proteïna estarien glicosilades, fet que indica la seva ubicació en l'espai extracel·lular. Els llocs potencials de N-glicosilació a l'extrem amino-terminal o entre els dominis transmembrana 4 i 5 es mantindrien sense cadenes d'oligosacàrids. El model topològic actual de la família dels CNTs constaria de tretze dominis transmembrana amb estructura hèlix alfa units per

seqüències curtes hidrofíliques (< 22 residus), dos extrems llargs N-terminal i C-terminal, essent el primer intracel·lular i el segon extracel·lular i susceptible de N-glicosil·lació (Hamilton et al., 2001), i diferents llocs consens de fosforilació per les proteïnes quinases A i C i la caseina quinasa II.

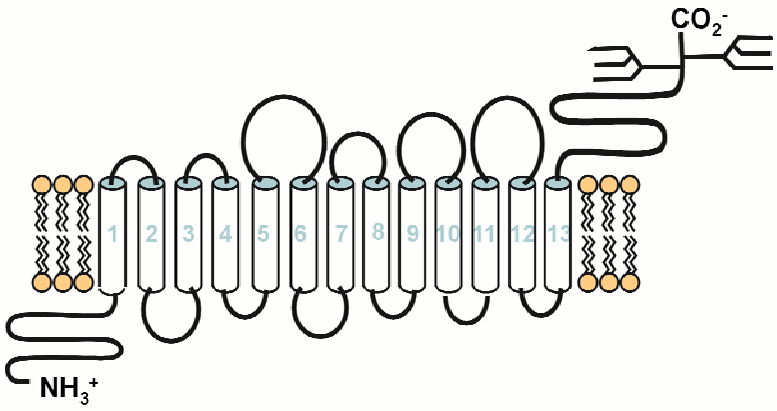

Figura 3. Estructura secundària predita de la família gènica de transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs).

Els dominis estructurals involucrats en el reconeixement i en la unió dels sustrats, així com els determinants moleculars responsables de la diferent selectivitat de transport, han estat identificats mitjançant la generació de quimeres a partir dels transportadors de rata clonats, rCNT1 i rCNT2. Es va observar que la substitució dels dominis transmembrana 8 i 9 de la isoforma rCNT1 pels de la isoforma rCNT2 convertien el transportador pirimidino-preferent en un transportador selectiu per purines. Tanmateix, si només es transfereix el domini transmembrana 8, la quimera mostra una àmplia especificitat de substrat aproximant-se al que seria l'activitat de transport N3 (Wang et al., 1997). Com que entre els dominis transmembrana 8 de rCNT1 i rCNT2 únicament existeix una diferència de 5 residus, la substitució puntual dels diferents residus ha permès identificar els aminoàcids crítics responsables de la selectivitat de substrat (Wang and Giacomini 1999a; 1999b). Anàlogament i mitjançant l'ús de diverses tècniques, s'han identificat els aminoàcids responsables de l'especificitat de substrat de les isoformes humanes, que han resultat ser equivalents. Així, la substitució de la Ser^{319} del domini transmembrana 7 de hCNT1 per la Gly ^{313}, equivalent de hCNT2, possibilita el transport de purines i converteix el sistema N2 en un sistema N3. El canvi addicional de la Ser^{353}, en el domini transmembrana 8 d'hCNT1, per la Thr^{347} corresponent de hCNT2, converteix la nova activitat N3 en una del tipus N1. La substitució dels residus adjacents de hCNT1, Gln^{320} i Leu^{354}, pels seus equivalents en hCNT2 augmenta l'activitat de transport i posa de manifest la seva implicació probable en l'empaquetament de les hèlix (Loewen et al., 1999).

Els transportadors concentratius de nucleòsids estan codificats per una nova família de gens no relacionada amb altres famílies conegudes de transportadors. Des de 1994, en què es va clonar el primer CNT (Huang et al., 1994), s'han identificat més de 40 membres de la família dels SLC28 tant en eucariotes com en procariotes. A més dels transportadors de nucleòsids concentratius de mamífers que han estat estudiats extensament els darrers anys, NupC (*Escherichia coli*) (Craig et al., 1994), CeCNT3 (*C.elegans*) (Xiao et al., 2001), i hfCNT (*Eptatretus stouti*) (Yao et al., 2002a) també han estat clonat i caracteritzats. Tot i que *E.coli* expressa dos transportadors de nucleòsids, NupC i NupG, només NupC presenta similaritat de proteïna amb la família de CNTs. NupC transporta tots els nucleòsids naturals excepte guanosina i és dependent d'un gradient de protons. CeCNT3, també transporta la majoria de nucleòsids a excepció de la citidina i és dependent tant del gradient de protons com del de sodi. El darrer clonat, hfCNT, és un transportador d'àmplia especificitat de substrat com CNT3 i tots dos han estat classificats dins d'una subfamília gènica dels CNTs, diferent a la que pertanyen CNT1 i CNT2.

2.3. TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN EPITELIS ABSORTIUS I REABSORTIUS.

Els primers estudis funcionals en preparacions de teixit animal van suggerir la presència de múltiples sistemes de transport de nucleòsids en l'epiteli renal, tant sodi-dependents com sodi-independents. Williams i Jarvis (1990) van descriure en vesícules de vora en raspall de ronyó de rata la presència de dos sistemes de transport dependents de sodi que es diferenciaven segons la seva especificitat de substrat, es tractava del sistema N1 i el sistema N2. Aquests transportadors concentratius també van ser descrits pels mateixos autors en vesícules de membrana de vora en raspall de ronyó boví (Williams and Jarvis, 1991). D'altra banda, en vesícules de membrana de vora en raspall de ronyó humà, Gutiérrez i Giacomini (1993) van identificar com a únic sistema transportador de nucleòsids un sistema concentratiu selectiu per determinades purines i pirimidines. Aquest sistema de transport anomenat N4 no ha estat descrit per altres autors i recentment s'ha suggerit que podria ser una variant gènica del transportador CNT1 (Lai et al., 2005).

El transport de nucleòsids també ha estat caracteritzat en vesícules de membrana plasmàtica de vora en raspall d'intestí de rata i de jejúnum humà. Per estudi de captació de guanosina i timidina tritiada i inhibició per nucleòsids no marcats,

s'ha demostrat la presència dels dos transportadors concentratius majoritaris N1 i N2 (Patil and Unadkat, 1997). Els mateixos autors, en microinjectar mRNA provinent de jejúnum humà en oòcits de *Xenopus laevis*, van expressar dues activitats concentratives, N1 i N2, i dues activitats equilibratives, *es* i *ei*. Aquests resultats suggerien una localització de les activitats concentratives a la membrana apical dels enteròcits, i en canvi una localització basolateral en el cas de les entitats equilibratives, permetent així un transport vectorial de nucleòsids del lumen a la sang (Chandrasena et al., 1997).

Tant en l'epiteli intestinal com en el renal s'han detectat els transcrits dels tres transportadors concentratius clonats (CNT1, CNT2, i CNT3), així com dels equilibratius ENT1 i ENT2. Segons els nivells de mRNA semblaria que CNT1 i CNT3 són més abundants en ronyó, fet que concordaria amb els assajos funcionals realitzats, i en canvi a l'intestí l'expressió de hCNT2 seria 20 cops superior a la de la resta de transportadors (Shin et al., 2003). La recent generació d'anticossos específics d'aquests transportadors ha permès la detecció de les proteïnes mitjançant tècniques de *Western Blot* i immunohistoquímica (Valdés et al., 2000; Mata et al., 2001; Guillen-Gómez et al., 2004). D'aquesta manera s'ha pogut identificar la presència de rCNT1 exclusivament a les membranes de vora de raspall de les cèl·lules epitelials absortives tant intestinals com renals sense detectar-se marcatge a la membrana basolateral (Valdés et al., 2000; Hamilton et al., 2001).

Tant els estudis funcionals com la detecció de les diferents isoformes semblen indicar que els transportadors concentratius s'expressen a la membrana apical i en canvi els equilibratius estarien principalment localitzats a la membrana basolateral (Lee et al., 1988; Patil and Unadkat, 1997; Scharrer and Grenacher, 2001; Hamilton et al., 2001), tot i que en aquest segon cas hi ha certes controversies entre diferents autors (Ciruela et al., 1994; Franco et al., 1990). Addicionalment, la generació i expressió de diferents isoformes de transportadors de nucleòsids marcades amb fluorescència (*Green/Yellow Fluorescent Protein*) han corroborat aquests resultats. Així, estudis realitzats en cèl·lules MDCK, un model d'epiteli renal, establement transfectades amb les diferents isoformes marcades han corroborat el fet que l'expressió dels transportadors concentratius hCNT1 i hCNT2 es troba restringida o és predominant a la membrana apical respectivament(Mangravite et al., 2001; Lai et al., 2002). Aquest petita diferència de distribució entre les dues isoformes concentratives suggereix que els dos transportadors han de presentar mecanismes de tràfic i direccionament

diferents. Tot i que alguns estudis preliminars semblaven indicar que la glicosilació afectava l'expressió a membrana del transportador hCNT2, la generació de formes mutades d'aquest proteïna en els tres únics punts de glicosilació de la proteïna han demostrat, contràriament al què es pensava, que aquests residus no són essencials per a la localització específica del transportador (Mangravite et al., 2003a). Al contrari dels anteriors, els transportadors equilibratius es troben majoritàriament situats a la membrana basolateral (Mangravite et al., 2003b; Lai et al., 2002), tot i que també es pot detectar una petita quantitat d'ENT1 a la membrana apical de les cèl·lules MDCK.

La localització subcel·lular específica de les diferents famílies de transportadors suggereix la possibilitat d'un transport vectorial transepitelial, tot i que aquesta hipòtesi podria semblar controvertida ja que el metabolisme intracel·lular de nucleòsids és extremadament ràpid per a permetre aquest flux des de la membrana apical a la basolateral. No obstant, estudis funcionals en cèl·lules MDCK polaritzades expressant els transportadors ENT1 i CNT1 han posat de manifest que existeix un flux net de nucleòsids i que aquest depèn de la naturalesa del substrat. Així, el flux net d'adenosina sembla anar des del compartiment apical al basolateral, i el canvi la desoxiadenosina es transportaria majoritàriament en sentit contrari, des del basolateral a l'apical. És a dir que existiria un transport vectorial en les dues direccions i aquest semblaria dependre de l'activitat relativa (relació entre activitat màxima i afinitat) dels transportadors presents a cadascuna de les membranes pels seus substrats (Lai et al., 2002).

Els transportadors de nucleòsids, com altres tipus de transportadors, són farmacològicament importants ja que permeten el transport de molts fàrmacs clínicament rellevants. Aquests transportadors es localitzen a la membrana plasmàtica de molts tipus cel·lulars, i són crítics en la captació de derivats de nucleòsids usats en teràpies antivíriques i del càncer, així com també determinen els efectes terapèutics i tòxics d'aquests compostos. Addicionalment, CNTs i ENTs semblen jugar un paper en la farmacocinètica a nivell sistèmic dels anàlegs de nucleòsids ja que els transportadors expressats en els epitelis intestinals, renals i en el fetge poden mitjançar l'absorció sistèmica i la biodisponibilitat d'aquests fàrmacs.

2.4. TRANSPORT DE FÀRMACS DERIVATS DE NUCLEÒSIDS.

2.4.1. Paper terapèutic dels fàrmacs derivats de nucleòsids.

Els nucleòsids poden ser modificats estructuralment per tal de generar derivats farmacològicament actius. Aquests compostos terapèutics mimetitzen els compostos parentals dels quals deriven en la manera com són transportats i metabolitzats a l'interior de la cèl·lula. Com a resultat d'aquesta metabolització, els derivats de nucleòsids interfereixen en la síntesi de DNA promovent efectes antiproliferatius i/o resistència a la replicació vírica de les cèl·lules infectades. Aquest és el fonament per a l'ús dels derivats de nucleòsids en el tractament de la SIDA i en teràpies del càncer. Addicionalment molts d'aquests compostos inhibeixen alhora enzims claus del metabolisme dels nucleòtids i la síntesi de RNA. Tots aquests efectes acaben provocant la mort cel·lular (Pastor-Anglada et al., 1998a)

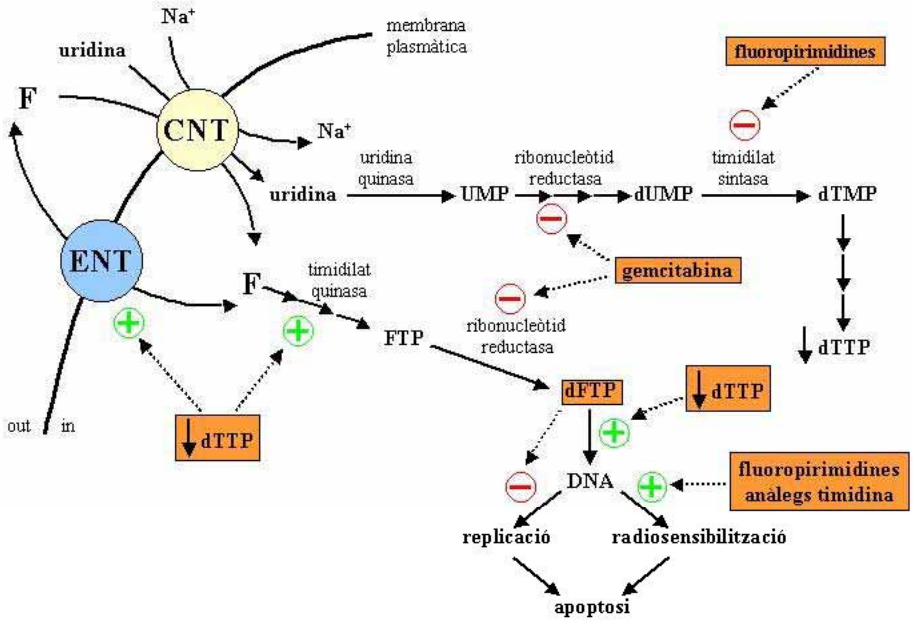

Figura 4: Entrada de fàrmacs derivats de nucleòsids i possibles funcions citotòxiques d'aquestes molécules. Els fàrmacs (F) derivats de nucleòsids són internalitzats dins la cèl·lula mitjançant els mateixos transportadors que els substrats naturals. La majoria de fàrmacs exerceixen la seva acció inhibint enzims claus en el metabolisme nucleotídic.

La base molecular d'aquest procés format bàsicament per tres etapes (captació, activació metabòlica i acció farmacològica) presenta encara força interrogants ja que la bioassequibilitat d'aquests fàrmacs i en conseqüència la seva acció recau en la seva translocació a través de la membrana plasmàtica. El fet que els transportadors responsables de la captació dels derivats de nucleòsids no hagin estat clonats fins recentment ha contribuït al desconeixement de les bases moleculars d'aquest procés.

2.4.2. Principals fàrmacs usats en quimioteràpia antitumoral i antiviral.

- **Fàrmacs antivírics.**

Actualment la millor teràpia per al tractament de la SIDA és l'anomenada teràpia combinada que inclou inhibidors del virus VIH, de la transcriptasa reversa i de proteases (Collier et al., 1996). Alguns dels inhibidors de la transcripció reversa del virus són anàlegs de nucleòsids, concretament 2',3'-dideoxinucleòsids. La Zidovudina o AZT va ser el primer d'una llista creixent d'anàlegs de nucleòsid usats en el tractament de la SIDA entre els quals es troben la Stavudina, la 2'3'-dideoxiinosina, la 2'3'-dideoxiadenosina i la 2'3'-dideoxicitidina o Zalcitabina. Totes aquestes molècules requereixen la seva activació fins a la forma trifosfat per a poder ser incorporades a la cadena de DNA creixent, aturant així la síntesi del DNA víric. La bioassequibilitat dels metabolits activats pot estar limitada també per una ineficient fosforilació dels nucleòsids o nucleòtids. Cal destacar que l'elevada toxicitat associada a aquests fàrmacs deriva entre altres causes, de l'acció inhibitòria exercida sobre la replicació i reparació mitocondrial, així com les alteracions provocades sobre cèl·lules del sistema immune i hematopoiètic (Agarwal and Olivero, 1997; Phillips and Munson, 1997).

Sistemes concentratius

	Droga transportada	Ref.
hCNT1	AZT (zidovudina) d4T (stavudine)	(Ritzel et al., 1997)
hCNT3	AZT (zidovudina) ddC (zalcitabina) ddI (didanosina)	(Ritzel et al., 2001b)

Sistemes equilibratius

	Droga transportada	Ref.
hENT1	ddC (zalcitabina) ddI (didanosina)	(Yao et al., 2001)
hENT2	AZT (zidovudina) ddC (zalcitabina) ddI (didanosina)	(Yao et al., 2001)

Taula 2. Fàrmacs antivírics i transportadors de nucleòsids amb els que interactuen.

- **Fàrmacs antitumorals.**

Molts dels fàrmacs usats en la quimioteràpia del càncer són també anàlegs de nucleòsids. Aquests compostos poden ser citotòxics per se o poden sensibilitzar les cèl·lules tumorals a la radiació mitjançant l'alteració del seu metabolisme de nucleòsids (McGinn et al., 1996). Essencialment, aquests anàlegs són fluoropirimidines, derivats de timidina, derivats de purines i derivats de nucleobases. Tots ells comparteixen característiques comuns com la internalització a través dels transportadors de membrana, l'activació per quinases com la desoxicitidina quinasa (dCK) i la desfosforilació per la 5'-nucleotidasa. Tanmateix, presenten individualment propietats específiques que expliquen les variacions observades en el tractament de les diferents patologies.

Sistemes concentratius

	Droga transportada	Ref.
hCNT1	gemcitabina 5´-DFUR citarabina	(Mackey et al., 1999; Lostao et al., 2000; Mata et al., 2001; Galmarini et al., 2002)
hCNT3	cladribina fludarabina gemcitabina	(Ritzel et al., 2001a)

Sistemes equilibratius

	Droga transportada	Ref.
hENT1	gemcitabina citarabina fludarabina cladribina	(Avery et al., 1989; Jamieson et al., 1989; Gati et al., 1997; Mackey et al., 1999; Galmarini et al., 2002a)
hENT2	gemcitabina fludarabina cladribina citarabina	(Mackey et al., 1998; Ward et al., 2000; Galmarini et al., 2002a)

Taula 3. Fàrmacs antineoplàsics i transportadors de nucleòsids amb els que interactuen.

Entre els anàlegs pirimidínics es troben les fluoropirimidines, que s'utilitzen habitualment en el tractament de càncers humans, principalment càncers gastrointestinals, de pit i d'ovari, i exerceixen la seva acció farmacològica a través de la inhibició de la timidilat sintasa (TS). Mitjançant la inhibició d'aquest enzim, responsable de la conversió de dUMP a dTMP, provoquen una depleció del *pool* de les formes fosforilades dels desoxitimidilats (dTMP, dTDP, dTTP) i això dirigeix les cèl·lules cap a l'apoptosi (Bouffard and Momparler, 1995). Aquests compostos també poden sensibilitzar les cèl·lules tumorals a la radiació per arrest cel·lular a les primeres etapes de la fase S. En essència, les fluoropirimidines s'aprofiten de les diferències intrínseques de progressió en el cicle cel·lular entre les cèl·lules normals i les cèl·lules tumorals (Mc Ginn, 1994). La gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicitidina) o dFdC és un dels agents més prometedors en la teràpia de tumors sòlids. Com en la majoria de casos, la forma activa correspon a la forma fosforilada dFdCTP, que s'incorpora a la cadena de DNA induint el fenomen conegut com *masked DNA chain termination* (Huang et al., 1991*)*. Una vegada la dFdCTP s'incorpora al DNA, encara s'uneix un darrer desoxinucleòtid, d'aquesta manera la gemcitabina queda emmascarada i protegida dels enzims de reparació del DNA. A més, proporciona un avantatge addicional respecte altres fàrmacs ja que actua inhibint la ribonucleòtid reductasa,

deplecionant els *pools* de dNTPs i afavorint encara més la seva acció antiproliferativa (Huang et al., 1991; 1995).

De manera similar, els anàlegs d'uridina com la bromodesoxiuridina i la iododesoxiuridina són incorporats al DNA després de ser activats per fosforilació, aprofitant la capacitat intrínseca de deplecionar els *pools* de dTTP com a conseqüència de la inhibició de la ribonucleòtid reductasa (Shewach et al., 1992).

La citarabina o ara-C (arabinosilcitosina) és un anàleg estructural de la desoxicitidina no fluorat i un dels compostos més eficaços en el tractament de malalties limfoproliferatives (leucèmies agudes i limfomes). Una vegada a l'interior de la cèl·lula és fosforilada per la desoxicitidina quinasa (dCK), formant-se la forma activa. L'ara-CTP interfereix amb les DNA polimerases i competeix amb el *pool* intracel·lular de CTP per la incorporació al DNA. Mitjançant aquest mecanisme indueix la terminació de la síntesi, la fragmentació del DNA i l'apoptosi. Contràriament als fàrmacs anteriors, els seus metabolits no són capaços d'inhibir l'activitat ribonucleòtid reductasa (Merriman et al., 1996; Iwasaki et al., 1997; Wright et al., 2002).

La capecitabina és un dels derivats de pirimidina més recents i presenta una eficiència clínica davant un gran ventall de tumors sòlids. Es tracta d'un fàrmac que s'administra oralment i es metabolitza en el fetge; per tant actuaria com a forma precursora de la droga metabòlicament activa. L'activació metabòlica de la capecitabina requereix tres reaccions seqüencials fins a la formació del 5-fluorouracil (5-FU). Les dues primeres reaccions són catalitzades per enzims hepàtics; en canvi la darrera, és a dir la conversió de la 5'-DFUR a 5-FU, té lloc majoritàriament en els tumors, que expressen l'enzim timidina fosforilasa (Mata et al., 2001). En efecte, el nivell d'activitat d'aquest enzim a les cèl·lules tumorals podria limitar la producció de 5-FU. Tot i així, la citotoxicitat del 5-FU també depèn de l'enzim que l'inactiva, la dihidropirimidina deshidrogenasa. La relació entre els dos enzims varia segons el tipus de càncer però també és variable entre diferents pacients, podria ser doncs un criteri de selecció a l'hora de triar els pacients per administrar aquest tractament (Mata et al., 2001).

Els anàlegs púrics, derivats principalment de l'adenosina, com la Cladribina o 2-CdA (2-clorodesoxiadenosina) i la fludarabina o F-araA (fluoroarabinosiladenosina) són àmpliament utilitzats en el tractament de malignitats limfoproliferatives. En les seves

formes actives, aquests compostos tenen la capacitat d'inhibir la ribonucleòtid reductasa, provocant la depleció dels *pools* de dNTPs intracel·lulars i facilitant d'aquesta manera la seva incorporació al DNA (Iwasaki et al., 1997).

De la mateixa manera que en el cas dels anàlegs antivírics, els derivats de nucleòsids amb finalitat tumoral poden provocar tota una sèrie d'efectes secundaris, com citotoxicitat hematopoiètica i mielosupressió. Seria doncs necessari que la combinació de teràpies químiques i genètiques proporcionessin alternatives per evitar o reduir la citotoxicitat associada a aquests tipus de fàrmacs. És el cas de l'expressió dirigida de citosina desaminasa, que permet la generació d'antimetabolits tòxics intracel·lularment, evitant la toxicitat sistèmica (Hanna et al., 1997). De manera complementària, l'expressió dirigida d'aquest tipus d'enzims detoxificants podria induir, en cèl·lules normals, resistència a drogues com la citarabina durant l'hematopoiesi (Momparler et al., 1996).

Finalment existeixen altres agents usats en la teràpia del càncer que no són derivats de nucleòsids però poden interferir en el seu metabolisme i fins i tot modificar el seu transport. Antifolats com el metotrexat i els seus derivats inhibeixen la dihidrofolat reductasa, bloquejant així la generació de dUMP, que és un cosubstrat necessari de la timidilat sintasa. El tamoxifen, fàrmac usat habitualment en tumors dependents d'hormones com el càncer de pit, interfereix en el transport de nucleòsids (Cai and Lee, 1996).

2.4.3. Implicació dels NTs en la resistència als anàlegs de nucleòsids.

La resistència inherent o adquirida a la quimioteràpia i a la teràpia antivírica que presenten alguns pacients és un dels majors problemes clínics actuals. S'han descrit tota una sèrie de factors que produirien resistència als anàlegs de nucleòsids i que es podrien englobar en tres mecanismes generals. Un primer mecanisme de resistència als anàlegs de nucleòsids sorgiria d'una concentració intracel·lular insuficient de formes metabòlicament actives (formes trifosfat), l'origen de les quals pot dependre d'alteracions en els mecanismes de transport, d'una fosforilació insuficient per manca o baixos nivells d'enzims activadors i/o d'un augment de la degradació com a conseqüència de les activitats 5'-nucleotidasa i citidina desaminasa. Un segon mecanisme pot ser degut a la incapacitat per generar suficients alteracions a les cadenes de DNA o al *pools* de dNTPs a causa d'una deficient interacció anàleg/DNA

polimerasa, d'una manca d'inhibició de la ribonucleòtid reductasa o a causa dels mecanismes de resposta cel·lular davant un dany en el DNA. Finalment, la resistència a un determinat anàleg de nucleòsid pot ser conseqüència d'una inducció deficient de l'apoptosi.

Estudis realitzats tant en línies cel·lulars com en mostres clíniques recolzen la idea de que la sensibilitat o resistència a un determinat fàrmac pot ser deguda, en part, a una assequibilitat deficient per falta de la seva internalització cel·lular (Pastor-Anglada et al., 1998a; 2004). En aquest apartat es farà només referència a la presència i participació dels transportadors de nucleòsids en la permeabilització de fàrmacs derivats de nucleòsids com a pas limitant de la seva bioassequibilitat i per tant, com a possible causa de la seva resistència.

Les primeres evidències de la implicació dels transportadors de nucleòsids en l'activació dels anàlegs farmacològics i conseqüent activitat van sorgir en el 1977 a partir d'estudis realitzats en cèl·lules d'hepatoma resistents a 5-FU (Greenberg et al., 1977). Posteriorment es va demostrar que una deficiència en la difusió facilitada de nucleòsids i no en les activitats del seu metabolisme, eren determinants en la resistència a 5-FU en cèl·lules de carcinoma humà (Sobrero et al., 1985).

Molts dels estudis realitzats en aquest camp s'han portat a terme en cèl·lules del sistema immunitari. Així, en cèl·lules aïllades de leucèmies, la sensibilitat a fludarabina, ara-C i 2-CdA es correlaciona amb l'abundància d'hENT1 (Gati et al., 1998; Molina-Arcas et al., 2003). De manera similar, en cèl·lules de leucèmia mieloide aguda, s'ha suggerit una correlació entre taxes baixes de transport i respostes clíniques deficients (Wiley et al., 1982). Per altra banda, s'ha demostrat que la fludarabina i la 2-CdA, fàrmacs efectius en el tractament de malalties linfoidees, posseeixen un mecanisme alternatiu per potenciar la seva toxicitat, basat en la regulació positiva de l'expressió del transportador equilibratiu sensible *es* (Gandhi et al., 1998; Petersen et al., 1996). El sistema equilibratiu *es*, àmpliament distribuït en molts tipus cel·lulars neoplàsics, està involucrat en la captació de la majoria d'anàlegs de nucleòsids incloent la citarabina i la fludarabina (Griffiths et al., 1997a).

D'altra banda també s'ha investigat la presència i participació dels transportadors de nucleòsids concentratius en la bioassequibilitat d'un gran nombre de fàrmacs antitumorals i antivírics. Estudis realitzats en dotze línies cel·lulars humanes

amb activitats de transport de nucleòsids definides han permès demostrar que les cèl·lules deficients en aquests transportadors són resistents a gemcitabina i que el tractament amb NBTI o dipiridamol en aquelles cèl·lules que només expressen sistemes equilibratius incrementa la resistència al fàrmac. En cèl·lules transfectades amb els cDNAs que codifiquen per hCNT1 o bé per hCNT2, la gemcitabina també és incorporada a través dels sistemes dependents de sodi, existint una eficiència de captació en les cèl·lules que només posseeixen un sistema de transport de nucleòsids que varia marcadament en aquest ordre: N2>*ei*>N3>>>N1 (Mackey et al. 1998). Anàlogament, en oòcits de *Xenopus laevis* microinjectats amb el mRNA de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids també s'ha observat que la gemcitabina és transportada per la majoria dels sistemes, amb l'excepció de rCNT2 i hCNT2 (Mackey i et al., 1999; Lostao et al., 2000; Mata et al., 2001). Posteriorment, el nostre grup d'investigació va identificar el transportador responsable de la captació de 5'-DFUR (5'-desoxi-5'-fluorouridina), metabolit intermediari de la capecitabina. L'expressió heteròloga del transportador hCNT1 en oòcits de *Xenopus* i la utilització de tècniques basades en l'electrofisiologia va determinar aquest sistema de transport preferent per pirimidines com responsable de la captació de l'intermediari 5'-DFUR. Paral·lelament, la seva expressió estable en cèl·lules CHO-K1 apunta cap a una correlació entre l'expressió de hCNT1 i la sensibilitat cel·lular al tractament amb aquest intermediari (Mata et al., 2001). Recentment, també s'ha analitzat el paper d'aquest transportador en la captació de diversos anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpies antivíriques. En un model de transfecció estable i mitjançant la tècnica de voltage clamp s'ha observat que hCNT1 és capaç de transportar AZT i d4T però amb molt baixa afinitat i d'altres derivats com 3TC i ddC, tot i que s'uneixen al transportador, no són translocats. Aquests resutats demostren que petites modificacions de l'estructura dels nucleòsids, en aquest cas, la pèrdua del grup hidroxil en la posició 3 de la ribosa, produeixen canvis dramàtics en la seva captació (Cano-Soldado et al., 2004).

Anàlogament, l'expressió heteròloga del transportador rCNT2 en cèl·lules HeLa proporciona una activitat sodi-dependent inhibible per aciclovir, ddI, ddA i cladribina, sense observar-se canvis significatius en el cas de l'AZT o del ddC (Schaner et al., 1997). En un altre model, la línia cel·lular de leucèmia CEM-ARAC (deficient en transportadors de nucleòsids), l'expressió heteròloga de hCNT2 es manifesta amb la captació sodi-dependent d'uridina inhibida per adenosina i també per alguns derivats de pirimidines com la 5-fluorouridina, la 5F-2'dU i la 5'-DFUR. La 5-fluorouridina també ha estat testada com a substrat directe obtenint-se constants cinètiques similars a les

de la uridina. Aquests estudis demostren que la resistència a fàrmacs derivats de purina i pirimidina en la línia cel·lular CEM-ARAC és deguda a l'absència d'expressió dels transportadors de nucleòsids i que la introducció de hCNT2 confereix capacitat de transport de nucleòsids i sensibilitat davant els fàrmacs (Lang et al., 2001).

Existeixen nombroses evidències que corroboren el fet que molts dels fàrmacs usats en quimioteràpia són transportats a l'interior de la cèl·lula a través dels sistemes concentratius amb constants d'afinitat inferiors a les dels sistemes equilibratius. Així doncs, si el tumor posseeix CNTs, el NBTI i altres inhibidors dels sistemes equilibratius bloquegen l'efflux i, per tant, disminueixen la IC_{50} de les drogues augmentant d'aquesta manera el potencial antitumoral. En canvi, si el tumor no posseeix CNTs, les drogues han d'entrar pels ENTs i els seus inhibidors bloquegen l'influx de tal manera que el tumor es fa resistent, però ajuden a disminuir la recuperació dels nucleòsids. És a dir que es poden utilitzar inhibidors dels sistemes equilibratius com el dipiridamol o el dilazep per tal de millorar la resposta a la quimioteràpia mitjançant el bloqueig de l'efflux. Per tant, la bioassequibilitat del fàrmac depen d'una complexe regulació entre l'entrada i la sortida del fàrmac (Baldwin et al., 1999; Lostao et al., 2000).

En aquest sentit, els estudis realitzats en una soca murina de leucèmia, L1210, que expressa les activitats equilibratives *es* i *ei* i una activitat concentrativa, han demostrat que el tractament amb dipiridamol i dilazep disminueixen les taxes inicials de captació d'arabinosiladenina però en canvi provoquen una acumulació neta del fàrmac i en conseqüència un augment de la toxicitat mitjançant el bloqueig de l'efflux degut al sistema equilibratiu (Dagnino and Paterson, 1990). També s'ha estudiat l'habilitat d'aquests agents alhora d'augmentar la toxicitat d'exposicions *in vitro* a fluoropirimidines. Grem i col·laboradors (1989) van descriure que el dipiridamol potencia l'acció de la 5-flourouridina i del metotrexat en dues línies tumorals humanes, MCF-7 i HepG2. El dipiridamol també modula la citotoxicitat dels anàlegs de nucleòsids *in vivo*. Jakobsson i col·laboradors (1989) descriuen que l'administració conjunta de 5-FU i dipiridamol en rates en les que s'ha transplantat un adenocarcinoma en el fetge incrementa la incorporació d'aquest derivat de nucleòsids en la fracció soluble en àcids i en el RNA del fetge i del ronyó i en canvi disminueix la seva incorporació en la fracció soluble en àcids, en el RNA i en el DNA de l'intestí. S'obtenen dades similars amb un tractament conjunt de 5-fluorouridina (5-FUrd) i dipiridamol. Aquests resultats suggereixen que els inhibidors dels transportadors de membrana poden oferir protecció als teixits sans davant la citotoxicitat del 5-FU i 5-

FUrd, però també poden sotmetre certs teixits a una exposició superior. Recentment s'ha descrit un derivat del dipiridamol, el BIBW22BS, entre 20 i 100 vegades més eficient en la reversió de la resistència múltiple a drogues. S'ha estudiat l'efecte d'aquest compost en la modulació de l'acció antiproliferativa del 5-FU, el metotrexat i la gemcitabina en diverses línies cel·lulars de càncer humà. Mentre el BIBW22BS, a concentracions no tòxiques (1 μM), potencia l'efecte antiproliferatiu del 5-FU i del metotrexat, inhibeix l'acció de la gemcitabina de 30 a 100 vegades en diverses de les línies cel·lulars estudiades, probablement perquè només expressen transportadors de tipus ENT i amb l'addicció de l'inhibidor es bloqueja tant l'efflux com l'influx del fàrmac (Hansen et al.,1995).

Per altra banda, sembla existir una possible relació entre el metabolisme de nucleòsids/nucleòtids i l'expressió dels transportadors. La inhibició de la timidilat sintasa indueix l'activitat de la timidina quinasa i augmenten de 20 a 40 vegades els llocs de unió a NBTI. S'ha suggerit que l'activitat TK i l'expressió de *es* presenten un mecanisme de regulació comú que dependria del *pool* de dTTP intracel·lular (Pressacco et al., 1995). Dins d'aquest context s'ha de tenir en compte que les fluoropirimidines, precisament, exerceixen la seva acció per inhibició de la TS i depleció d'aquests *pools*. En dues línies cel·lulars de càncer de pàncreas, es va fer un estudi dels efectes de la combinació d'inhibidors d'aquest enzim, com el 5-FU i el raltitrexed, i la gemcitabina. Es va observar un efecte màxim de l'acció de la gemcitabina quan es feia un pretractament amb inhibidors de la TS. Així doncs la modulació dels transportadors *es* mitjançant un pretractament amb inhibidors d'aquest enzim millora el benefici terapèutic de la gemcitabina (Rauchwerger et al., 2000).

Malgrat aquestes observacions, la rellevància farmacològica de la falta o deficiència de determinats tipus de transportadors de nucleòsids com causa directe de certs tipus de resistència *in vivo* no està del tot establerta. Això és degut, en part, a la dificultat intrínseca que suposa fer estudis de transport sobre mostres clíniques i les dificultats tècniques associades a la quantificació d'aquestes per contaminació dels clons neoplàsics amb teixit normal (Pastor-Anglada et al., 1998a; Baldwin et al., 1999; Galmarini et al., 2001). Tot i així, en els últims temps s'ha observat un interès creixent respecte la possible correlació entre sistemes de transport i sensibilitat.

En aquest aspecte, en el nostre grup de recerca s'han realitzat estudis de correlació del transport de nucleòsids en cèl·lules de pacients de leucèmia limfocítica

crònica (CLL) amb la toxicitat *ex vivo* al tractament amb fludarabina. Els resultat obtinguts mostren com l'acumulació del fàrmac, deguda quasi exclusivament a una activitat equilibrativa de transport, es correlaciona significativament amb la citotoxicitat causada pel fàrmac. Aquesta observació posa de manifest la implicació del transport equilibratiu en la resposta al tractament de pacients amb CLL *in vivo* (Molina-Arcas et al., 2003). Tot i que els nivells de missatger d'ENT1 i d'ENT2 no mostraven cap resposta predictiva al tractament, posteriorment s'ha pogut demostrar l'existència d'una clara correlació entre els nivells de proteïna d'hENT2, el transport equilibratiu de fludarabina i la sensibilitat *ex vivo* a aquest fàrmac en cèl·lules d'aquests pacients. Aquests resultats revelen el paper que juga el transportador equilibratiu hENT2 en la resposta a fludarabina dels pacients de CLL. (Molina-Arcas et al., 2005). D'altra banda, també en malalts de leucèmia limfocítica crònica, Mackey i col·laboradors han analitzat l'expressió dels diferents transportadors de nucleòsids i han relacionat una elevada expressió del missatger de hCNT3 amb resistència del pacient davant del tractament amb fludarabina; tanmateix el mecanisme roman desconegut (Mackey et al., 2005).

Actualment, i donat que el transport a través de la membrana plasmàtica pot determinar la citotoxicitat a determinats fàrmacs suggerint la importància clínica dels patrons d'expressió dels transportadors de nucleòsids, s'estan duent a terme, en el nostre grup de recerca, estudis de correlació en diferents teixits. Els nivells de missatger de CNTs i ENTs són altament variables en tumors humans (Pennycooke et al., 2001), a més, en models animals de carcinogènesi s'ha observat una pèrdua selectiva dels transportadors concentratius (Dragan et al., 2000). Més recentment, s'ha establert que els nivells d'expressió proteica d'ENT1 i ENT2 es mantenen més en tumors que els de CNT1, i en efecte la pèrdua selectiva d'expressió de CNT1 en tumors ginecològics es correlaciona amb els histotips que presenten pitjor prognosi (Farré et al., 2004). En un altre tipus de tumor, l'adenocarcinoma de pàncreas, s'ha establert una correlació entre l'expressió d'hENT1 i la supervivència dels pacients després d'un tractament amb gemcitabina (Mackey et al., 2002).

Avui en dia, la quimioteràpia, juntament amb la radioteràpia, és en molts casos l'únic tractament factible en un gran nombre de neoplasies. És per això necessari aprofundir en els mecanismes mitjançant els quals actuen aquests fàrmacs i la seva implicació en l'aparició de resistències amb la finalitat de poder millorar i dissenyar noves teràpies. Addicionalment, el fet que els transportadors de nucleòsids puguin

relacionar-se amb el procés de desdiferenciació i progressió tumoral els converteix en potencials candidats com marcadors primerencs de carcinogènesi.

3. REGULACIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.

Com la majoria de sistemes de transport, és lògic pensar que els transportadors de nucleòsids, degut al paper fonamental que exerceixen en el control de les concentracions de nucleòsids intra- i extracel·lulars i en el manteniment dels *pools* nucleotídics, han d'estar regulats per un ampli ventall d'elements que poden incloure des d'hormones i factors de creixement, fins efectors nutricionals o progressió en el cicle cel·lular. Malgrat que els estudis realitzats al respecte encara són pocs i dispersos, ja que l'interès s'ha centrat principalment en la clonació i caracterització de les diferents isoformes, gràcies a l'aparició recent de noves eines moleculars, la regulació d'aquestes proteïnes de membrana s'està començant a conèixer amb més detall.

3.1. DIFERENCIACIÓ I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.

Una de les primeres evidències d'una possible regulació dels transportadors concentratius de nucleòsids va sorgir en observar un augment del transport d'uridina depenent de sodi en vesícules de membrana de fetge poc després d'una hepatectomia parcial, just abans de la progressió de les cèl·lules en la transició de les fases G1 i S (Ruiz-Montasell et al., 1992). Es demostrà, mitjançant experiments de *Northern blot*, que aquest augment de l'activitat del transport sodi-dependent de nucleòsids detectat en vesícules de membrana de rates hepatectomitzades s'associava a l'acumulació dels nivells de mRNA de CNT2 (Felipe et al., 1997). Anàlogament, estudis realitzats en cèl·lules derivades d'hepatoma de rata (FAO) van suggerir una associació entre la progressió en el cicle cel·lular i l'expressió de la isoforma CNT2. Així, les cèl·lules FAO induïdes a proliferar després d'una sincronització per privació de sèrum mostren un augment de mRNA de rCNT2 just abans de l'augment exponencial de la incorporació de timidina tritiada en el DNA (del Santo et al., 1998). En aquest model també s'ha observat un mateix patró d'expressió per la proteïna ENT2, però en canvi ENT1 no modifica els seus nivells d'expressió. Aquestes observacions van suggerir per primera vegada la possibilitat d'una regulació diferencial d'aquests sistemes de transport en un mateix tipus cel·lular.

De manera similar a la proliferació hepàtica, la diferenciació dels hepatòcits també pot determinar l'expressió dels CNTs i dels ENTs. Del Santo i col·laboradors (2001) van descriure que els hepatòcits fetals, cèl·lules altament replicatives, presenten una major activitat basal de transportadors equilibratius si es comparen amb els hepatòcits neonatals o els hepatòcits adults. Una fracció significativa de l'activitat equilibrativa en hepatòcits fetals és deguda al sistema *es*, en canvi en hepatòcits neonatals (també altament proliferatius) la major part de l'activitat és insensible a NBTI. Aquests resultats suggereixen que la diferenciació modula el patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en hepatòcits. S'han fet estudis posteriors en cultius d'hepatòcits fetals induint la seva diferenciació mitjançant l'addició d'hormones com la dexametasona i la hormona tiroïdal T_3 i s'ha comprovat que l'expressió de CNT2, tant de la proteïna com del mRNA, incrementa de manera que el perfil de transportadors d'aquestes cèl·lules s'acosta al de l'hepatòcit adult (del Santo et al., 2001).

La hipòtesi de que la diferenciació determina el patró de transportadors de nucleòsids de l'hepatòcit i que la proliferació activa té lloc quan els sistemes equilibratius són els components majoritaris de l'activitat de transport és corroborada pel fet que la línia cel·lular FAO (hepatoma de rata) sobreexpressa ENT1 i ENT2 però no CNT2 (del Santo et al., 1998). Posteriorment s'ha comprovat que aquest fet no és exclusiu d'aquesta línia cel·lular, ja que també pot tenir lloc en cultius primaris de cèl·lules parenquimals hepàtiques. Dragan i col·laboradors han descrit una pèrdua selectiva de les isoformes de CNTs en dos models d'hepatocarcinogènesi en rata, induïts químicament i per manipulació genètica. Anàlogament, l'estudi de dues línies cel·lulars derivades del fetge d'una rata transgènica, L25 aïllada a partir de la lesió tumoral i L37 derivada del parènquima hepàtic aparentment sa, mostren els mateixos resultats. La línia cel·lular L25 no expressa CNT1 i, al contrari, L37 conserva l'expressió de les dues isoformes CNT1 i CNT2. En efecte, l'hepatocarcinogènesi comportaria una pèrdua selectiva o una expressió disminuïda de determinades isoformes de transportadors de nucleòsids (Dragan et al., 2000).

Dins el marc de la tesi doctoral de la Dra. Sonia Fernández-Veledo, s'ha observat que l'expressió dels diferents transportadors de nucleòsids varia de manera diferencial al llarg del temps de cultiu en hepatòcits humans. Així, s'observa una pèrdua molt significativa dels nivells d'expressió dels transportadors concentratius CNT1 i CNT2 i del transportador equilibratiu ENT2 i en canvi es mantenen els nivells

d'expressió del transportador ENT1 (Fernández-Veledo et al., enviat). De la mateixa manera es va analitzar l'expressió dels diferents transportadors en dues línies cel·lulars humanes derivades d'hepatoma, BC2 i HepG2, observant-se una disminució de les isoformes concentratives respecte els nivells d'expressió en fetge fresc. D'altra banda el procés de diferenciació de les cèl·lules BC2 (aquestes cèl·lules després de 28 dies en cultiu presenten característiques morfològiques pròpies dels hepatòcits en cultiu) indueix un increment progressiu dels nivells de missatger del transportador CNT1 que es tradueix en una aparició o increment del transport de citidina dependent de sodi. Aquests resultats corroboren el fet que l'expressió de CNT1 es troba íntimament associada a la diferenciació cel·lular. Addicionalment, també es van analitzar els mecanismes moleculars responsables de l'expressió hepàtica d'aquests transportadors (Fernández-Veledo et al., enviat). El fet que a mesura que les cèl·lules BC2 es diferencien en cultiu incrementi l'expressió del factor de transcripció HNF4α i que l'expressió del cDNA antisense de HNF4α mitjançant un vector adenoviral bloquegi la inducció de CNT1 al llarg d'aquest procés de diferenciació indiquen que aquest factor de transcripció juga un paper regulador en l'expressió de CNT1. Per altre banda, s'ha posat de manifest que els factors C/EBPα i HNF3γ modulen l'expressió gènica del transportador CNT2. De manera que la sobreexpressió conjunta d'aquests dos factors de transcripció indueix un increment dels nivells de missatger de CNT2 en la línia cel·lular HepG2 sense observar-se canvis en els nivells d'expressió dels altres transportadors.

Recentment, estudis de regulació en la línia cel·lular FAO sobre l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids durant la progressió en el cicle cel·lular, demostren que la inducció d'un arrest en la fase G1/S provoca una caiguda del nivells d'expressió de la proteïna CNT1. Les observacions derivades dels estudis de sincronització i inducció de la proliferació amb inhibidors com la mimosina i la hidroxiurea mostren una relació directe entre l'expressió d'aquest transportador i el cicle cel·lular, ja que la regulació de la seva expressió al llarg del temps es produeix paral·lelament a l'acumulació de proteïnes del cicle cel·lular implicades en la fase d'arrest, com la ciclina E i la ciclina A (Valdés et al., 2002). Tot i així seria necessari establir si aquest comportament obeeix realment a senyals associades al cicle celular o és conseqüència directa d'alteracions en el metabolisme nucleotídic, induïdes paral·lelament per l'ús dels inhibidors utilitzats en aquest estudi.

3.2. REGULACIÓ PER FACTORS HORMONALS I DE CREIXEMENT.

Degut a la manca d'eines moleculars els estudis de regulació dels sistemes de transport es van iniciar mitjançant anàlisis cinètiques. Al 1990, Jakobs i col·laboradors van observar que els cultius confluents de cèl·lules IEC-6, un model de cèl·lules epitelials intestinals de rata, presentaven un transport sodi-dependent d'adenosina i Formicina B superior al dels cultius poc confluents. La privació de sèrum fetal provocava una disminució de la taxa de transport de 6 a 8 vegades, efecte que es contrarestava en presència d'hormones i factors de creixement com la hidrocortisona, la insulina i l'EGF. Aquestes dades van suggerir la importància d'aquest elements reguladors en l'expressió dels sistemes de transport de nucleòsids.

De manera similar, en el nostre laboratori es va observar que la privació de sèrum produïa una inducció dels nivells de proteïna dels transportadors CNT1 i CNT2 en cèl·lules FAO. Així doncs a partir de les 2 hores de privació s'observa un increment d'expressió dels dos transportadors concentratius que es manté al llarg de 48h (Valdés et al., 2002).

- **Cèl·lules del sistema immunitari.**

Un dels models cel·lulars d'interès terapèutic amb el que s'han aportat evidències sobre la regulació d'aquests transportadors són les cèl·lules del sistema immunitari. El sistema immunitari engloba una família de tipus cel·lulars molt heterogènia que presenten funcions altament específiques. Segons els requeriments funcionals, són activades o induïdes a proliferació, el que podria implicar una regulació diferencial dels transportadors de nucleòsids. A més, aquestes cèl·lules són totalment dependents de les vies de recuperació de nucleòsids, per això són considerades un bon model cel·lular a l'hora d'estudiar el paper fisiològic d'aquests sistemes de transport.

Existeixen evidències derivades d'estudis en cèl·lules quiescents que confirmen que el tipus de transportador expressat, així com la seva activitat de transport està modulat durant la progressió del cicle cel·lular. Així en macròfags quiescents de medul·la òssia de ratolí SI, s'observa un increment del transport d'adenosina i uridina després de l'addició del factor estimulador de colònies 1, CSF-1, que podria estar relacionat amb l'entrada a la fase S del cicle cel·lular. Tot i que aquest model cel·lular

expressa els sistemes de transport equilibratius *es* i *ei*, l'efecte sobre l'activitat de transport únicament s'observa en la component sensible a NBTI (Meckling-Gill et al., 1993). De manera similar, l'addició del factor estimulador de colònies (CM-CFS) en pacients de leucèmia aguda mieloide indueix un increment progressiu de l'expressió de la isoforma *es* (Wiley et al., 1994).

L'activació i/o proliferació dels macròfags juga un paper important en la resposta immune i és una etapa crítica en l'adquisició de l'activitat citotòxica. Els macròfags de medul·la òssia de ratolí també coexpressen transportadors concentratius (CNT1 i CNT2) i equilibratius (ENT1 i ENT2). Aquest model cel·lular permet l'anàlisi de les propietats reguladores dels transportadors de nucleòsids ja que es tracta d'un cultiu primari sensible a activació, proliferació i agents pro-apoptòtics. L'activació dels macròfags desencadenada per INF-γ activa les dues isoformes de transportadors concentratius, contràriament a la inducció per proliferació amb M-CFS que només activa el transportador equilibratiu ENT1 (Soler et al., 2001a). Un possible avantatge en el creixement per a les cèl·lules que sobreexpressen ENT1 podria també hipotetitzar-se en tumors sòlids, ja que els llocs d'unió a NBTI augmenten en moltes cèl·lules cancerígenes. L'activació o la inducció a l'apoptosi degut al tractament amb LPS en macròfags de medul·la òssia de ratolí està associada a una sobreexpressió de CNT1 i CNT2, per mecanismes redundants que inclouen mecanismes dependents i independents de TNF-α (Soler et al., 2001b).

La regulació dels transportadors de nucleòsids en limfòcits B humans ha estat caracteritzada en les línies cel·lulars Raji i BLS-1. Aquestes cèl·lules expressen majoritàriament el transportador equilibratiu *es* però també expressen dues activitats concentratives, el sistema N1 (CNT2) i el sistema N5 (encara no clonat) (Flanagan and Meckling-Gill, 1997). Activadors de les cèl·lules B, com els esters de forbol (PMA) i el LPS, activen les isoformes concentratives però en canvi el mRNA i l'activitat d'ENT1 disminueixen. Aquests efectes depenen de la proteïna quinasa C. El PMA i el LPS també indueixen els nivells del mRNA de TNF-α, la qual cosa suggereix que aquesta citoquina podria mitjançar algun dels efectes desencadenats per aquests agents, ja que la seva addició incrementa les activitats de transport N1 i N5 per un mecanisme que també depèn de la PKC. A més, el TNF-α *down*-regula l'activitat *es*, però aquests efectes no poden ser abolits per la inhibició de la proteïna quinasa C (Soler et al., 1998). Els mateixos autors van estudiar l'efecte de l'òxid nítric, altament involucrat en la modulació de la resposta apoptòtica dels limfòcits B, sobre els transportadors de

nucleòsids en la línia cel·lular Raji. Les cèl·lules Raji no expressen quantitats significants del mRNA de la forma induïble de l'enzim òxid nítric sintasa (iNOS) ja que la producció d'òxid nítric sembla ser constitutiva. L'efecte activador del PMA sobre els sistemes concentratius N1 i N5 no requereix d'òxid nítric, però en el cas del sistema equilibratiu *es*, l'efecte inhibitori del sistema produït pel PMA depèn de la presència d'iNOS, així com de l'activació dels limfòcits B (Soler et al., 2000).

- **Cèl·lules epitelials hepàtiques**

Dins el marc de la tesi doctoral de la Dra Sonia Fernández-Veledo, es va dur a terme una cerca d'efectors de reconeguda implicació en la diferenciació i/o proliferació hepàtica i implicats en la regeneració hepàtica associada a la hepatectomia parcial. Així es va demostrar que hepatomitògens, com l'HGF, l'EGF i TGF-α produeixen un increment de l'expressió del transportador CNT1 en cèl·lules FAO i en cultiu primari d'hepatòcits de rata, sense modular els nivells de proteïna de CNT2. Aquests resultats es reprodueixen quan s'incuben les cèl·lules amb citoquines multifuncionals crítiques per a la resposta mitogènica durant el procés de regeneració El tractament amb TNF-α i IL-6 indueixen un increment de l'expressió de CNT1, que en el cas del cultiu primari d'hepatòcits es tradueix en un increment d'aquest transportador a nivell de la membrana plasmàtica i un augment del transport de citidina dependent de sodi en el cultiu primari d'hepatòcits (Fernández-Veledo et al., 2004). Mitjançant l'ús d'inhibidors específics de diferents proteïna quinases i de models *in vivo knock out* pel receptor del TNF-α (TNFR1) i per la IL-6, s'ha demostrat l'existència de dues vies independents involucrades en la regulació de CNT1. La primera via és dependent de la PI3K i la segona està associada a l'activació de les MAPK (Fernández-Veledo et al., 2004).

De manera diferencial a la regulació de CNT1, el transportador CNT2 s'indueix en presència de senyals antiproliferatius com el TGF-β1 i la dexametasona. Així, les cèl·lules FAO tractades amb aquests dos factors durant 24 o 48 hores mostren un increment de l'expressió i activitat del transportador CNT2, i en canvi s'observa una disminució dels nivells de proteïna de CNT1. Gràcies a la clonació i caracterització dels promotor murí de CNT2 per part de la Dra. Raquel Valdés es va poder dur a terme l'estudi de regulació transcripcional d'aquests efectes. Com s'esperava, el tractament amb dexametasona i TGF-β1 produeixen un increment de l'activitat promotora de CNT2 i mitjançant diferents construccions generades per deleció de la seqüència promotora mínima es van poder acotar els elements de resposta implicats.

L'anàlisi de les vies de transducció implicades en l'efecte de el TGF-β1 determina que la inducció de l'expressió i l'activitat de rCNT2 en la línia cel·lular FAO ve mitjançada per un mecanisme dependent de JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) (Valdés et al., enviat). El TGF-β1 actua en el fetge bàsicament com a element proapoptòtic, en el cas concret de les cèl·lules FAO indueix l'apoptosi mitjançant l'activació de diferents caspases i producció de ROS (Freathy et al., 2000). Tot i que no es pot assegurar si l'efecte observat sobre el transportador CNT2 és característic de cèl·lules apoptòtiques o al contrari està relacionat amb els mecanismes de supervivència activats en aquestes situacions, estudis preliminats semblarien indicar que la inhibició de JNK incrementa els nivells apoptòtics. Aquest resultat permetria postular un possible mecanisme a través del qual en situacions d'estrés, les cèl·lules activarien el transportador concentratiu de nucleòsids preferent per purines CNT2 com un altre mecanisme més de supervivència cel·lular.

3.3. REGULACIÓ PURINÈRGICA.

Com es comentarà més detalladament en el capítol posterior (**apartat 4.3**) l'adenosina a través de l'activació dels seus receptors regula un gran nombre de funcions cel·lulars. Les concentracions d'adenosina extracel·lulars poden ser modulades pels enzims responsables de la seva metabolització com l'adenosina quinasa i l'adenosina desaminasa però en darrera instància els transportadors de nucleòsids equilibratius i concentratius són els que controlen la seva concentració tant intracel·lular com extracel·lular.

Recentment, han sorgit evidències de la implicació dels transportadors de nucleòsids equilibratius en la finalització de l'activació purinèrgica mitjançada per adenosina, disminuïnt la seva concentració extracel·lular. En aquest sentit, s'ha demostrat la implicació del transportador ENT1 en la secreció d'ions a l'epiteli respiratori. Szkotak i col·laboradors (2001), han observat que la inhibició d'aquest transportador produeix un increment de l'adenosina extracel·lular, una activació dels receptors d'adenosina i en conseqüència un increment de les corrents de potassi. Addicionalment, s'ha relacionat ENT1 amb el control de la neurotransmissió glutamatèrgica a l'espina dorsal de rata. L'adenosina juga un paper neuromodulador a través del sistema nerviós central, en particular en l'espina dorsal superficial de la medul·la espinal la seva acció s'associa amb la antinocicepció *in vivo*. S'ha descrit que tant la presència d'adenosina com d'agonistes específics del receptor A1R produeixen

una disminució de les corrents excitatòries post-sinàptiques en aquest model i aquest efecte es reprodueix en presència d'inhibidors d'ENT1. Aquests resultats demostren que la inhibició de la captació d'adenosina redueix la neurotransmissió afarent primària en neurones de l'espina dorsal. Els autors postulen que la inhibició de l'activitat d'ENT1 resulta en l'acumulació extracel·lular d'adenosina que, mitjançant la seva acció a través dels receptors A1 pre-sinàptics, actua atenuant l'alliberament de glutamat (Ackley et al., 2003).

L'adenosina no només modula processos fisiològics, també està implicada en processos patofisiològics com epilèpsies, desordres del son, dolor i addicions a drogues. De fet l'adenosina és un mitjancer de la intoxicació etílica, l'alcohol interactua amb el sistema de l'adenosina bloquejant els transportadors de nucleòsids a la membrana de les cèl·lules i produint un increment de l'activació purinèrgica (Hack and Christie, 2003). Recentment, estudis *in vivo* realitzats amb ratolíns *knock out* del transportador ENT1 han posat de manifest la importància d'aquest transportador i el paper fisiològic que juga en els comportaments associats a l'alcohol. Així, els ratolins *knock out* (ENT1-/-) mostren respostes hipnòtiques i atàxiques a l'etanol reduïdes respecte els ratolins control i a més el seu consum d'alcohol és superior; aquestes respostes s'atribueixen a una disminució de la funció del receptor A1 en aquests animals (Choi et al., 2004). D'altra banda en el nostre grup de recerca, també s'ha posat de manifest el paper dels transportadors de nucleòsids en la modulació de l'adenosina extracel·lular i en conseqüència en l'activació purinèrgica. Guillén-Gómez i col·laboradors (2004) van observar que la privació de son, associada a elevats nivells d'adenosina en el cervell (especiament en el cervell anterior i còrtex), es correlaciona amb una disminució dramàtica de l'expressió de CNT2 en aquestes regions.

Tanmateix, els transportadors de nucleòsids no només modulen l'activació dels receptors d'adenosina sinó que a més hi ha diversos estudis que demostren que es troben sota control purinèrgic. La primera evidència va sorgir en el nostre grup d'investigació on es va posar de manifest un nou mecanisme de regulació del transportador sodi-dependent i d'alta afinitat per adenosina, CNT2, via l'activació del receptors d'adenosina A1. Duflot i col·laboradors (2004) van demostrar que R-PIA, agonista dels receptors d'adenosina, principalment d'A1, indueix un increment del transport sodi-dependent de guanosina en cèl·lules FAO i en cultiu primari d'hepatòcits a temps molt curts, mitjançant un canvi en la *Vmax* del transportador sense afectar la seva *Km* aparent. Aquest efecte està mitjançat per l'obertura dels canals de potassi

dependents d'ATP, de tal manera que la presència inhibidors específics d'aquests canals, com és el cas de la glibenclamida, bloqueja l'activació de CNT2 produïda per R-PIA. A més, s'ha observat que aquest efecte també és dependent de la concentració de glucosa extracel·lular. Així, en situacions de baixa concentració de glucosa l'efecte purinèrgic sobre CNT2 es magnifica, fet que suggereix una relació entre el transport d'adenosina i l'estat energètic cel·lular (Duflot et al., 2004).

Recentment en d'altres models cel·lulars també s'ha descrit l'existència d'una regulació purinèrgica dels transportadors de nucleòsids, en aquest cas del transportador ENT1. En condicions d'hipòxia, les cèl·lules produeixen adenosina, que actua de manera paracrina i autocrina com una agent cardioprotector. De manera general, els agents cardiovasodilatadors i cardioprotectors utilitzats clínicament, com el dipiridamol, actuen inhibint els ENTs de manera que es potencia l'activació purinèrgica. En un model de cardiomiocit de ratolí, la línia cel·lular HL-1, s'ha observat que existeix un mecanisme de regulació per *feedback* sobre el transportador ENT1 produït per la pròpia adenosina. Així doncs, s'ha postulat que l'efflux d'adenosina en situació d'hipoxia via els ENTs indueix l'activació dels receptors A1 i A3 i mitjançant la via de senyalització de la proteïna quinasa Cε produeix una activació del transportador ENT1 (Chaudary et al., 2002; 2004). Una altra evidència d'aquest control purinèrgic d'ENT1 l'han posat de manifest Pinto-Duarte i colaboradors (2005) en sinaptosomes d'hipocamp de rata. En aquest model, la presència d'un agonista del receptor A2A, però no d'A1, produeix un increment de la captació o sortida d'adenosina via ENTs en sinaptosomes i aquest efecte estaria mitjançat per la proteïna quinasa C. Els autors postulen un model mitjançant el qual l'activació dels receptors A2A facilitaria la sortida d'adenosina a través dels transportadors equilibratius modulant així l'assequibilitat d'adenosina extracel·lular i l'activació dels receptors A1 que indueixen l'alliberament d'acetilcolina (Pinto-Duarte et al., 2005).

3.4. REGULACIÓ NUTRICIONAL I PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.

Un gran nombre de transportadors de nutrients són regulats nutricionalment pels seus propis substrats. Com s'ha comentat, els transportadors de nucleòsids són imprescindibles per l'absorció dels nucleòtids de la dieta, dins aquest context el nostre grup d'investigació s'ha interessat en la seva modulació per assequibilitat de substrat. Valdés i col·laboradors (2000) van analitzar el possible efecte de la disponibilitat de nutrients *in vivo* sobre l'expressió de les isoformes concentratives CNT1 i CNT2 en els

teixits d'origen epitelial, parènquima hepàtic i jejúnum. Aquests estudis han demostrat que l'expressió de les dues isoformes és sensible a la disponibilitat de nutrients a l'intestí prim. Els autors van aïllar i caracteritzar vesícules de vora en raspall de jejúnum de rates control i rates dejunades durant 48h, i tant l'expressió de CNT1 com la captació dependent de sodi de timidina i gemcitabina (una droga derivada de nucleòsids pirimidínics) mostren un clar augment en les rates sotmeses a dejuni. Contràriament, l'expressió de CNT1 en fetge disminueix lleugerament. Aquest efecte es mimetitza en administrar a les rates una dieta lliure de nucleòtids suggerint una regulació de CNT1 per assequibilitat de substrat. (Valdés et al., 2000).

3.5. REGULACIÓ DEL TRÀFIC I DE LA INSERCIÓ A MEMBRANA.

En la majoria de models, no només línies cel·lulars sinó també en mostres clíniques, no existeix una correlació directe entre l'expressió del missatger i de la proteïna dels transportadors de nucleòsids, però sobretot la manca de correlació s'observa amb la seva activitat. Aquest fet suggereix l'existència d'una regulació post-traduccional i en particular una regulació del tràfic dels CNTs i ENTs a la superfície cel·lular, a més de la regulació transcripcional.

Recentment, el nostre grup d'investigació ha estudiat la localització i el tràfic del transportador d'alta afinitat d'adenosina CNT2 en fetge i cultiu primari d'hepatòcits. Estudis de fraccionament subcel·lular i de microscopia electrònica han demostrat l'existència d'una localització i vies de tràfic diferents entre els transportadors CNT1 i CNT2. Així, CNT2 s'expressa principalment a la membrana basolateral dels hepatòcits, mentre CNT1, a través d'una via indirecte, acava localitzant-se a la membrana canalicular (Duflot et al., 2002). Addicionalment, s'ha demostrat que els àcids bil·liars són susceptibles d'induir un increment en l'activitat del transportador CNT2 a temps curts (entre 30 min i 2 hores), mitjançant un increment del nombre de transportadors a la superfície cel·lular. Mitjançant l'ús d'inhibidors específics de diferents vies de trasducció de senyals, s'han pogut definir els elements responsables d'aquesta translocació de CNT2 a la membrana basolateral dels hepatòcits. Així, s'ha demostrat la implicació de la PI3 quinasa, de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK i la importància de la xarxa microtubular en aquesta resposta. Aquestes observacions són la primera evidència de l'existència d'una via d'inserció a membrana del transportador CNT2 altament regulada (Fernández-Veledo et al., enviat).

4. METABOLISME DE NUCLEÒSIDS I METABOLISME ENERGÈTIC.

Els nucleòsids són molècules ubiqües amb una gran importància en la fisiologia de la cèl·lula. En primer lloc són els substrats precursors per a la síntesi dels àcids nucleics i són per tant fonamentals per la seva viabilitat. A més intervenen en l'homeòstasi energètica participant en nombrosos processos bioquímics com el metabolisme energètic. Així, l'ATP a més de proporcionar grups fosfat per a la síntesi d'altres nucleòtids és el principal intermediari en les reaccions de transferència d'energia. Tanmateix no és l'únic a realitzar aquest tipus de funcions, el GTP actua durant la síntesi proteica, i el CTP és un element important en el metabolisme lipídic. A més de ser elements estructurals de nombrosos coenzims, actuen també com mediadors fisiològics de coneguda importància. Per exemple, l'AMPc exerceix de segon missatger en nombrosos processos biològics, el GMPc intervé en diversos processos cel·lulars, l'ADP resulta imprescindible en l'agregació plaquetària, etc. Participen també en la formació de molts intermediaris actius com l'UDP-glucosa, GDP-manosa, UDP-galactosa o CDP-etanolamina.

4.1. METABOLISME DE NUCLEÒT(S)IDS.

Els requeriments metabòlics tant de nucleòtids com de les seves bases corresponents poden cobrir-se a través de tres vies diferents. Tant purines com pirimidines poden ser sintetitzades mitjançant una via que suposa un alt cost energètic i que està restringida a cert tipus cel·lulars, la síntesi de *novo*. Un mecanisme alternatiu que, a partir de la recuperació de bases i nucleòsids preformats, permet mantenir els *pools* de nucleòtids amb menor consum energètic és la denominada via de recuperació o *salvage*, i és imprescindible en aquelles cèl·lules que no poden realitzar la síntesi de *novo* com és el cas dels enteròcits, les cèl·lules de la medul·la òssia, algunes cèl·lules cerebrals, eritròcits i cèl·lules del sistema immunitari (Lajtha and Vane, 1958; Fontenelle and Henderson, 1969; Rudolph et al., 1984). Finalment la dieta és una font important de nucleòsids i nucleobases que permeten la formació de nucleòtids mitjançant les vies de recuperació.

4.1.1. Biosíntesi de nucleòtids púrics.

Aquest procés té lloc principalment en cèl·lules parenquimals hepàtiques, on tots els enzims necessaris estan presents en forma d'un agregat macromolecular.

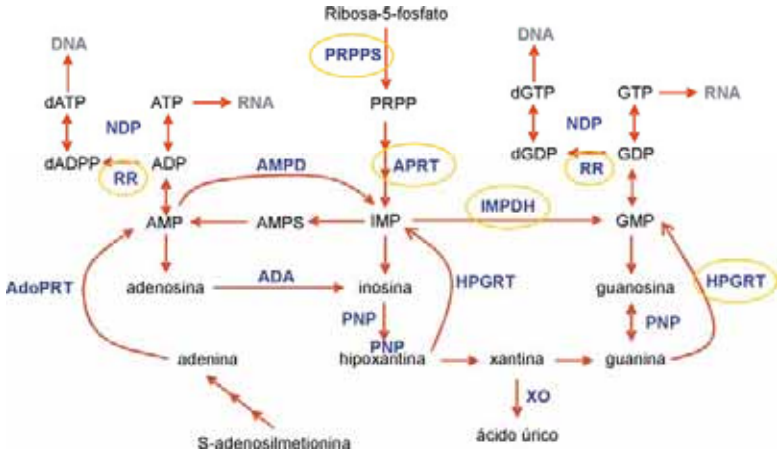

Figura 5. Biosíntesi de nucleòtids púrics. La síntesi de nucleòtids púrics s'inicia amb la formació de 5´-fosfo-α-ribosil-1-pirofosfat (PRPP) que posteriorment passa a inosina-5´-monofosfat (IMP), element bifurcador del procés. PRPPS (*5´-fosfo-α-ribosil-1-pirofosfat sintasa*), APRT (*amidofosforibosiltransferasa*), HPGRT (*hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa*), IMPDH (*inosina 5´-monofosfat deshidrogenasa*), AdoPRT (*adenosina-fosforibosiltransferasa*), ADA (*adenosina desaminasa*), AMPD (*adenosina 5´-monofosfat desaminasa*), XO (*xantina oxidasa*), PNP (*purin-nucleòsid fosforil·lases*), NDP (*nucleòsid-difosfat fosforil·lases*

L'IMP representa el punt de bifurcació en el procés de la biosíntesi púrica, ja que pot ser convertit a GMP o AMP mitjançant reaccions independents. En el cas de la síntesi d'AMP, es requereix energia en forma de GTP, i en canvi si el procés biosintètic es decanta cap a la formació de GMP, l'energia és necessària en forma d'ATP. Aquest fet permet a la cèl·lula controlar les proporcions dels diferents nucleòtids amb l'objectiu d'aconseguir un determinat balanç energètic. D'aquesta manera, s'observa que una acumulació intracel·lular de GTP accelera la síntesi d'AMP a partir d'IMP i viceversa.

Degut al seu alt cost energètic, la síntesi de *novo* de nucleòtids púrics es troba altament regulada. Yamaoka i col·laboradors han estudiat la regulació de l'amidofosforibosiltransferasa (APRT), enzim que catalitza la reacció limitant de la síntesi de nucleòtids púrics. La utilització de cèl·lules CHO deficients per aquest enzim apunta que els nucleòtids púrics són sintetitzats, en aquestes condicions, preferentment per la via de recuperació amb un estalvi energètic associat. S'ha descrit que l'enzim APRT està regulat mitjançant un procés de *feedback* negatiu per

nucleòtids com l'AMP i el GMP (Yamaoka et al., 1996). Posteriorment, els mateixos autors van demostrar que la inhibició d'aquest enzim no només regula la síntesi de nucleòtids, sinó que també actua sobre el creixement cel·lular i la síntesi proteica. La regulació de la biosíntesi de GTP també ha estat estudiada per diversos autors. Webber i col·laboradors van suggerir la rellevància de la inosina 5'-monofosfat deshidrogenasa (IMDH), l'enzim que catalitza el pas d'IMP a GMP en aquest procés. En cèl·lules tumorals existeix una inducció de la síntesi de nucleòtids de guanina que podria estar relacionada amb la disminució observada de l'activitat dels enzims responsables del catabolisme, principalment de la xantina oxidasa, enzim limitant de la degradació dels nucleòsids púrics. De la mateixa manera, s'ha observat una possible relació entre la diferenciació cel·lular i l'activitat IMPDH (Weber et al., 1992). Estudis realitzats en diferents línies cel·lulars hematopoiètiques recolzen aquesta hipòtesi. Així, la inhibició de la IMPDH provoca l'arrest cel·lular en la fase G1 i indueix la diferenciació cel·lular. El tractament amb àcid micofenòlic (MPA), inhibidor específic de l'enzim, afecta diferents vies de senyalització, provocant la inhibició de les vies dependents de les proteïna quinases ERK i Tor quinasa, i en canvi s'indueix la fosforilació de JNK (Gu et al., 2003).

En condicions d'estalvi energètic, la cèl·lula activa la via de recuperació que a la vegada inhibeix la síntesi de *novo*. Tanmateix el mecanisme mitjançant el qual es produeix aquesta regulació es desconeix. La via de recuperació o *salvage* permet a les cèl·lules estalviar energia mitjançant la síntesi a partir dels nucleòsids i les bases corresponents generats a través del catabolisme púric. D'aquesta manera, l'adenina, la guanina i la hipoxantina són fosforilades gràcies a l'acció de dos enzims, l'adenosina fosforibosil transferasa (adoPRT) i la hipoxantina-guanosina fosforibosil transferasa (HGPRT). D'altre banda s'ha descrit que la inhibició d'aquesta via per l'activació de la via de *novo* és deguda principalment al consum de 5-fosforibosil 1-pirofosfat i no a la inhibició de la APRT com té lloc en cas contrari (Yamaoka et al., 1996).

Addicionalment, les cèl·lules disposen de tota una sèrie d'enzims que permeten la interconversió dels diferents nucleòsids i bases. Així l'adenosina, mitjançant l'acció de l'adenosina desaminasa (ADA), pot donar lloc a la inosina i aquesta, mitjançant l'activitat de diverses purina nucleòsid fosforilases (PNP), permet la formació de guanosina.

Molts d'aquests enzims necessaris per a la síntesi o degradació de purines són vitals, i alguns defectes genètics en les vies del metabolisme púric poden causar malaties musculars, neurològiques, renals i immunològiques severes. La deficiència en adenosina desaminasa és un dels casos més significatius. En efecte, la manca d'aquest enzim en humans produeix alteracions dràstiques del metabolisme de purines veient-se incrementats els nivells d'adenosina i desoxiadenosina. Els malalts que pateixen aquesta deficiència presenten una immunodeficiència caracteritzada per una limfopènia severa de les cèl·lules B i T i altres teixits com el tracte gastrointestinal també es veuen altament afectats (Xu and Kellems, 2000). S'ha descrit que els ratolins *knout out* per aquest enzim (ADA-/-) presenten letalitat perinatal causada per danys en el fetge però també presenten danys severs en el tim, la melsa i l'intestí prim. La restauració de l'expressió de l'adenosina desaminasa en els trofoblasts d'aquests ratolins *knock* va permetre analitzar l'efecte d'aquesta deficiència en el tracte gastrointestinal. Els autors van observar defectes en aquest teixit sobre tot a les plaques de Peyer i anàlisis d'HPLC van revelar un increment de les concentracions d'adenosina i desoxiadenosina acompanyat d'una disminució de certes bases com la hipoxantina i la xantina. Addicionalment aquests animals presentaven una baixada de l'activitat S-adenosilhomocisteïna transferasa tot el llarg de l'intestí prim, indicant una possible disrupció de la transmetilació cel·lular i activació de vies apoptòtiques (Xu and Kellems, 2000).

4.1.2. Biosíntesi de nucleòtids pirimidínics.

La biosíntesi de nucleòtids pirimidínics es produeix principalment en el citosol d'aquells teixits que presenten tota la maquinària enzimàtica necessària com la melsa, el tim, el fetge i els testicles. A diferència de la síntesi de purines, en aquest cas no existeix un element bifurcador com l'IMP. El PRPP és incorporat a l'àcid oròtic, base pirimidínica formada en primera instància, per formar l'ororat monofosfat (OMP) a partir del qual es forma l'UTP. Aquest darrer, mitjançant l'acció de la CTP sintetasa, és aminat donant lloc al CTP. D'altre banda, els nucleòtids de timidina provenen dels dUTP generats.

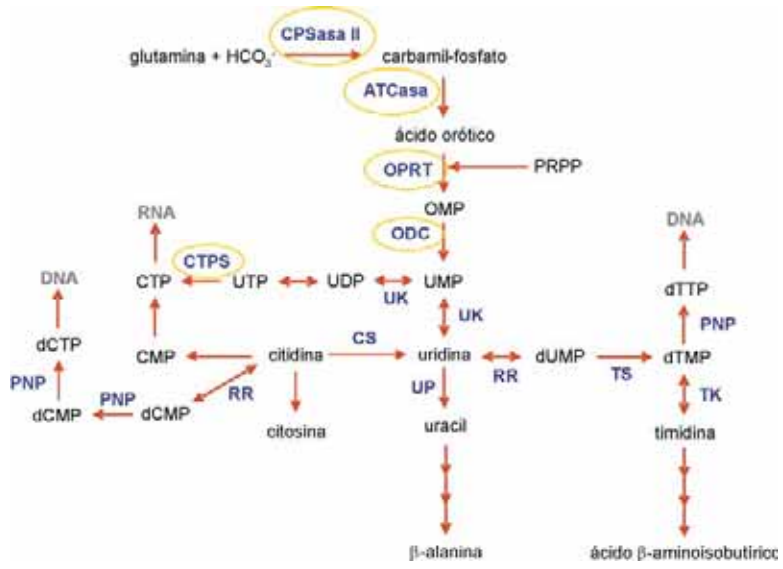

Figura 6. Biosíntesi de nucleòtids pirimidínics. Degut a la simplicitat de la base, la síntesi de pirimidines es menys complexa que la de purines. El carbamil-fosfat deriva de la reacció citosòlica entre la glutamina y el bicarbonat, a diferència del sintetizat durant el cicle de la urea (mitocondrial). CPSasa II (carbamil-fosfat sintetasa II), ATCasa (*aspartat transcarbamilasa*), OPRT (*orotat fosforribosil transferasa*), ODC (*orotat descartoxilasa*), UK (*uridilat quinasa*), CTPS (*CTP sintasa*), PNP (*pirimidin-nucleótids quinases*), RR (*ribonucleòtid reductasa*), CS (*citidina desaminasa*), UP (*uridina fosforilasa*), TS (*timidilat sintasa*), TK (*timidina quinasa*).

La regulació de la síntesi de pirimidines depèn principalment de les primeres reaccions del procés, que són catalitzades per un complex proteic multifuncional denominat CAD format per tres activitats enzimàtiques, la carbamilfosfat sintetasa-II (CPSasa), aspartat transcarbamilasa (ATCasa) i la dihidroorotasa (DHOasa). L'estudi comparatiu entre els llevats i els mamífers, així com la generació de quimeres, ha demostrat que, en mamífers, la reacció limitant del procés i per tant susceptible de ser modulada és la catalitzada per l'enzim CPSasa (Serre et al., 1998). Diversos autors han descrit que en resposta a estímuls proliferatius, tant la síntesi de *novo* com la via de recuperació són activades durant el cicle cel·lular, degut probablement a la necessitat d'incrementar els diferents *pools* nucleotídics per a la síntesi de DNA. Graves i colaboradors van demostrar que l'activació de la CPSasa és dependent de l'activació de les MAP quinases. Així, l'activació d'aquesta cascada per l'EGF regula l'activitat enzimàtica CPSasa mitjançant dos mecanismes, la pèrdua de la capacitat inhibidora de l'UTP així com la sensibilització a una regulació positiva per fosforibosil pirofosfat (Graves et al., 2000). A més de la regulació alostèrica, l'activitat CPSasa està controlada mitjançant un procés de fosforilació dependent de la via de les MAPK i

de la PKA en funció de la fase del cicle cel·lular en la que es troba la cèl·lula (Sigoillot et al., 2002; 2003).

Durant la via de recuperació de nucleòtids pirimidínics, la uridina i la citidina poden ser fosforilades de manera seqüencial fins a la seva forma trifosfat per l'acció de diversos enzims: les uridina-citidina quinases (UCKs), dues de les quals han estat clonades recentment (Van Rompay et al., 2001), les UMP-CMP quinases (Van Rompay et al., 1999) i les nucleòsid difosfat quinases. La primera fosforilació és el pas limitant d'aquest procés i diversos estudis han demostrat un augment de l'activitat UCK en cèl·lules tumorals respecte cèl·lules control (Herzfeld and Raper, 1979; Shen et al., 1998). Entre els enzims que també juguen un paper important en la via de recuperació de nucleòsids i nucleòtids pirimidíncs, es troben les citidina desaminases, les quals catalitzen la desaminació hidrolítica del seu substrat generant el corresponent producte, uracil. Estudis recents indiquen una localització intracel·lular nuclear, a més de la citosòlica, per el què es postula que la via de recuperació no només té lloc en el citosol cel·lular, amb les implicacions que això pot tenir sobre la regulació del metabolisme i de la biosíntesi de nucleòtids i nucleòsids (Somasekaram et al., 1999).

De la mateixa manera que en el cas de les purines, la síntesi i degradació de pirimidines és un procés essencial en totes les cèl·lules i que cal que estigui altament regulat a fi d'evitar desordres metabòlics. La uridina, no només és un important precursor de la via de recuperació de pirimidines, sinó que participa en processos fisiològics i patofisiològics. Un dels enzims clau que regula la seva homeòstasi és la uridina fosforilasa i s'ha descrit que la deficiència d'aquest enzim produeix canvis tant en el metabolisme pirimidínic com en el purínic. Així, ratolins *knock-out* per la uridina fosforilasa, a més d'un increment en els nivells d'uridina i de diversos nucleòtids pirimidínics, a la vegada presenten un augment dels nivells de dGTP i dATP. Addicionalment, s'ha observat que aquests animals són menys sensibles a la toxicitat deguda a l'anàleg de nucleòsid 5'-FU, suggerint que la uridina pot jugar un paper protector dels teixits de l'hoste. Aquests resultats demostren que la deficiència d'enzims del metabolisme de nucleòtids no només produeix alteracions en l'homeòstasi d'aquests soluts sinó que també poden afectar l'eficiència dels tractaments en les teràpies antivíriques i antitumorals (Cao et al., 2005)

4.1.3. Formació de desoxiribonucleòtids.

En condicions basals, la cèl·lula conté de 5 a 10 vegades més RNA (mRNA, rRNA i tRNA) que DNA, és a dir que durant la biosíntesi de nucleòtids principalment es generen rNTPs. Tot i així, la producció de dNTPs és imprescindible en el moment en què les cèl·lules proliferants necessiten replicar el seu genoma. Llavors, rNTPs són reduïts mitjançant l'acció la de la ribonucleòtid reductasa (RR), un enzim multifuncional format per dues subunitats proteiques diferents (R1 i R2), i a continuació són fosforilats a dNTPs per les nucleòsid difosfat quinases (NDPKs).

Com que la RR és l'únic enzim present en la formació de tots els dNTPs, tant la seva activitat com la seva especificitat de substrat es troben altament regulades. Chabes i col·laboradors, interessats en la regulació transcripcional d'aquest enzim, apunten cap a la subunitat R2 com la responsable de controlar l'activitat enzimàtica del complex durant el cicle cel·lular. Així, mentre que a la fase G1 els nivells de R2 són pràcticament indetectables, el factor de transcripció E2F indueix la seva expressió durant la fase S (Chabes et al., 2004). Per altre banda, s'ha estudiat la seva regulació alostèrica i s'ha demostrat que els diferents nucleòtids són capaços de modular la seva activitat enzimàtica mitjançant la unió a llocs específics de l'enzim, ajustant l'afinitat de l'enzim per aquells nucleòtids menys abundants (Chimploy and Mathews, 2001; Kashlan and Cooperman, 2003).

D'altre banda, els dNTPs també poden obtenir-se a partir dels desoxiribonucleòsids preformats importats dins la cèl·lula a través dels transportadors de nucleòsids mitjançant la via de recuperació. Una vegada a l'interior cel·lular, com en el cas anterior, també cal que siguin fosforilats fins arribar a la seva forma trifosfat. Aquest procés té lloc en tres etapes subseqüents catalitzades per desoxiribonucleosid quinases, nucleosid monofosfat quinases (NMPs) i difosfat quinases (NDPKs) (Van Rompay et al., 2000).

Cal destacar que la formació de desoxiribonucleòtids també és necessària per mantenir la replicació del DNA mitocondrial. Així, els desoxinucleòsids i desoxinucleòtids són transportats a l'interior d'aquests orgànuls a través de transportadors de nucleòsids equilibratius i del transportador de desoxinucleòtids (DNC) respectivament. En aquest sentit, s'ha identificat hENT1 com un transportador de desoxinucleòsids mitocondrial (Lai et al., 2004). A l'interior dels mitocondris,

aquests soluts poden generar les formes trifosfat dNTPs gràcies a la presència de diversos dels enzims citats anteriorment (Patrick et al., 2005).

4.1.4. Catabolisme de nucleòsids.

El catabolisme dels nucleòsids produeix en última instància β-alanina o β-aminoisobutirat en el cas de pirimidines i àcid úric quan es degraden les purines. La reacció catabòlica central en els dos casos és el tall fosforolític de l'enllaç N-glicosídic dut a terme per l'activitat de les diferents nucleòsid fosforilases. Durant aquesta reacció l'estructura del nucleòsid és destruïda alliberant pentosa-1-fosfat i la base púrica o pirimidínica corresponent (Bzowska et al., 2000; Pugmire and Earlick, 2002). La pentosa 1-P alliberada pot ser isomeritzada formant pentosa 5-P. En el cas de que es tracti de ribosa-5P pot ésser utilitzada per la síntesi de 5-phosphoribosil-1-pirofosfat (PRPP) o convertida a través de la via de les pentoses en intermediaris glicolítics, i en canvi la desoxiribosa-5-P només pot ser dirigida cap a la via glicolítica (Sgarrella et al., 1997).

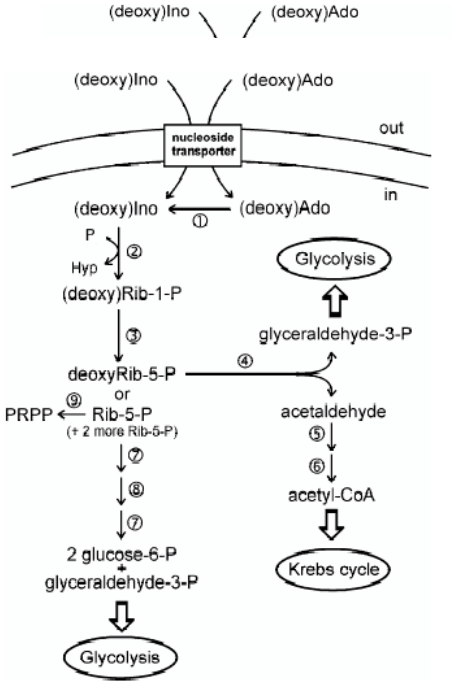

Figura 7: Esquema de la utilització dels (desoxi)nucleòtids. (1) adenosina desaminasa; (2) purina nucleòsid fosforil·lasa; (3) fosforibomutasa; (4) desoxiRib-5-P aldolasa; (5) aldehid oxidasa; (6) acetilCoA sintetasa; (7) transcetolasa; (8) transaldolasa; (9) PRPP sintetasa.

En aquest sentit, s'ha demostrat que els eritròcits catabolitzen la inosina i la hipoxantina, i la pentosa alliberada en aquest procés és convertida a lactat a través de la via de les pentoses fosfat i la glicòlisi generant una producció neta d'ATP (Bartlett and Bucolo, 1968). Tot i que la glucosa representa la principal font d'energia en la

majoria de tipus cel·lulars, en condicions d'hipoxia o isquèmia, condicions en què l'oxigen no és suficient per mantenir la respiració mitocondrial, els nucleòsids esdevenen una de les principals fonts energètiques de la cèl·lula. Giannecchini i col·laboradors han demostrat que les cèl·lules LoVo, derivades d'un carcinoma de colon humà, en condicions de privació de glucosa i inhibició de la la fosforilació oxidativa, incrementen no només el transport de glucosa sinó també el transport de desoxiadenosina. Addicionalment, han comprovat que la presència d'inosina en aquestes condicions de baixa càrrega energètica indueix la recuperació o preservació dels nivells d'ATP i la producció de lactat corroborant el fet que la ribosa generada pel catabolisme de nucleòsids pot ésser utilitzada per cèl·lules eucariotes com a font d'energia (Giannecchini et al., 2005)

4.2. NUCLEÒSIDS DE LA DIETA.

Els nucleòtids suministrats per la dieta es presenten majoritàriament en forma de nucleoproteïnes sobre les quals actuen enzims proteolítics del suc gàstric i pancreàtic, encarregats d'alliberar els àcids nucleics. Aquests són degradats per l'acció de les ribonucleotidases, desoxiribonucleotidases, fosfodiesterases i nucleotidases generant una barreja de nucleòsids i nucleobases lliures. S'ha descrit que aproximadament el 90% dels nucleòsids i nucleobases de la dieta són captats a través dels corresponents sistemes de transport, fonamentals en la regió proximal de l'intestí (Sanderson and He, 1994). Dins l'enteròcit, els nucleòsids són degradats i els productes resultants del catabolisme són excretats o un petit percentatge incorporats. Tot i així, semblaria que durant els processos de creixement ràpid i alimentació limitada la seva retenció en els diferents teixits es veu incrementada (Kolassa et al., 1977; Salati et al., 1984).

Els nucleòtids de la dieta ténen una importància crucial en la nutrició, principalment durant les primeres etapes del creixement i desenvolupament dels infants. La llet materna és altament rica en nucleòtids i la seva absorció modula tota una sèrie de funcions corporals. S'ha descrit que els nucleòtids exògens milloren les respostes immunològiques, ajuden al desenvolupament del tracte gastrointestinal, afavoreixen l'absorció de ferro i contribueixen al metabolisme lipídic facilitant la síntesi d'acids grassos en els estadis primerencs de vida (Schlimme et al., 2000). Addicionalment, diversos estudis han demostrat que un suplement de nucleòtids a la dieta és beneficial per l'òptim funcionament dels enteròcits jugant un paper important

sobretot en situacions de reparació tissular després d'un dany intestinal o durant periodes de ràpida proliferació cel·lular (Quan et al., 1990; Ortega et al., 1995).

L'anàlisi de diversos models cel·lulars intestinals també ha posat de manifest que l'addició de diferents nucleòtids contribueix als processos de diferenciació, proliferació o apoptosi en funció de l'estat de diferenciació cel·lular i dels nucleòtids utilitzats. He i col·laboradors han descrit que la presència d'una barreja de nucleòtids indueix la proliferació de les cèl·lules IEC-6, cèl·lules derivades d'epiteli intestinal normal de rata, i en canvi en el cas de les cèl·lules Caco-2, derivades de càncer de colon humà, el creixement només es veu incrementat en condicions d'estrés, és a dir quan les cèl·lules creixen deprivades de glutamina o d'aminoàcids essencials. D'altre banda s'ha observat que l'addició de nucleòtids en cèl·lules IEC-6 sembrades sobre una matriu extracel·lular (matrigel) produeix un increment de diversos enzims presents en la membrana apical utilitzats com marcadors de diferenciació. En canvi, les cèl·lules Caco-2 només presenten increments d'aquestes activitats enzimàtiques com sacarasa, fosfatasa alcalina i lactasa en condicions d'estrés (He et al., 1994). Aquests resultats demostren que els suplements en nucleòtids poden afavorir el creixement i maduració dels enteròcits (He et al., 1993). Les diferències existents entre els dos models cel·lulars semblaria dependre del fet que les cèl·lules IEC-6 presenten una síntesi de *novo* molt baixa ja que els hi manca l'activitat de diversos enzims claus, i al contrari, les línies cel·lulars provinents de càncers com les cèl·lules Caco-2 presenten una capacitat molt superior per generar nucleòtids a través de la biosíntesi de *novo* (Weber, 1983). En conseqüència, les cèl·lules IEC-6 són molt més dependents de la font exògena de nucleòsids per mantenir la proliferació. Per altra banda, s'ha descrit que els nucleòsids, principalment l'adenosina pot modular l'apoptosi en cèl·lules HL-60 i Caco-2, tot i que no es coneixen els mecanismes implicats en aquest efecte (Meisel et al., 1998).

També existeixen diversos estudis respecte el paper dels nucleòtids i nucleòsids de la dieta en el fetge, òrgan que juga un paper central en el metabolisme nucleotídic. L'aport hepàtic de nucleòtids cap a d'altres teixits es manté a través de les vies de síntesi de *novo* i de recuperació o *salvage*, i addicionalment al transport de nucleòsids recuperats per la ingesta (Gasser et al., 1981; Holstege et al., 1991). Després d'una agressió o lesió de l'òrgan, la biosíntesi de nucleòtids a través de les dues vies possibles (síntesi de *novo* i via de recuperació) s'activa i el flux de nucleòsids cap a l'interior cel·lular es veu incrementat, afavorint la regeneració del teixit

(Ohyanagi et al., 1989; Yamaguchi et al., 1985). D'altra banda s'ha descrit que ratolins deslletats alimentats amb una dieta lliure de nucleòtids presenten nivells incrementats de colesterol hepàtic, bilirrubina sèrica i disminució del pes de l'òrgan (Novak et al., 1994). Aquests resultats suggereixen que els nucleòsids exògens afecten a la composició i a la funció hepàtica, essent especialment importants de cara al subministrament cap a d'altres teixits quan la capacitat de síntesi per part d'aquest òrgan es veu disminuïda per malaltia o lesió.

4.3. ACTIVACIÓ PURINÈRGICA.

Tot i que la majoria dels nucleòtids de l'organisme són intracel·lulars, també se'n troben en el plasma a concentracions del rang μM, on exerceixen accions similars a les hormones a través de la seva unió a receptors específics localitzats a la membrana plasmàtica. La clonació molecular de diferents receptors i les anàlisis fisiològiques i farmacològiques han demostrat que totes les cèl·lules eucariotes expressen receptors per l'ATP però que l'ADP, UTP, UDP i una varietat de diadenosines polifosfat també són molècules actives i actuen de manera autocrina o paracrina com a potents agonistes activant diverses cascades de transducció de senyal, entre les que s'inclouen les vies de l'AMPc i de l'inositol/calci (Abbracchio and Burnstack, 1998; Fischer, 1999; Miras-Portugal et al., 1998). Els nucleòtids a través dels receptors purinèrgics de la família P2X i P2Y exerceixen múltiples accions. Així, intervenen en la regulació del ritme cardíac, l'agregació plaquetària, el funcionament renal i el funcionament leucocitari i regulen la secreció d'ions al pàncreas, l'intestí prim i el colon. La gran diversitat de receptors i el fet que un mateix teixit presenti diversos tipus d'aquests receptors fa que sigui extraordinàriament difícil establir de manera precisa quin és el paper específic de cadascun d'ells.

Els nucleòtids extracel·lulars són alliberats en condicions fisiològiques per una gran varietat de cèl·lules. Així, les neurones alliberen ATP que actua de transmissor, les cèl·lules endotelials també n'alliberen en resposta a canvis en el flux sanguini i les plaquetes alliberen ATP i ADP durant la desgranulació, entre d'altres exemples. Tanmateix, aquests nucleòtids extracel·lulars tenen una vida mitja molt curta (2 minuts en el cas de l'ATP). Aquest fet està lligat a l'activació purinèrgica ja que són necessaris mecanismes d'inactivació o recaptació d'aquests nucleòtids a fi d'aturar els senyals conduïts a través dels receptors. Actualment, es coneixen varies famílies d'enzims, com les ectonucleotidases, les ectofosfodiesterases i la 5'-nucleotidasa, responsables

d'hidrolitzar els nucleòtids fins als respectius nucleòsids. Aquests enzims es poden trobar ancorats a la membrana plasmàtica de la cèl·lula o en forma soluble en els fluids corporals i presenten una expressió específica de teixit i de tipus cel·lular. No només actuen controlant la funció dels receptors de nucleòtids, sinó que també són indispensables per la via de recuperació de la síntesi de nucleòtids i tenen una funció nutricional a nivell de l'epiteli intestinal (Zimmermann, 2000).

L'adenosina, com l'ATP, és un important component del sistema purinèrgic i està implicada en un ampli ventall de processos fisiològics com la neurotransmissió, l'activitat cardiovascular, la lipòlisi o l'agregació plaquetària, i a la vegada intervé en el control del transport d'ions i fluids als epitelis renal, gastrointestinal i respiratori. Aquest autocoid exerceix les seves accions a través de receptors purinèrgics P1 (A1, A2A, A2B i A3), situats a la membrana plasmàtica i acoblats a proteïnes G.

Hi ha dos fonts principals d'adenosina extracel·lular: la conversió dels nucleòtids d'adenina a adenosina mitjançant l'acció de les ectonucleotidases extracellulars i l'alliberament d'adenosina a través dels transportadors de nucleòsids equilibratius. En condicions normals la majoria de l'adenosina basal prové de l'acció de la S-adenosilhomocisteina hidrolasa (Lloyd et al., 1988; Bontemps et al., 1993). Tanmateix, en condicions d'elevada demanda d'oxigen o de baixa càrrega energètica, s'incrementen els nivells d'adenosina degut a la degradació (desforsforil·lació) de l'AMP via la 5'-nucleotidasa. Dins la cèl·lula aquesta adenosina generada pot ésser desaminada a inosina mitjançant l'acció de l'adenosina desaminasa (ADA), refosforilada a AMP mitjançant l'activitat de l'adenosina quinasa (AK) o transportada als fluids extracel·lulars a través dels transportadors equilibratius de nucleòsids (Stiles, 1992; Zhou et al., 1992). La comparació entre les propietats cinètiques de l'AK i l'ADA suggereix que la majoria de l'adenosina intracel·lular és metabolitzada via l'adenosina quinasa. S'ha descrit per exemple que en el cor un 90% de l'adenosina generada per la 5'-NT és refosforilada per l'acció de l'AK (Kroll et al., 1993). En conseqüència, aquest enzim pot considerar-se un punt clau del control dels nivells d'adenosina intracel·lular i en última instància dels nivells extracel·lulars i de l'activació dels receptors P1. En aquest sentit, s'ha demostrat que la inhibició de l'adenosina quinasa de manera farmacològica, mitjançant inhibidors específics, produeix un increment dràstic de les concentracions d'adenosina de manera específica en determinats teixits (Kawaluck et al., 1998). La utilització d'aquests inhibidors representa un mecanisme que permet afavorir de manera selectiva les accions protectores de l'adenosina

minimitzant els efectes no específics associats amb l'administració sistèmica d'agonistes de receptors d'adenosina i per tant tenen un alt potencial terapèutic en àrees d'inflamació, analgèsia, epilèpsia i isquèmia cerebral (Kowaluck et al. 1998; Boyle et al., 2001; Jarvis et al., 2002).

Tanmateix, els transportadors de nucleòsids també són responsables en gran part de regular l'assequibilitat d'adenosina extracel·lular, i en conseqüència són susceptibles de modular les seves funcions. La implicació dels transportadors de nucleòsids en l'activació purinèrgica s'ha discutit més extensament en l'**apartat 3.3** d'aquesta memòria.

4.4 PROTEINA QUINASA DEPENDENT D'AMP (AMPK).

La regulació dels nivells energètics és un procés fonamental en tots els organismes vius. A nivell cel·lular, l'ATP s'ha de mantenir a concentracions relativament altes (generalment 10 vegades per sobre la concentració d'AMP) a fi de poder garantir el funcionament dels processos metabòlics essencials. A tot l'organisme, també és crucial el manteniment d'un balanç entre l'aport d'energia i la demanda energètica. Recentment, ha sorgit un nou jugador en la regulació del balanç energètic, la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK). L'AMPK és un sensor dels nivells energètics cel·lulars i actua exercint una ràpida regulació sobre processos catabòlics i anabòlics amb l'objectiu de mantenir el *pool* cel·lular d'ATP. Aquesta proteïna quinasa respon a canvis en la relació AMP:ATP, indicador molt més sensible que la relació ADP:ATP si tenim en compte que la reacció catalitzada per l'adenilat quinasa ($2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$) es manté pròxima a l'equilibri en la majoria de cèl·lules eucariotes (Hardie and Hawley, 2001). Així, en situacions de depleció d'ATP, és a dir quan incrementen els nivells d'AMP, l'AMPK s'activa i actua inhibint els processos biosintètics, que consumeixen energia, i activant els processos que en generen. La regulació exercida per l'AMPK està mitjançada tant per canvis a curt termini, és a dir mitjançant l'activació o la inhibició d'enzims, transportadors i proteïnes quinases (Hardie and Carling, 1997), com a llarg termini alterant l'expressió de gens i de proteïnes (Leclerc et al., 1998; Woods et al, 2000; Ferré et al., 2003).

4.4.1. Estructura de l'AMPK.

L'AMPK és un complex heterotrimèric constituit per una subunitat catalítica, anomenada α, i dues subunitats reguladores (β i γ), cadascuna de les quals està codificada per dos o tres gens diferents (α1,2; β1,2; γ1,2,3) (Mitchelhill et al., 1994; Davies et al., 1994). El fet que totes les possibles combinacions entre les diferents isoformes semblin poder formar complexes, juntament amb les possibles variants d'*splicing* i l'ús alternatiu de promotors diferents, condueix a un immensa varietat de complexes AMPK actius. Tot i que només la quinasa de mamífer ha estat ben caracteritzada a nivell bioquímic, s'han trobat gens ortòlegs de les tres subunitats (α, β i γ), en totes les espècies d'eucariotes analitzades. Aquest fet suggereix que la formació del complex heterotrimèric és un requeriment essencial per les propietats funcionals i estructurals d'aquesta proteïna quinasa (Hardie et al., 2003).

Les subunitats catalítiques α (1 i 2) presenten a l'extrem N-terminal un domini típic de Ser/Thr quinasa amb característiques conservades entre la superfamília de proteïna quinases (Hanks et al., 1988). L'extrem C-terminal d'aquesta subunitat conté una regió d'aproximadament 150 aminoàcids implicada en l'associació amb les subunitats reguladores β i γ, mentre la regió intermitja de la proteïna (en el cas d'α1 residus 312-392) sembla estar associada a una funció inhibidora (Crute et al., 1998). La subunitat α presenta una sèrie de residus susceptibles de ser fosforilats tant *in vitro* com *in vivo*. Un d'aquests residus és la treonina 172 (T172) i la seva fosforilació és imprescindible per l'activitat de l'AMPK (Stein et al., 2000). La subunitat β, a més d'actuar de pont entre les altres dues subunitats, podria estar implicada en la unió d'aquesta proteïna al glicogen. En aquest sentit s'ha descrit la presència d'un domini GBD (*glycogen binding domain*), generalment present en enzims implicats en el metabolisme del glicogen i del midó, i s'ha demostrat que l'activació de l'AMPK en el múscul esquelètic està bloquejada en condicions de concentracions elevades de glicogen (Wojtaszewski et al., 2002). Finalment, la subunitat γ presenta quatre repeticions en tandem dels motius de seqüència anomenats CBS o de Bateman. Aquestes seqüències estan formades per 60 aminoàcids i es troben en diverses proteïnes de procariotes i eucariotes: l'acrònim deriva de l'enzim cistationina-β-sintasa. En el cas de l'AMPK aquests dominis repetits semblen estar implicats en la unió d'AMP, de manera que una mutació en aquests punts produeix la formació del complex intacte però inactiu (Scott et al., 2002; Daniel and Carling, 2002). En altres

proteïnes, els dominis CBS uneixen altres derivats d'adenosina com l'ATP o la S-adenosilmetionina, la característica comuna entre totes elles és la unió a un lligand que conté adenosina i que activa la seva funció. En totes aquestes proteïnes mutacions puntuals que interfereixin en la unió amb el lligand causen una àmplia varietat de malalties hereditàries, des de la retinitis pigmentosa fins a l'epilèpsia (Scott et al., 2002).

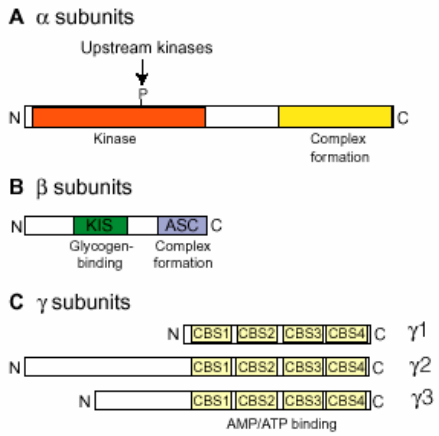

Figura 8: Dominis conservats de les tres subunitats necessàries per la formació del complex AMPK actiu.

4.4.2. Regulació de l'AMPK.

L'AMPK és activada per 5'-AMP a tres nivells diferents, i tots ells són antagonitzats per concentracions elevades d'ATP. En primer lloc, la unió a AMP produeix una activació alostèrica d'aquesta proteïna. S'ha descrit que la magnitud d'aquest efecte varia segons les diferents isoformes, així per exemple la isoforma catalítica α2 és més dependent de la concentració d'AMP, de manera que presenta una activació alostèrica superior a la isoforma α1 (Salt et al., 1998). En segon lloc la unió d'AMP fa que l'AMPK sigui un millor substrat per la seva quinasa *upstream*, és a dir, la quinasa que està per sobre d'ella en la cascada de senyalització (Hawley et al., 1996). Aquesta quinasa *upstream*, recentment identificada com el supressor tumoral LKB1 (Lizcano et al., 2004), activa l'AMPK mitjançant la fosforilació de la Thr^{172}, present a la subunitat catalítica α. Cal destacar, que la Thr^{172} i la seqüència del voltant es troben altament conservades en els ortòlegs de tots els eucariotes i la mutació del residu equivalent a la subunitat α de llevat (Snf1) produeix una pèrdua total de funció *in vivo* (Estruch et al., 1992). D'aquesta manera, encara que no es coneix del cert si la regulació alostèrica està conservada en tots els eucariotes, sí que s'ha pogut demostrar que la regulació per fosforilació és crítica i està conservada en totes les

espècies estudiades. Estudis previs havien posat de manifest que la quinasa LKB1 és un supressor tumoral i que mutacions en aquesta proteïna condueix a la pèrdua de la seva activitat, fet que té lloc en pacients del síndrome de Peutz-Jeghers, un desordre genètic autosòmic dominant caracteritzat per la presència de polips hamartomatosus (creixements benignes de teixits diferenciats) en el tracte gastrointestinal que predisposen al desenvolupament de tumors malignes (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998). Finalment, la unió d'AMP també afavoreix l'activitat de l'AMPK mitjançant un tercer mecanisme, ja que inhibeix la seva desfosforilació i inhibició per fosfatases (Davies et al., 1995).

Aquesta triple regulació per AMP fa que el sistema sigui extremadament sensible a aquest lligand. A més, altres fets contribueixen a la seva elevada sensibilitat com per exemple el tipus d'unió cooperativa a AMP que presenten els dominis de Bateman (Scott et al., 2002). Addicionalment s'ha descrit que la LKB1, la quinasa responsable de la seva fosforilació i activació, té una *Km* molt baixa per l'AMPK (Hardie et al., 1999). Totes aquestes observacions indiquen que petits canvis de les concentracions d'AMP poden produir respostes molt més àmplies, existint un efecte amplificador de la senyal. Aquesta elevada sensibilitat sembla ser un punt clau per tal que l'AMPK pugui mantenir l'estat energètic de la cèl·lula dins uns límits extremadament estrets i controlats.

Com s'ha comentat anteriorment, la proteïna quinasa dependent d'AMP és activada en situacions d'estrés, és a dir situacions en les quals els nivells d'ATP disminueixen, com és el cas de la privació de nutrients, l'estrés oxidatiu, la hipòxia i l'enverinament metabòlic. Aquestes serien doncs situacions d'estrés patològiques que interfereixen en la síntesi d'ATP, però en condicions d'estrés fisiològic com és el cas de l'exercici en el múscul esquelètic també s'observa l'activació d'aquesta proteïna (Hutber et al., 1997; Vavvas et al., 1997). Nombrosos estudis suggereixen que l'AMPK és un mitjançer important de les respostes metabòliques en resposta a l'exercici i en conseqüència aquesta proteïna quinasa sembla ser responsable de molts dels beneficis de l'exercici regular, fonamentals en els casos de prevenció i tractament de la obesitat i de la diabetis de tipus II. En efecte, dos dels principals tipus de fàrmacs usats habitualment en el tractament de la diabetis, biguanines com la metformina i thiazolonideniones, produeixen l'activació de l'AMPK (Zhou et al., 2001; Fryer et al., 2002).

4.4.3 Paper de l'AMPK en la regulació del metabolisme cel·lular.

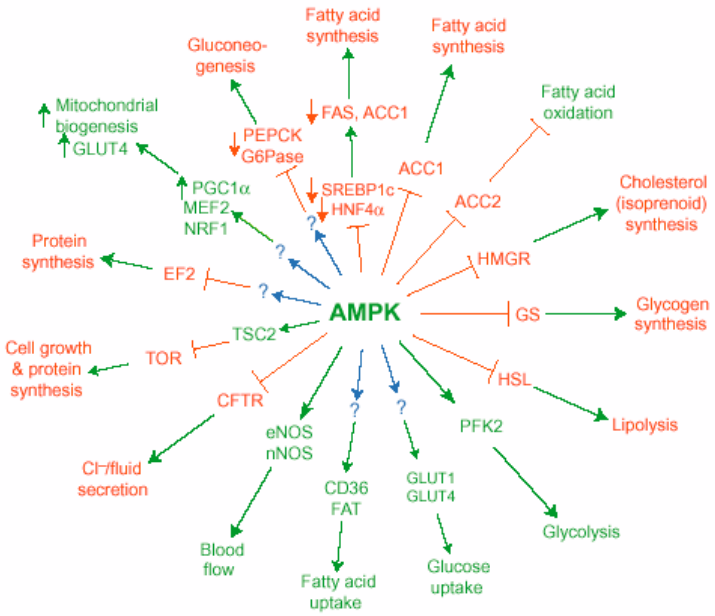

Figura 9: Dianes conegudes de l'AMPK.

- **Metabolisme de la glucosa.**

La captació de glucosa en el múscul esquelètic representa més del 70% del gast de glucosa en humans, aquest procés té doncs una vital importància en l'homeòstasi de la glucosa a nivell de tot l'organisme. Tant la contracció del múscul (Goodyear and Kahn, 1998) com la presència d'insulina (Ryder et al., 2001) estimulen la captació de glucosa mitjançant la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica. Evidències recents han posat de manifest que l'AMPK està implicada en la translocació de GLUT4 en resposta a l'exercici. Així, l'exercici físic o la contracció induïda de manera experimental produeixen una activació de l'AMPK i un increment del transport de glucosa per un mecanisme independent d'insulina (Winder and Hardie, 1999; Mu et al., 2001). Addicionalment s'ha observat que el tractament d'aquest teixit amb Aicar, activador farmacològic d'aquesta proteïna quinasa, també promou un increment del transport de glucosa, produït per la translocació de GLUT4 a la superfície cel·lular *in vitro* (Hayashi et al., 1998) i *in vivo* (Bergeron et al., 1999).

D'altre banda, el paper de l'AMPK en el transport de glucosa s'ha estudiat mitjançant un model de ratolí transgènic que sobreexpressa al múscul esquelètic i cardíac una forma mutada d'aquesta proteïna que actua com a dominant negatiu de

l'activitat endògena (Mu et al., 2001). En aquests animals no s'ha observat cap canvi de l'activitat basal de GLUT4, indicant que l'AMPK no juga un paper rellevant en la captació basal de glucosa. En canvi en condicions d'hipòxia, s'observa un bloqueig total de la translocació de GLUT4 i en el cas de la contracció també s'observa una disminució de l'increment de la captació de glucosa via aquest transportador. És a dir que l'AMPK sembla ser un intermediari imprescindible en la resposta de GLUT4 en condicions d'hipòxia. No obstant, en el cas de la contracció muscular, només transmetria una part d'aquest senyal. Tot i que aquesta regulació de GLUT4 és independent de la via de la insulina, s'ha demostrat que l'AMPK fosforila el receptor d'insulina IRS-1, el que indicaria que podria mitjançar l'increment de la sensibilitat a insulina que acompanya l'exercici (Jakobsen et al., 2001).

Contràriament, en cèl·lules derivades de teixit adipós 3T3-L1, l'Aicar inhibeix la translocació de GLUT4 induïda per insulina (Salt et al., 2000). Aquests resultats suggereixen que a diferència del múscul esquelètic, on l'estimulació de l'AMPK produeix un increment de la captació de glucosa per tal d'obtenir ATP, en els adipòcits aquesta proteïna quinasa inhibeix el transport de glucosa estimulat per insulina, a fi d'inhibir la síntesi de triacilglicerol i preservar l'estat energètic de la cèl·lula. D'altres estudis han demostrat que l'AMPK també estaria implicada en la regulació del transport de glucosa mitjançat per GLUT1, de manera que en condicions d'estrés metabòlic s'estimularien els transportadors GLUT1 situats a la superfície de la cèl·lula mitjançant un mecanisme dependent de l'AMPK (Barnes et al., 2002).

El fetge juga un paper central en el control de l'homeòstasi de la glucosa en mamífers, tot i que només és responsable del 30% del consum de glucosa (Pagliassotti and Cherrington, 1992). Zhou i col·laboradors han demostrat que l'Aicar, és a dir l'activació de l'AMPK, produeix una disminució de l'alliberament de glucosa per part dels hepatòcits (Zhou et al., 2001). D'altre banda, hi ha diversos estudis que posen de manifest el paper de l'AMPK en la regulació de l'expressió de molts gens implicats en el metabolisme de la glucosa i dels lípids en aquest teixit. En aquest sentit, s'ha demostrat que la sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de l'AMPK produeix canvis en els nivells d'expressió d'enzims que es troben generalment sota control de nutrients o d'hormones, com la insulina (Foretz et al., 1998; Leclerc et al., 1998; Woods et al., 2000). Aquests enzims inclouen la L-PK (isoforma hepàtica de la piruvat quinasa), la fosfoenolpiruvat quinasa i enzims del metabolisme lipídic dels quals es farà esment en el següent punt. Els factors de transcripció implicats en la

regulació de gens glicolítics i lipogènics regulats per insulina i glucosa han estat recentment descrits com SREBP-1c (*sterol-response-element binding protein 1c*) regulador clau de l'expressió de gens lipogènics, ChREBP (*carbohidrate-response-element binding protein*) i de HNF-4α (*hepatocyte nuclear factor 4alfa*), implicats en la regulació de l'expressió de GLUT2 i L-PK. Així, el tractament amb Aicar o la sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de l'AMPK produeix una disminució de l'activitat transcripcional de SREBP-1c, ChREBP i HNF-4α que produeixen tant una disminució de l'expressió de gens lipogènics com de GLUT2 i L-PK (Kawaguchi et al., 2001; Leclerc et al., 2001). Cal destacar que en aquestes condicions també s'observa una repressió de la via gluconeogènica produïda per una disminució de l'expressió de la G6Pasa (Barthel et al., 2002) i de la PEPCK (Lochhead et al., 2000; Hubert et al., 2000), resultant en una disminució de la producció de glucosa en el fetge.

- **Metabolisme lipídic.**

L'AMPK regula múltiples aspectes del metabolisme lipídic tant a curt termini com a llarg termini. Aquesta proteïna reguladora de l'estat energètic cel·lular produeix un increment de l'oxidació d'àcids grassos i una disminució de la lipogènesi promovent un increment dels nivells d'ATP, mitjançant l'acció sobre cinc enzims claus: l'AcetilCoA carboxilasa (ACC), la lipasa sensible a hormones (LH), la HMGCoA reductasa (HMGR), la glicerol fosfat aciltransferasa (GPAT) i la malonilCoA descarboxilasa (MDC) (Park et al., 2002; Wojtaszewski et al., 2002; Roepstorff et al., 2004).

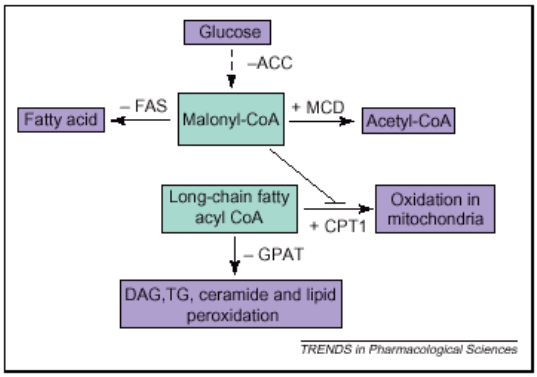

Figura 10. Regulació dels nivells de malonilCoA i àcids grassos de cadena llarga per l'AMPK.

Així, l'AMPK fosforila i en conseqüència inhibeix l'ACC, enzim limitant de la síntesi de malonilCoA (Hardie and Carling, 1997), a la vegada que afavoreix la degradació del malonil-CoA mitjançant l'activació de la MDC (Park et al., 2002). En

aquestes condicions, es produeix una disminució de la concentració de malonil-coA i s'incrementa l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos; com a conseqüència la concentració d'àcids grassos de cadena llarga és menys accessible a d'altres propòsits. A més, l'AMPK també inhibeix la síntesi de glicerolípids i ceramides mitjançant la inhibició de la GPAT (Muoio et al., 1999; Parks et al., 2002). Addicionalment, com s'ha comentat en l'apartat anterior quan l'AMPK està activa, s'inhibeix l'expressió de SREBP-1c que produeix un bloqueig de la síntesi de la FAS (àcid gras sintasa) i l'ACC, així com d'altres enzims que regulen la síntesi de lípids (Woods et al., 2000).

- **Regulació de la ingesta.**

Tot i que els primers estudis sobre l'AMPK es centraven en la seva regulació i funció en cèl·lules individuals, cada vegada hi ha més evidències que aquesta proteïna quinasa juga un paper central en la regulació del metabolisme energètic a tot l'organisme, responent a hormones adipocitàries com la leptina i l'adiponectina (Yamauchi et al., 2002; Wu et al., 2003). Així, la leptina activa l'AMPK en el múscul esquelètic produïnt un increment de l'oxidació dels àcids grassos, i l'adiponectina activa l'AMPK en el fetge i el múscul esquelètic incrementant la utilització de glucosa i l'oxidació d'àcids grassos a la vegada que inhibeix la producció de glucosa en el fetge (Minokoshi et al., 2002),.

L'hipotàlem és una de les regions del sistema nerviós central responsable de regular la gana. S'ha descrit que la leptina, hormona produïda en el teixit adipòs, produeix una disminució de la ingesta, i en canvi la ghrelina, sintetitzada a l'estómac, estimula la ingesta (Spiegelman et al., 2001). Recentment s'ha demostrat que la leptina, la insulina i nivells elevats de glucosa inhibeixen l'AMPK a diferents regions de l'hipotàlem (Andersson et al., 2004). Al contrari, la ghrelina produeix la fosforilació i activació d'aquesta proteïna quinasa (Andersson et al., 2004). Recentment, s'ha posat de manifest que l'activació farmacològica de l'AMPK, mitjançant l'administració d'Aicar (Mc Crimmon et al., 2004; Lee et al., 2005), o l'expressió d'una forma constitutivament activa de la proteïna a nivell de l'hipotàlam (Minokoshi et al., 2004) produeix un increment de la ingesta. Contràriament, l'expressió d'una forma mutada de l'AMPK que actua de dominant negatiu és suficient per reduir la ingesta i disminuir el pes dels animals (Minokoshi et al., 2004).

- **Regulació de la síntesi proteica i del creixement cel·lular.**

Estudis recents han demostrat que l'activació de l'AMPK inhibeix la síntesi proteica mitjançant la fosforilació de molts reguladors importants (Inoki et al., 2003; Horman et al., 2002; Cheng et al., 2004). Així, l'AMPK fosforila i activa TSC2, un supressor tumoral que regula negativament la síntesi proteica per dos mecanismes: per fosforilació directe (Cheng et al., 2004) i a través de la inhibició de mTor quinasa (Inoki et al., 2003). D'altre banda, també actua inhibint eEF2 (*elongation factor 2*) (Horman et al., 2002). La regulació de la TSC2 i la mTOR per aquesta proteïna quinasa pot tenir implicacions especials ja que la via de senyalització de PI3K-Akt està constitutivament activada en molt càncers, especialment aquells que presenten mutacions inactivadores del gen PTEN com per exemple glioblastomes, melanomes i càncer de pròstata i d'endometri avançants. Cal comentar que una conseqüència important de l'activació constitutiva de l'Akt és la fosforilació de la TSC2 a punts diferents d'on actua l'AMPK, fet que comporta una inhibició de la TSC2 de manera que s'activa la mTOR i incrementa la síntesi proteica (Luo et al., 2004).

Altres estudis que permeten relacionar l'AMPK amb el càncer provenen del fet que aquest enzim sembla modular l'activitat de la proteïna supressora de tumors p53 i l'inhibidor de cicle cel·lular p21 (Imamura et al., 2001). En aquest sentit, s'ha observat que l'Aicar inhibeix el creixement de les cèl·lules HepG2 i indueix l'expressió de p53 i en segon lloc de p21. Addicionalment, afavoreix la fosforilació de p53 en el domini de transactivació, fet que activa la proteïna i indueix l'apoptosi de les cèl·lules (Bode and Dong, 2004). És interessant comentar que l'AMPK purificada és capaç de fosforilar aquesta proteïna *in vitro*.

D'altre banda, Jimenez i col·laboradors han demostrat que l'expressió exògena de la LKB1 inhibeix el creixement cel·lular i promou un increment de la concentració de p21 en cèl·lules A549, derivades d'un adenocarcinoma de pulmó deficients per aquesta quinasa *upstream* de l'AMPK. Els mateixos autors han observat que més d'un terç dels pacients amb adenocarcinoma de pulmó esporàdic presenten mutacions inactivadores en el gen de la LKB1 (Jimenez et al., 2003). El mecanisme mitjançant el qual aquesta proteïna actua suprimint la tumorogènesi no es coneix, no obstant, en part podriar estar mitjançat per la inhibició de la PI3K i de la mTOR. També cal destacar, que s'han identificat 13 substrats de la LKB1, de manera que encara cal determinar si la seva funció supressora de tumors està mitjançada per l'AMPK

(Lizcano et al., 2004) tot i que el fet que estigui implicada en l'activació de la TSC2 per la LKB1 recolza aquesta possibilitat (Luo et al. 2004).

Tots aquests resultats, és a dir tant el paper de l'AMPK en la regulació de l'homeòstasi energètica intracel·lular com la seva implicació en el metabolisme energètic a nivell de tot l'organisme demostren el paper clau que juga aquesta proteïna quinasa dependent d'AMP en el balanç d'energia global. Addicionalment, l'AMPK també sembla estar implicada en el creixement i/o supervivència cel·lular i podria ser una nova diana en les teràpies del càncer.