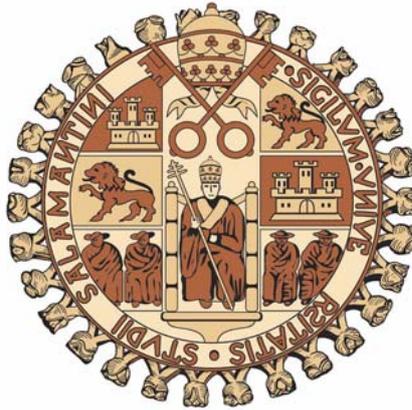


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS HEPÁTICAS.
IMPLICACIÓN EN LA ETIOLOGÍA DE LA
COLESTASIS Y LA RESISTENCIA A LA
QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL

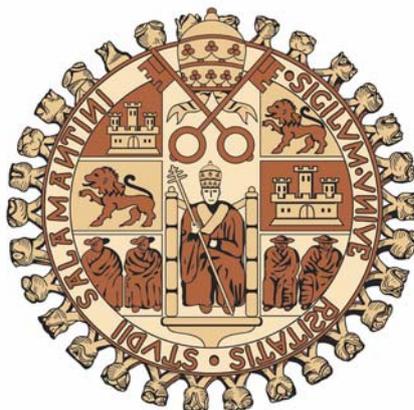
TESIS DOCTORAL

PABLO MARTÍNEZ BECERRA

2010

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE EXPRESIÓN DE
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS HEPÁTICAS.
IMPLICACIÓN EN LA ETIOLOGÍA DE LA
COLESTASIS Y LA RESISTENCIA A LA
QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL**

Memoria que presenta D. Pablo Martínez Becerra para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 3 de mayo de 2010

D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS HEPÁTICAS. IMPLICACIÓN EN LA ETIOLOGÍA DE LA COLESTASIS Y LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL", presentada por D. Pablo Martínez Becerra para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Drs. D. José Juan García Marín del Departamento de Fisiología y Farmacología y D. Oscar Briz Sánchez de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Salamanca

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 3 de mayo de 2010.

Fdo. Rafael Jiménez Fernández

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y D. OSCAR BRIZ SÁNCHEZ, INVESTIGADOR CONTRATADO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS HEPÁTICAS. IMPLICACIÓN EN LA ETIOLOGÍA DE LA COLESTASIS Y LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL”, presentada por D. Pablo Martínez Becerra para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 3 de mayo de 2010.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Oscar Briz Sánchez

El transporte de ácidos biliares y otros aniones orgánicos a través de epitelios que desempeñan un papel determinante en los procesos de absorción, como el intestino, o de secreción, como el hígado, está mediado en su mayor parte por proteínas transportadoras de membrana, entre las que se encuentran diferentes miembros de las familias de proteínas codificadas por la familia de genes *SLC10A* y *SLCO*.

Los genes *SLC10A1* y *SLC10A2* codifican los cotransportadores dependientes de un gradiente de sodio, NTCP (Na-taurocholate cotransporting polypeptide) y ASBT (apical sodium-dependent bile salt transporter), que juegan un papel clave en la captación de ácidos biliares por el hepatocito (NTCP) y por diversas células epiteliales como colangiocitos, enterocitos y células renales del túbulo contorneado proximal (ASBT).

Las proteínas codificadas por los genes *SLCO* se denominan OATP, de las iniciales en inglés para “organic anion transporting polypeptides. Las isoformas más importantes en lo que se refiere a la captación de ácidos biliares a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos humanos son OATP1B1 y OATP1B3. A pesar del interés de estos transportadores, aspectos importantes de su funcionamiento, como la estequiometría, la sensibilidad a la inhibición y la energética del transporte mediado por ellos no se conoce aún con exactitud.

Por todo ello nos planteamos como **objetivo global** de esta Tesis Doctoral profundizar en el estudio de varias cuestiones relativas al mecanismo de funcionamiento de estas proteínas transportadoras hepáticas con objeto de responder a varias preguntas de interés en áreas como la Fisiología, la Fisiopatología y la Farmacología. Esto nos ha llevado a definir tres objetivos parciales en el desarrollo de este trabajo:

Objetivo 1º: Investigar el mecanismo de transporte mediado por OATP1B1 y OATP1B3. Para ello hemos utilizado diferentes modelos experimentales que han permitido esclarecer aspectos relacionados con su dependencia de cambios de pH y potencial de membrana, su sensibilidad a activadores e inhibidores, así como proponer la energía que mueve el proceso de transferencia a través de la membrana plasmática.

Objetivo 2º: El incorrecto funcionamiento de los sistemas de transporte hepatobiliar de ácidos biliares es responsable de colestasis hepatocelular. En este objetivo se abordó la investigación del efecto de metabolitos sulfatados de progesterona, que se encuentran elevados durante la gestación normal y aún más en determinadas situaciones subclínicas (hipercolanemia asintomática de la embarazada) y clínicas (colestasis gestacional), sobre los procesos de captación hepática de ácidos biliares que, junto a la inhibición de los procesos de secreción a nivel canalicular, podrían estar implicados en la etiopatogenia de diferentes grados de colestasis hepatocelular en estas pacientes.

Objetivo 3º: Un aumento o una disminución en la actividad transportadora de diversos miembros de las familias de transportadores hepatobiliares expresados en tumores hepáticos puede condicionar el contenido intracelular de fármacos citostáticos y afectar a la respuesta al tratamiento antitumoral. Por ello, en el tercer objetivo de este trabajo nos propusimos desarrollar una herramienta rápida y automatizable para la evaluación del perfil génico del transportoma en tumores hepáticos y digestivos. Dado que la herramienta utilizada TLDA lo permitía decidimos ampliar el estudio a otras familias de genes implicados en los diferentes mecanismos de quimiorresistencia para poder predecir la falta de respuesta a un determinado tratamiento antitumoral. Este tipo de análisis individualizado puede ser de gran utilidad clínica pues podría evitar la aplicación de terapias estandarizadas que en un determinado paciente no sólo no tendrían efecto antitumoral sino que además podrían inducir una selección de las células más quimiorresistentes y agresivas, lo que limitaría el posible éxito de sucesivas intervenciones farmacológicas.

2.1. EL HÍGADO

2.1.1. Anatomía e Histología

El hígado es la víscera más voluminosa del organismo (representa un 2,5% del peso de un adulto sano) y una de las más importantes en cuanto a actividad metabólica. Está localizado en la región del hipocondrio derecho del abdomen. Macroscópicamente está dividido en tres lóbulos. Normalmente es de consistencia blanda y depresible, y está recubierto por una cápsula fibrosa.

Las células mayoritarias en el hígado son los hepatocitos, que se disponen dejando entre sí espacios vasculares heterogéneos llamados sinusoides. Además de éstos, encontramos otros espacios intercelulares, los canalículos biliares, formados por invaginaciones de la membrana de los hepatocitos. Los canalículos biliares convergen en conductillos y éstos en conductos biliares contenidos en los espacios porta, que contienen también vasos linfáticos y paquetes nerviosos (Feldmann, 1986). Los hepatocitos son células poliédricas con ocho o más caras, que miden entre 13 y 30 μm de diámetro, siendo la media de 25 μm (Feldmann, 1986). Representan alrededor del 60% de las células en el hígado y ocupan casi el 80% del volumen parenquimal. Poseen una polaridad muy marcada, que determina su orientación respecto al sinusoides. Su membrana plasmática posee tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Evans et al., 1980; Meier, 1988). Estas regiones son:

- Membrana sinusoidal: orientada hacia el polo sanguíneo (espacio de Disse). Esta membrana está formada por microvellosidades que crean una elevada superficie de intercambio.
- Membrana lateral: es la membrana situada entre hepatocitos colindantes; presenta un número menor de microvellosidades y además son más cortas que en la membrana sinusoidal. Contiene estructuras celulares cuya función es mantener la conexión mecánica y funcional entre los hepatocitos adyacentes como las “tight junctions”, desmosomas y “gap junctions” (Meier, 1988).
- Membrana canalicular: es una invaginación de la superficie de la membrana plasmática del hepatocito, que al unirse a la del hepatocito adyacente,

forma el canalículo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular.

Además de los hepatocitos, en el hígado existen células endoteliales fenestradas (que recubren los sinusoides hepáticos y permiten un intercambio directo entre la sangre y los hepatocitos), células epiteliales biliares (que recubren los canalículos), células de Ito (células estrelladas que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan diferentes factores de crecimiento) y células de Kupffer, responsables de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas que accedan al sinusoides (Guyton, 2000; Michalopoulos and DeFrances, 1997).

2.1.2. Funciones

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo:

- Metabolismo de hidratos de carbono: homeostasis de la glucosa sérica, catabolismo de hexosas, gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis.
- Metabolismo de lípidos: síntesis y catabolismo de colesterol, producción de triglicéridos y ácidos grasos, síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, β -oxidación de ácidos grasos, producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Metabolismo de proteínas: síntesis de proteínas plasmáticas, transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas, interconversión de aminoácidos no esenciales.
- Producción de bilis: el hígado excreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión de los alimentos y absorción de nutrientes.
- Síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI. También sintetiza el grupo hemo.
- Depósito de múltiples sustancias como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- Destoxificación y otras reacciones de biotransformación: en mamíferos adultos el hígado es el responsable de la eliminación a bilis de un gran número de compuestos con estructuras químicas diferentes denominados

compuestos colefílicos. Algunos de ellos son endógenos, como los ácidos biliares (ABs) y pigmentos biliares hemoderivados; mientras que otros muchos son xenobióticos.

Recientemente se ha descrito que los ABs funcionan como señalizadores, con funciones sistémicas endocrinas. Son capaces de activar cascadas de proteínas activadoras de mitógenos (MAPK, de “mitogen-activated protein kinases”) (Qiao et al., 2003), son ligandos del receptor acoplado a proteínas G TGR5 (Kawamata et al., 2003) y activan receptores hormonales nucleares como FXR (de “farnesoid X receptor”) (Houten, 2006).

2.2. LOS ÁCIDOS BILIARES

2.2.1. Introducción

Los términos “ácidos biliares” y “sales biliares” suelen utilizarse indistintamente; sin embargo, indican situaciones diferentes del estado de ionización de estas moléculas. Sales biliares son las formas ionizadas solubles (aniones que aparecen en bilis acompañados de sodio o potasio), mientras que los ácidos biliares son las formas no ionizadas. Hecha esta puntualización y como en los fluidos biológicos la mayor parte de estas moléculas se encuentra en forma aniónica (Hofmann, 1988), en este texto se incluirán ambas formas moleculares bajo el término de ácidos biliares.

2.2.2. Estructura química de los ácidos biliares

Los ABs son ácidos carboxílicos sintetizados en el hígado por saturación e hidroxilación del núcleo de colesterol y ruptura oxidativa de su cadena lateral. En contraste con el colesterol (insaturado, monohidroxilado, apolar y con 27 átomos de carbono), la mayor parte de los ABs son esteroides de 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede ser conjugado con glicina o taurina (Hofmann, 1999). En su mayoría son compuestos anfipáticos con dos regiones claramente diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica, lo que les confiere propiedades detergentes.

El núcleo esteroide de los ABs se caracteriza por el número y posición variable de los grupos hidroxilo y en determinadas situaciones por la presencia de dobles enlaces. La base del núcleo esteroide es el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno, que consta de 3 anillos de 6 átomos de carbono (A, B y C) y uno de 5 carbonos (D) (figura 1). Una característica estructural común a todos los ABs y al colesterol, es la presencia de 3 grupos metilo, situados en C10, C13 y C21 (figura 1). La relativa constancia del núcleo esteroide contrasta con la variedad de las sustituciones que puede sufrir. En la mayoría de los mamíferos la hidroxilación más frecuente suele tener lugar en los C3, C6, C7 ó C12. Las hidroxilaciones suelen ser en posición α o β .

En humanos adultos el núcleo está curvado porque los anillos A y B se encuentran en planos perpendiculares, cuando el H del C5 se dispone en posición β ; a estos ABs se les denomina 5β -ABs. En vertebrados inferiores aparecen ABs y algunos alcoholes biliares en los que los anillos A y B se encuentran en el mismo plano, es decir, con el H del C5 en posición α ; a estos se les llama 5α -ABs, ABs planos o *allo*-ABs.

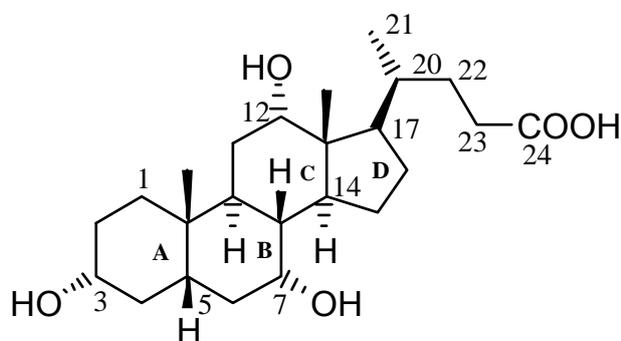


Figura 1. Molécula de un ácido biliar típico: el ácido cólico.

Los ABs insaturados por la presencia de un doble enlace entre C4 y C5 ó entre C5 y C6 también adoptan forma plana similar a la de los *allo*-ABs. Los ABs planos se encuentran en fetos humanos sanos y en adultos con ciertos errores congénitos del metabolismo de los ABs o asociados a ciertas patologías hepáticas. De esta forma, se ha visto que en pacientes con hepatocarcinoma celular (HCC) las concentraciones séricas de ABs planos con insaturación entre C4 y C5, así como la tasa de eliminación renal de los mismos, son elevadas. Los ABs planos aparecen

también durante la hepatocarcinogénesis experimental siendo los *allo*-ABs más abundantes durante la formación de adenomas y los ABs insaturados, durante la formación de carcinomas (El-Mir et al., 2001).

La cadena lateral generalmente tiene 5 átomos de carbono y termina en un grupo carboxilo (Figura 1). Se encuentra unida al anillo D en la posición del C17. La cadena lateral suele presentar un grupo metilo en el C20, por lo tanto la mayoría de los ABs están formados por 24 átomos de carbono. Sin embargo, en ciertas patologías como el síndrome de Zellweger, se han descrito ABs con la cadena lateral de 8 C.

2.2.3. Circulación enterohepática de los ácidos biliares

La síntesis de los ABs tiene lugar en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos, desde donde son secretados a bilis. Los ABs alcanzan el intestino con la bilis, y una vez allí, después de realizar su función de emulsión, digestión y absorción de grasas de la dieta, son reabsorbidos en el íleon. Finalmente son recaptados por los hepatocitos desde la sangre portal, completándose así la llamada circulación enterohepática, que comprende el circuito hepatocito - bilis - intestino - sangre portal - hepatocito. En este ciclo se intercala la vesícula biliar, donde se almacenan y concentran los ABs por reabsorción de H₂O y electrolitos. Allí permanecen a la espera de un estímulo adecuado como la ingesta de alimentos, especialmente si son ricos en grasas, lo que hace que se libere la colecistoquinina, hormona que estimula el vaciamiento. Al alcanzar el íleon, la mayoría de ellos son reabsorbidos activamente, pero un porcentaje de ellos se recaptan pasivamente en el yeyuno (ABs dihidroxilados conjugados con glicina) (Angelin et al., 1976) y otra fracción se reabsorbe pasivamente en el colon (ABs libres desconjugados por las bacterias intestinales) (Mekhjian et al., 1979). Esta eficaz recaptación hepática consigue que sólo se pierdan diariamente entre 50 y 500 mg de estas moléculas, lo que constituye menos del 5% del total, que suele ser de 3 a 5 g.

2.2.4. Biotransformaciones de los ácidos biliares

Los ácidos cólico (AC) y quenodesoxicólico son los denominados ABs primarios, pues son sintetizados directamente en el hígado. Sin embargo, en su paso por el

intestino, los ABs primarios son modificados por las bacterias de la flora intestinal, algunas de las cuales poseen una fuerte actividad 7α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, de manera que a partir del AC se origina el ácido desoxicólico (ADC) y a partir del ácido quenodesoxicólico, el ácido litocólico, que son ABs secundarios carentes del correspondiente grupo OH en posición 7α .

Normalmente, los ABs se encuentran conjugados con glicina y taurina (en humanos adultos la relación entre conjugados con glicina y taurina es de 3 a 1). Los enlaces amida, formados entre una molécula de AB y uno de estos dos aminoácidos, son resistentes a la acción hidrolítica de las carboxipeptidasas pancreáticas (Huijghebaert and Hofmann, 1986). Además, los ABs pueden conjugarse con sulfato, ácido glucurónico, o N-acetilglucosamina, pero no con glutatión (GSH, en su forma reducida; GSSG, en su forma oxidada). En situaciones de colestasis, tanto la sulfatación como la glucuronidación de los ABs se incrementan con objeto de formar especies más hidrosolubles que puedan ser eliminadas más fácilmente por orina (Stiehl, 1977).

2.2.5. Funciones de los ácidos biliares

En el intestino:

- 1) Los ABs juegan un importante papel en la digestión y la absorción intestinal de las grasas de la dieta y de las vitaminas liposolubles (A, E, D y K), formando micelas que permiten su emulsión.
- 2) Activan las lipasas intestinales.
- 3) Aceleran el transporte de lípidos.
- 4) Modulan la motilidad intestinal y la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes et al., 1992).
- 5) Inducen además la secreción de agua y electrolitos.

En el hígado:

- 1) Generan la fracción del flujo biliar dependiente de ABs, que es el resultado del efecto osmótico de estas moléculas en la luz canalicular, como consecuencia del transporte de dichas moléculas a través del hepatocito y su secreción desde el interior del mismo a la bilis.

- 2) Los ABs estimulan la contracción canalicular, que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar.
- 3) Inducen la secreción biliar de lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol.
- 4) Modulan, al menos en parte, la biosíntesis de colesterol, ya que cuando aumenta la síntesis de estas moléculas origina un aumento también en la síntesis o en la utilización de colesterol como molécula precursora.
- 5) Regulan el número de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que determinan a la larga los niveles de estas moléculas en el plasma.

En la bilis:

- 1) Forman micelas para transportar sustancias hidrofóbicas como el colesterol, las protoporfirinas, etc.
- 2) Actúan como soluciones amortiguadoras para el Ca^{2+} (Hofmann, 1988).

Además están implicados en otros procesos de naturaleza muy variada como la activación de los mastocitos (Quist et al., 1991), la estimulación de la captación intestinal de hierro (Sanyal et al., 1990), y el control de la liberación de hormonas gastrointestinales (Izokura et al., 1991). Por otra parte, estas moléculas tienen un posible papel en la proliferación celular en aquellos tejidos donde se encuentran en concentraciones elevadas (Marin et al., 1993). También se ha estudiado la posible acción genotóxica de los ABs, y se ha observado que los ABs secundarios generados por transformación bacteriana tienen un poder genotóxico mayor que los ABs primarios producidos por el hígado, lo que parece estar relacionado con el mayor o menor carácter hidrofóbico de los mismos (Rosignoli et al., 2008). Sin embargo, un AB terciario como es el ácido ursodesoxicólico (AUDC), posee gran interés terapéutico. Este AB difiere del ácido quenodesoxicólico, mucho más tóxico, sólo en la orientación ecuatorial del grupo 7β -hidroxilo, sin embargo, esta propiedad le permite ser marcadamente más hidrofílico que otros ABs (Perez and Briz, 2009). Por ello, se utiliza en la disolución de cálculos biliares en la vesícula (Portincasa et al., 2009) y en el tratamiento de la cirrosis biliar primaria (Gong et al., 2008).

2.3. TRANSPORTE DE ÁCIDOS BILIARES

Los procesos de transporte en el hepatocito desempeñan un papel fundamental en la homeostasis hepática de los ABs, ya que a pH fisiológico, tanto en sangre como dentro de las células, la mayoría de los ABs se encuentran en forma aniónica (Hofmann, 1998). En esta forma la difusión a través de las membranas lipídicas se dificulta; si bien algunos ABs con elevado pKa pueden atravesar las membranas, la mayoría requiere de transportadores específicos de membrana.

En el proceso de recaptación de ABs de la circulación sanguínea por el hepatocito participan principalmente dos grupos de proteínas (figura 2): unas que pertenecen a la familia de transportadores *SLC10A* y que median la captación de ABs dependiente de Na^+ , y otras, de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), del inglés “organic anion transporting polypeptides”, que llevan a cabo el transporte de ABs independiente de Na^+ . La secreción canalicular de ABs tiene lugar gracias a transportadores miembros de una superfamilia de proteínas denominadas ABC, del inglés “ATP-Binding Cassette” (Muller and Jansen, 1997) (figura 2).

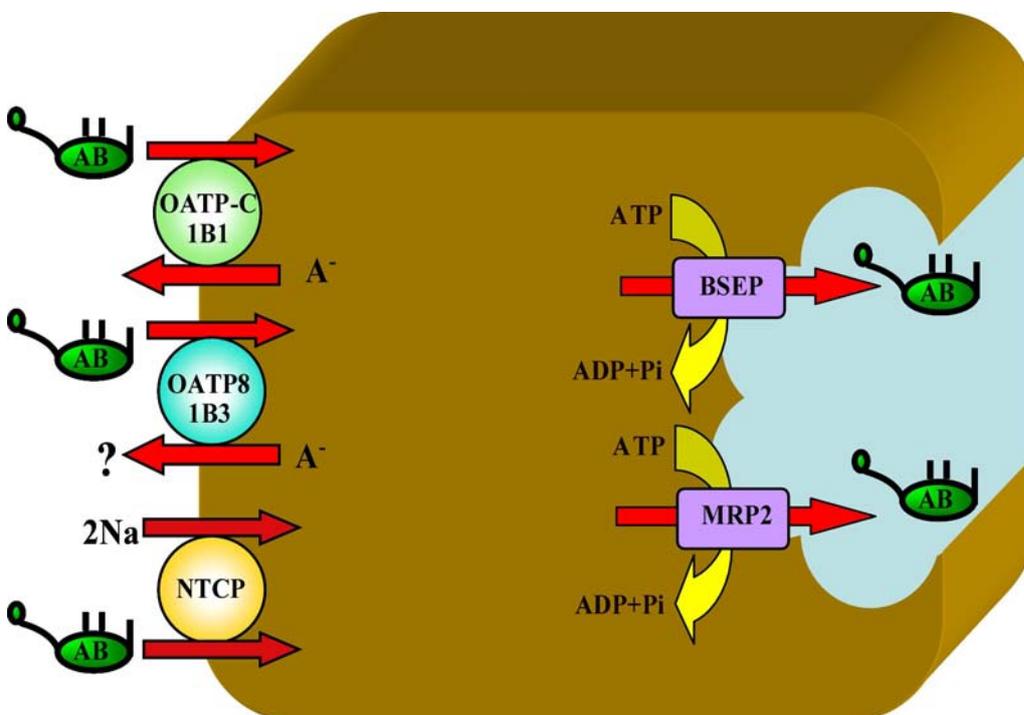


Figura 2. Transportadores de ácidos biliares en el hepatocito humano.

2.3.1. Captación de ácidos biliares dependiente de sodio

La entrada de ABs conjugados al hepatocito por su membrana sinusoidal se lleva a cabo fundamentalmente gracias a un sistema electrogénico de cotransporte con sodio que realiza mas del 80% del transporte de ácido taurocólico (ATC). La proteína transportadora implicada en este proceso es el polipéptido cotransportador de Na⁺ y taurocolato o NTCP, en humanos, y Ntcp, en roedores, del inglés “Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide”, que pertenece a la familia de proteínas *SLC10A*.

NTCP (*SLC10A1*) es una glicoproteína de aproximadamente 50 kDa y 362 aminoácidos, con 7 regiones hidrofóbicas transmembrana (Hagenbuch and Meier, 1996), que comparte un 77% de homología con Ntcp de rata. NTCP, tiene además unas propiedades funcionales muy similares a Ntcp, aunque presenta mayor afinidad por el ATC que este último (Hagenbuch et al., 1991). Ambos se caracterizan por realizar un transporte unidireccional con una estequiometría Na⁺/ATC de 2:1. El gradiente de Na⁺ necesario se debe a la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa presente en la membrana sinusoidal del hepatocito (Meier, 1989). Funcionalmente, Ntcp es capaz de transportar cualquier AB: el ATC, el ácido glicocólico (AGC), el ácido tauroquenodesoxicólico (ATQDC), el ácido tauroursodesoxicólico (ATUDC), etc. Aunque su afinidad es mayor para los conjugados de glicina y taurina di y trihidroxilados. Aunque transporta fundamentalmente ABs, también es capaz de transportar otros muchos compuestos como estrógenos conjugados, bromosulfoftaleína (BSP), dehidroepiandroesterona sulfato y hormonas tiroideas.

El NTCP se relaciona estructuralmente con otros miembros de la familia de proteínas *SLC10A*, como el transportador ileal de ABs o IBAT, del inglés “ileal bile acid transporter”. También se le denomina ASBT (*SLC10A2*), del inglés “apical sodium-dependent bile acid transporter”. Está presente en la membrana apical de ileocitos (Craddock et al., 1998) y, en menor medida, en el túbulo proximal renal y en los colangiocitos.

2.3.2. Los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs)

El principal sistema encargado de la recaptación de ABs es el formado por la familia de OATPs (Hagenbuch and Meier, 2003). La familia de genes se denomina *SLC21* o, de acuerdo con la nueva nomenclatura adoptada por la “HUGO Gene nomenclature committee”, *SLCO* (Hagenbuch and Meier, 2004). Se considera que esta familia es filogenéticamente más primitiva que la familia *SLC10A*, aunque se caracteriza por una mayor versatilidad, ya que puede transportar una amplia variedad de compuestos diferentes estructuralmente, entre los que se encuentran ABs, bilirrubina conjugada (Cui et al., 2001) o no conjugada (Briz et al., 2003b), hormonas esteroideas y muchos fármacos (Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004), entre los que destacan algunos de acción citostática como el metotrexato (Badagnani et al., 2006) o el irinotecán. Es por ello que se ha estudiado el posible papel de estos transportadores en la resistencia a la quimioterapia en ciertos tipos de cáncer, como ya veremos más adelante.

2.3.2.1. OATPs en hígado humano que transportan ácidos biliares

En los hepatocitos humanos se han descrito tres isoformas de OATPs implicadas en el transporte de ABs: OATP-A, OATP-C y OATP8, que con la nueva nomenclatura se han pasado a denominar OATP1A2 (*SLCO1A2*), OATP1B1 (*SLCO1B1*) y OATP1B3 (*SLCO1B3*) (Hagenbuch and Meier, 2004).

El OATP1A2 consta de 670 aminoácidos, 12 dominios transmembrana y 7 potenciales sitios de glicosilación (Kullak-Ublick et al., 1995). Está presente en hígado, intestino, riñón, pulmón, cerebro y testículos, principalmente (Kullak-Ublick et al., 1995). Transporta ABs no conjugados, como el AC, conjugados como el ATC, y aniones orgánicos divalentes como la bilirrubina y el verde de indocianina (Kullak-Ublick, 1994), aunque su expresión es baja en hepatocitos adultos (Briz et al., 2003b), por lo que tiene poca relevancia en la captación de ABs de la sangre sinusoidal. Este transportador se encuentra, además, involucrado en la captación de una amplia variedad de sustratos de carácter anfipático, incluyendo gran cantidad de fármacos (Hagenbuch and Meier, 2004).

Otro miembro de la familia OATP es el OATP1B1 (Abe et al., 1999), también llamado anteriormente LST-1, OATP2 u OATP-C. Este transportador presenta una

homología del 62% con Oatp1b2 de rata y se expresa de forma casi exclusiva en el hígado. OATP1B1 parece ser el principal transportador hepático de aniones orgánicos en humanos. Además de ABs, posee un espectro amplio de especificidad de sustrato, transportando también esteroides conjugados, eicosanoides y hormonas tiroideas. Aunque presenta una elevada superposición de sustratos transportados con respecto a los otros OATP, una de sus propiedades exclusivas, es la capacidad de transportar bilirrubina no conjugada (Cui et al., 2001).

También pertenece a esta familia el transportador OATP1B3, que presenta una similitud estructural del 80% con respecto a OATP1B1. Diversos experimentos en los que se transfectaron células de mamífero con el ADNc del OATP1B3 evidenciaron que los ABs no eran reconocidos como sustratos de esta proteína, aunque compartía afinidad con el OATP1B1 por la BSP (Cui et al., 2001). Finalmente los ABs fueron identificados como ligandos de baja afinidad mediante estudio en el modelo de oocitos de *Xenopus laevis* (Kullak-Ublick et al., 2001). El OATP1B3 se expresa en la membrana basolateral de los hepatocitos (Konig et al., 2000) y en la membrana basal del trofoblasto (Briz et al., 2003b; St-Pierre et al., 2002), por lo que podría jugar un papel importante en la captación de ABs de sangre fetal por la placenta.

Además de los transportadores mencionados anteriormente no se puede descartar la participación de otros sistemas (pertenecientes o no a la familia OATP) en la captación de ABs. Por ejemplo el OATP4A1 (anteriormente denominado OATP-E), cuyo ARNm se ha detectado en hígado humano, se ha definido como un transportador de hormonas tiroideas aunque se ha visto que también interviene en la captación de ABs (Fujiwara, 2001).

2.3.2.2. Oatps en hígado de rata que transportan ácidos biliares

En el hígado de rata se han descrito varias isoformas de Oatps con capacidad de captar ABs: Oatp1, Oatp2 y Oatp4, que con la nueva nomenclatura se denominan: Oatp1a1 (*Slco1a1*), Oatp1a4 (*Sclo1a4*) y Oatp1b2 (*Sclo1b2*).

La isoforma de rata Oatp1a1 es uno de los miembros más representativos y mejor caracterizados por ser el primer miembro de la familia de los OATPs/Oatps en ser clonado (Jacquemin et al., 1994). Se trata de una glicoproteína con un peso

molecular de 80 kDa formada por 670 aminoácidos y 12 dominios transmembrana hidrofóbicos que presenta unas características similares a la isoforma OATP1A2 humana. Además de expresarse en la membrana basolateral del hepatocito, se expresa en el riñón (Van Aubel et al., 2000) y en las células epiteliales del plexo coroideo (Angeletti et al., 1997).

Oatp1a4 es una glicoproteína de 92 kDa formada por 661 aminoácidos y 12 dominios hidrofóbicos transmembrana. Además de encontrarse en la membrana basolateral del hepatocito, se expresa en la retina, células endoteliales, barrera hematoencefálica y plexos coroideos (Gao et al., 1999; Reichel et al., 1999; Soroka et al., 2001). Presenta una similitud del 77% con Oatp1a1 aunque difiere en la menor afinidad por los aniones orgánicos mientras que presenta preferencia por compuestos neutros. Destaca su elevada afinidad por la ouabaína así como por ser la única proteína capaz de transportar digoxina. Un aspecto importante a tener en cuenta es que Oatp1a1 y Oatp1b2 difieren además en cuanto a su localización en el hepatocito, ya que Oatp1a1 muestra una distribución lobular homogénea, mientras que Oatp1b2 aparece predominantemente en hepatocitos perivenosos (Baier et al., 2006).

El tercer componente de la familia es Oatp1b2, que comparte un 43% de identidad con Oatp1a1 y un 44% con Oatp1a4. La proteína Oatp1b2 transporta preferentemente ATC y se expresa casi exclusivamente en hígado (Meier and Stieger, 2002).

2.3.2.3. Mecanismo de transporte de OATPs/Oatps

Basándose en el análisis comparativo de OATPs típicos, algunos autores han propuesto un modelo estructural representativo para estos transportadores, que en esencia consiste en un poro central cargado positivamente a través del cual el sustrato es traslocado. Sin embargo, este análisis no establece si el transporte está dirigido por el intercambio o cotransporte con otras moléculas o el sustrato simplemente difunde a través de este poro central (Meier-Abt et al., 2005). Estudios con cultivos de células de origen hepático demostraron que la captación de ATC y BSP era estimulada por un gradiente de pH hacia el exterior celular, sugiriendo que la fuerza motriz del transporte por OATPs era el gradiente de H^+ o un intercambio con OH^- o bicarbonato (Satlin et al., 1997). Es por ello, que se acepta que el

transporte mediado por OATPs/Oatps no genera un flujo de corriente neta. Estudios con cultivos de células de origen hepático demostraron que la captación de ATC y BSP era estimulada por un gradiente de pH hacia el exterior celular (Satlin et al., 1997). Se ha sugerido también la posible participación del GSH y del bicarbonato en el mecanismo de funcionamiento de algunas isoformas pertenecientes a la familia OATP (Li et al., 1998a; Satlin et al., 1997).

En cuanto a la isoforma de rata Oatp1a1, se ha descrito que el mecanismo de transporte es electroneutro, pero dependiente de pH. En células HeLa transfectadas con Oatp1a1, se encontró una estimulación de la captación de diversos sustratos de la proteína por los protones extracelulares (Kanai et al., 1996). Otros estudios con la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 indicaron que el transporte de ABs se encontraba dirigido por el pH debido a cambios en las fuerzas motrices de los transportadores, y en particular a la respuesta a la protonación de las proteínas implicadas en el proceso (Marin et al., 2003) (Figura 3). Utilizando estas mismas células se ha demostrado que los niveles intracelulares de GSH modulan tanto la captación como el eflujo de aniones orgánicos colefilicos (Lee et al., 2001). El eflujo de GSH o sus conjugados desde el interior celular podría activar también la captación de sustratos mediada por otra isoforma de esta familia como es el Oatp1a4 (Li et al., 2000) Se ha sugerido además que este transportador se comporta como un intercambiador aniónico, que trabaja acoplando la captación de aniones orgánicos al eflujo de bicarbonato (Satlin et al., 1997). Un hecho importante es que el transporte mediado por Oatp1a1 y Oatp1a4 puede ser potencialmente bidireccional (Shi et al., 1995), lo que implica que la direccionalidad del transporte dependería del gradiente local del sustrato.

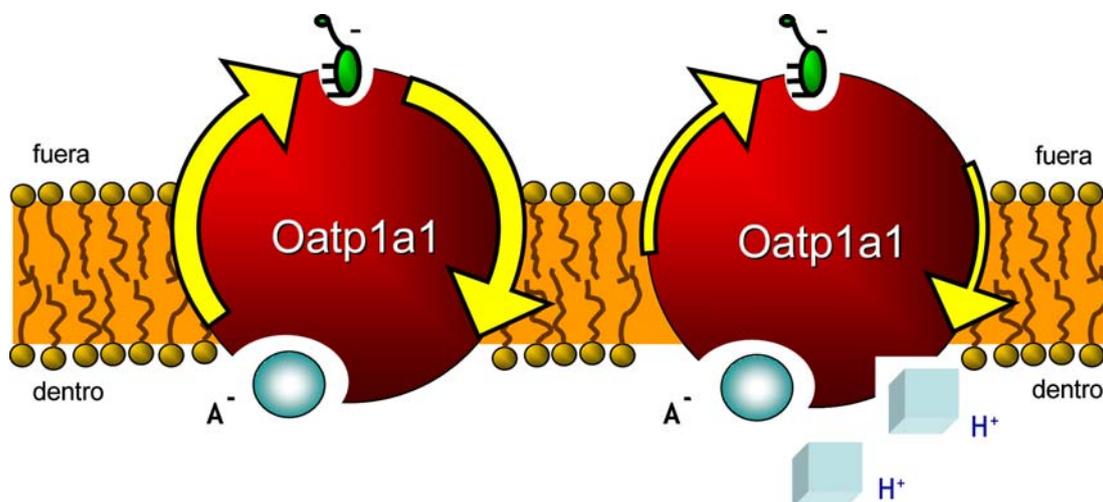


Figura 3. Mecanismo de transporte propuesto para Oatp1a1.

Con respecto a los transportadores OATPs humanos, se ha propuesto que OATP1A2 participa en la captación de metotrexato, un conocido fármaco antitumoral, mediante un mecanismo dependiente del pH extracelular (Badagnani et al., 2006). En este mismo estudio se caracterizó también el efecto del pH sobre el transporte de otro sustrato como es la estrona sulfato ($pK_a \approx 2$), cuya captación se incrementó hasta cuatro veces a un pH extracelular de 5, demostrando así que el efecto activador del pH se debía principalmente a un efecto específico sobre la proteína y no sobre el estado de protonación del sustrato. Independientemente del mecanismo de activación, el descubrimiento de que el transporte de metotrexato es activado a pH ácido es de gran relevancia clínica, ya que el pH luminal del intestino y del riñón, donde se expresa OATP1A2, se encuentra en el rango de 4-7 y de 4,5 a 8 respectivamente.

Otro miembro de la familia OATP, OATP2B1 (anteriormente denominado OATP-B), es capaz de transportar aniones orgánicos, incluyendo ácidos débiles como el benzoico, láctico, nicotínico y el ácido salicílico (Nozawa et al., 2004), pero no ABs (Kullak-Ublick et al., 2001). El OATP2B1 posee un mecanismo consistente en un intercambio aniónico acoplado al transporte de protones y dependiente, por tanto, del pH. Además, el gradiente de GSH no parece ser la fuerza motriz que dirija la captación de sustratos por OATP2B1 (Nozawa et al., 2004). En este sentido, se ha descrito que el OATP2B1 es sensible al pH, por lo que podría desempeñar un papel dual según el pH local, ya que a pH fisiológico no capta ABs pero una acidificación del medio le confiere capacidad de transportar un AB típico como es el ATC.

2.3.3. Secreción canalicular de ácidos biliares

La transferencia canalicular representa el paso limitante en el conjunto de procesos de transporte de los ABs desde la sangre hasta la bilis (Erlinger, 1982; Meier et al., 1987). Es un proceso dependiente de ATP realizado por las proteínas transportadoras ABC. Se han caracterizado más de 48 genes ABC en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean, 2005). Las proteínas ABC están formadas por cuatro dominios, dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos ("Nucleotide-binding domains"). Mientras que los dominios de unión a nucleótidos son responsables de la unión e hidrólisis del ATP, y consecuentemente responsables de generar la fuerza motriz para el transporte, los

dominios transmembrana median el transporte vectorial de los sustratos a través de las membranas celulares. En función de su estructura, los transportadores ABC también se denominan “full transporters”, cuando contienen los cuatro dominios, o “half transporters”, cuando sólo están formados por un dominio de unión a ATP y un dominio transmembrana, por lo que requieren ensamblarse con otro “half transporter” formando homodímeros o heterodímeros para dar lugar al transportador funcional con la estructura completa. Los primeros se localizan en la membrana plasmática mientras que los segundos se encuentran generalmente en membranas intracelulares (Litman et al., 2001). Dependiendo de su localización en la membrana plasmática de los hepatocitos, los transportadores ABC se pueden dividir en transportadores de fase IIIa, aquellos responsables del eflujo de compuestos a la bilis, o transportadores de fase IIIb, que se encuentran localizados en la membrana basolateral y expulsan compuestos a la circulación general. Dentro de los transportadores de fase IIIa destacan varios miembros de las subfamilias de genes ABCB, ABCC y ABCG. Por el contrario, los transportadores de fase IIIb más relevantes pertenecen únicamente a la subfamilia ABCC. Como veremos más adelante, la sobreexpresión de algunos miembros de esta superfamilia en células tumorales constituye uno de los principales obstáculos de la terapia antitumoral. De momento, sólo trataremos aquí las isoformas con capacidad transportadora de ABs:

La bomba exportadora de sales biliares o BSEP (*ABCB11*) es el principal mecanismo de secreción de ABs a bilis (Gerloff et al., 1998). Esta proteína utiliza la energía que proporciona la hidrólisis del ATP para transportar ABs monoaniónicos a través de la membrana canalicular (Byrne et al., 2002). Existen determinadas patologías, como la colestasis intrahepática familiar progresiva, que se comentará más adelante, en las que aparece una mutación en el gen que codifica para BSEP que resulta en una marcada disminución del flujo biliar (Jansen et al., 1999), lo cual sugiere que es un sistema de transporte fundamental de la membrana canalicular (Trauner and Boyer, 2003).

La proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos MRP2 (*ABCC2*) es una proteína de 190 kDa que pertenece a la familia de las proteínas MRP (“multidrug resistance associated protein”) que confieren resistencia a las células tumorales frente a fármacos por expulsión activa de éstos desde el interior celular (Muller and Jansen, 1997). Transporta ABs divalentes conjugados sulfatados o glucuronidados (Akita et al., 2001), así como diferentes fármacos y bilirrubina

conjugada (Jedlitschky et al., 1997). MRP2 está localizada en la membrana apical de células epiteliales, principalmente en el hígado e intestino y también en los túbulos renales. En el intestino su expresión es máxima en el segmento proximal del intestino delgado y decrece a medida que avanzamos hacia el íleon distal. Esta diferencia en los niveles de expresión junto con la localización apical parece indicar que MRP2 participa en la secreción de compuestos, incluyendo ABs sulfatados o glucuronidados, hacia el lumen intestinal, constituyendo una vía de detoxificación a nivel de este tejido.

Otros miembros de la familia de proteínas MRP (MRP1, MRP3 y MRP4) son capaces de transportar ABs mono y dianiónicos mediante mecanismos en los que puede estar implicado el GSH (Ballatori et al., 2005). Estos transportadores se encuentran localizados en la membrana basolateral de los hepatocitos y sus niveles de expresión son bajos en individuos sanos. Por tanto, en condiciones fisiológicas juegan un papel menor en el transporte a través del polo sinusoidal del hepatocito. También se han encontrado miembros de la familia de las MRPs que se expresan en la placenta humana y pueden participar en el transporte de ABs, entre ellos MRP1, MRP2 y MRP3 (St-Pierre et al., 2000).

La proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP; gen *ABCG2*) es otro miembro de esta familia de transportadores (subfamilia ABCG), que presenta una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto. BCRP se encuentra altamente expresada en la placenta (Allikmets et al., 1998; Serrano et al., 2007), sin embargo la relevancia de BCRP en el transporte global de ABs a nivel transplacentario no se conoce aún con claridad (Blazquez, 2009). Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran varios esteroides, incluyendo probablemente ABs, con mayor eficacia para los derivados sulfatados, sobre todo estrona sulfato, dehidroepiandrosterona sulfato (Imai et al., 2003; Janvilisri et al., 2005), y porfirinas (Krishnamurthy et al., 2004).

2.4. PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS BILIARES EN COLESTASIS

La colestasis se define como una retención del flujo biliar. Esta retención produce un acúmulo de los componentes de la bilis en el plasma, como por ejemplo la bilirrubina, dando lugar a ictericia, y de los ABs alcanzándose valores superiores a 100 μM (Fischer et al., 1996), con predominio del AGC frente a los ABs secundarios (Carey, 1958).

Hay que distinguir entre colestasis intra y extrahepática: la primera es el resultado de alteraciones hepatocelulares, de los canaliculos biliares o de los pequeños conductillos microscópicos, mientras que en la colestasis extrahepática la lesión obstructiva se encuentra en los conductos biliares grandes. En esta Tesis Doctoral únicamente se estudiará la colestasis intrahepática. La utilización adecuada de los datos aportados por la clínica y el laboratorio permite habitualmente establecer un diagnóstico de presunción de colestasis intra o extrahepática en el 80-90% de los casos. El método diagnóstico más utilizado para confirmar la colestasis extrahepática es la ecografía hepática (Heathcote, 2007). Con respecto a las pruebas clínicas, el parámetro más útil para distinguir entre ambas patologías es el aumento de la fosfatasa alcalina. Las otras enzimas marcadoras de colestasis (5-nucleotidasa, leucinaminopeptidasa y γ -glutamyltransferasa) no ofrecen en la práctica mayores ventajas (Sotil and Jensen, 2004). El diagnóstico de una u otra forma de colestasis, a pesar de que presentan una sintomatología parecida, es de gran importancia.

2.4.1. Consecuencias fisiopatológicas de la colestasis

El bloqueo del flujo biliar que tiene lugar en la colestasis altera el tráfico normal de los ABs a través de la membrana canalicular con el consiguiente incremento de los mismos a nivel hepático. Es un hecho bien conocido que las altas concentraciones de ABs que se alcanzan en el interior del hepatocito provocan muerte celular que, en función de la magnitud del incremento, puede producirse por necrosis debido a la acción detergente de los ABs (Scholmerich et al., 1984) o por apoptosis (Schoemaker et al., 2003). Estos compuestos pueden inducir apoptosis en el hepatocito por sistemas dependientes del receptor de muerte celular Fas o por mecanismos independientes de esta proteína activadora (Higuchi et al., 2003).

Se ha visto que el ADC induce apoptosis significativa en hepatocitos “in vivo” y en hepatocitos aislados (Qiao et al., 2001). Por otra parte, los glico/tauro conjugados del ácido quenodesoxicólico parecen tener un comportamiento diferente. Así, se sabe que los glico-derivados se acumulan en el interior del hígado en procesos de colestasis e inducen apoptosis en el hepatocito a concentraciones fisiopatológicas (Kwo et al., 1995), mientras que el ATQDC no induce apoptosis en hepatocitos “in vitro” (Patel et al., 1994), lo que indica que no todas las especies de ABs pueden inducir apoptosis en el hepatocito.

En los procesos de colestasis, se produce una alteración en el “pool” de ABs, tanto en su composición como en la concentración de los mismos. En ratas con colestasis obstructiva por ligadura del conducto biliar disminuye la proporción de ABs dihidroxilados, mientras que los ABs trihidroxilados aumentan, siendo el ácido β -muricólico el predominante (Naito et al., 1996). Al igual que ocurre con el AUDC, el ácido β -muricólico va a ejercer una acción protectora frente a la colestasis, protegiendo de los efectos tóxicos del ADC (Yousef et al., 1997).

La acumulación de ABs en el interior de los hepatocitos induce además estrés oxidativo. El daño oxidativo tiene lugar principalmente a nivel mitocondrial, ya que se ha demostrado que tanto los ABs hidrofílicos como los hidrofóbicos pueden interrumpir la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Krahenbuhl et al., 1994) La liberación de radicales libres de oxígeno (ROS) desde la mitocondria, principal fuente intracelular productora de estas especies, puede poner en marcha la peroxidación lipídica en las células estrelladas hepáticas que van a incrementar la expresión del gen procolágeno I. Así pues, el estrés oxidativo, induce la proliferación celular y la acumulación de colágeno tipo I en las células estrelladas hepáticas (Nieto et al., 2002) y la consiguiente fibrosis.

Por otra parte, una característica común a todas las patologías que cursan con colestasis es una regurgitación de los ABs desde el hepatocito a la sangre, acompañado de una disminución de estos compuestos en bilis de manera que aparece una deficiencia de ABs en el intestino. Esto puede provocar esteatorrea y síndromes por deficiencias de vitaminas liposolubles (A, D, E, K). La colestasis prolongada puede conducir a complicaciones por hipovitaminosis como pueden ser la hipoprotrombinemia, osteomalacia y ceguera nocturna. Además, cuando la secreción de ABs es deficiente, por una interrupción de la circulación

enterohepática, por una obstrucción biliar o por otras razones, la solubilización micelar es deficiente y es común observar una mala absorción de los lípidos (Poley, 1977). Del mismo modo se ha demostrado que la bacteriemia y la endotoxemia aparecidas en pacientes con colestasis, podrían estar relacionadas con la falta de ABs que llegan al intestino, ya que éstos reducen la endotoxemia e inhiben el crecimiento bacteriano (Ding et al., 1993). El prurito es el síntoma más común de la colestasis que generalmente precede a la ictericia. Otro de los trastornos más comunes e importantes asociados es la disminución de la masa ósea.

2.4.2. Tipos y causas de colestasis

Como se ha comentado en el apartado anterior, resulta de gran importancia diferenciar si se trata de una colestasis intra o extrahepática, ya que la primera es susceptible de tratamiento médico y la segunda precisa intervención quirúrgica, porque en la mayoría de los casos es debida a litiasis o a tumores pancreato-biliares, incluyendo ampulomas o adenopatías. Así pues, entre los tipos de colestasis intrahepáticas podemos destacar:

- Trastornos de los conductos biliares intrahepáticos: un extenso grupo de causas se engloban bajo este nombre, también conocidos como *síndromes de los conductos biliares evanescentes*. Entre ellos cabe destacar la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la colangitis autoinmune o la ductopenia idiopática del adulto.
- En muchas ocasiones la colestasis está relacionada con tóxicos hepáticos o trastornos metabólicos. En este sentido es muy importante la colestasis inducida por fármacos y hormonas que son frecuentes en pacientes de edad avanzada. Los fármacos pueden producir daño hepático, habitualmente mediante un mecanismo inmunoalérgico. También se encuadra dentro de este grupo la colestasis gestacional, que se desarrollará ampliamente más adelante.
- Infecciones bacterianas: la prevalencia de colestasis en pacientes con septicemia varía entre el 1 y el 34%. El trastorno puede deberse al efecto de toxinas bacterianas y citoquinas proinflamatorias, que pueden dar lugar a alteración en el transporte de la bilirrubina, disminución del recambio de

ABs, aumento de la permeabilidad biliar y disminución del flujo biliar (Moseley, 1997).

- Colestasis intrahepática benigna recurrente: es un trastorno infrecuente caracterizado por episodios repetidos de colestasis, separados por periodos asintomáticos. Entre el 10-15% de los pacientes tienen antecedentes familiares y parece heredarse de forma recesiva (Riely, 1987).
- Infiltración hepática: algunas enfermedades pueden producir colestasis intrahepática por depósito en el parénquima hepático, o por infiltración tumoral.

2.4.3. Colestasis intrahepática gestacional

La colestasis gravídica o ICP del inglés “intrahepatic cholestasis of pregnancy” es una enfermedad que aparece generalmente durante el último tercio de la gestación en mujeres sanas y que desaparece pocos días después del parto. Es un buen ejemplo de la importancia que tiene un buen control de la homeostasis de los ABs en el binomio madre-feto y de lo peligroso que puede ser para el feto un desequilibrio en el "pool" materno-fetal de estas moléculas.

Esta enfermedad ha sido diagnosticada mundialmente y su prevalencia varía mucho de unos países a otros. Así, la prevalencia es alta en países escandinavos (1-15%), en Bolivia (9,2%), en Portugal (1%) (Brites et al., 1998) y en Chile, donde a pesar de que en los últimos años ha disminuido notablemente por razones desconocidas, sigue situándose en torno a un 4% (Ribalta et al., 1991). Sin embargo, en contraposición a estos datos, la prevalencia es muy baja en países como Canadá, Suiza y EE.UU. En España, la prevalencia de esta enfermedad es baja según se desprende de los estudios epidemiológicos realizados en la región de Salamanca durante los años 1996-1999 (Pascual et al., 2002).

La etiología de la ICP es complicada, ya que se encuentran involucrados factores genéticos y endocrinos. Aproximadamente en el 10% de los casos de ICP se han identificado mutaciones en diversos genes que codifican transportadores de ABs (Dixon et al., 2009; Mullenbach et al., 2005) y en el receptor de ABs FXR (Van Mil et al., 2007). Además se considera que el polimorfismo p.V444A en el gen *ABCB11*

que codifica la principal bomba exportadora de sales biliares (BSEP) constituye un factor de riesgo en la ICP (Dixon et al., 2009). Las mujeres portadoras de estas mutaciones/polimorfismos presentan una mayor susceptibilidad al efecto colestático de las hormonas reproductoras y sus metabolitos. Los factores genéticos explicarían la elevada incidencia en determinados grupos étnicos tales como los indios Araucanos de Chile, en los que la prevalencia de esta enfermedad es tres veces mayor que en la raza Caucásica (Reyes et al., 1998).

Datos clínicos y experimentales demuestran que los metabolitos colestáticos derivados de estrógenos y progesterona pueden influir en el metabolismo de los ABs y en su transporte. Estudios en roedores han demostrado que tanto el etinilestradiol, como el metabolito derivado de estrógenos 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) pueden afectar el flujo biliar (Crocenzi et al., 2003; Yamamoto et al., 2006), reduciendo la expresión de transportadores de ABs a nivel de ARNm y de proteína (Geier et al., 2003; Green et al., 2000; Yamamoto et al., 2006). El 17 β GE puede, además, inducir la internalización de Bsep desde la membrana plasmática hacia vesículas intracelulares en ratas (Crocenzi et al., 2003) y trans-inhibir el eflujo de ABs mediado por Bsep en experimentos llevados a cabo por nuestro grupo experimental en oocitos de rana *Xenopus laevis* (Vallejo et al., 2006).

Los niveles séricos de progesterona y sus metabolitos se incrementan significativamente a medida que transcurre el embarazo (Kancheva et al., 2007) y aumentan aún más los metabolitos sulfatados de progesterona (Sjovall, 1970). En el suero y la orina de mujeres con ICP los valores de estos compuestos son marcadamente más altos que en mujeres gestantes sin esta patología, mientras que los valores de progesterona y de sus metabolitos glucuronidados permanecen inalterados (Laatikainen and Karjalainen, 1973; Meng et al., 1997; Sjovall and Sjovall, 1970). Además los valores incrementados de los metabolitos sulfatados de progesterona preceden a la aparición de prurito y de otros síntomas que se asocian a la ICP (Sjovall and Sjovall, 1970).

La sintomatología de la ICP se caracteriza por la presencia de prurito (60% de los casos) con o sin ictericia, anorexia, náuseas, a veces hepatomegalia, malabsorción de grasas, esteatorrea, hipo- o malnutrición de la madre, incapacidad de ganar peso normalmente, y una incidencia elevada de formación de cálculos en la vesícula. Existe una elevación de los niveles plasmáticos de transaminasas,

fosfatasa alcalina y ABs, sobre todo de ABs primarios, aunque también el ADC puede estar elevado. Esta sintomatología, junto con las anomalías detectadas en los parámetros bioquímicos en suero materno, ayuda al diagnóstico de la enfermedad.

La colestasis de la madre suele acompañarse de trastornos materno-fetales, que pueden ir desde serios: peso fetal reducido, parto prematuro, hemorragias de la madre tras el parto, a muy serios: alteraciones hepáticas del recién nacido, o incluso fatales como la asfixia y la aparición de deformaciones graves en fetos. Estas alteraciones se han correlacionado con niveles plasmáticos maternos de ABs de 10 a 100 veces superiores a los normales y, como ha podido demostrarse en ratas, es debido a la elevada capacidad teratogénica de los ABs secundarios (Zimber and Zusman, 1990). El tratamiento farmacológico de esta enfermedad estaba dirigido hasta hace poco hacia la paliación del prurito de la madre y la corrección de las anomalías en los parámetros bioquímicos. Pero el tratamiento ideal pasaría por mejorar la enfermedad y mantener bajo control el balance de los ABs, ayudando así a la madre a llegar al final del embarazo y a tener un parto por vía vaginal, con un peso del neonato normal y sin sufrimiento para el feto. Hasta el momento, los fármacos utilizados han sido la colestiramina, el carbón vegetal, la dexametasona y la S-adenosil metionina, todos ellos con unos resultados bastante limitados. Terapias más recientes son las que emplean el AUDC, administrado por primera vez en 1992. Este fármaco mejoraba notablemente el prurito y los parámetros bioquímicos de las pacientes tratadas, era bien tolerado y no producía aparentes efectos adversos en los fetos. En nuestro país no está aprobado el uso terapéutico del AUDC en la ICP.

2.4.4. Efecto de la colestasis sobre la expresión de proteínas transportadoras hepáticas de ácidos biliares

En todo proceso patológico el organismo reacciona desarrollando una serie de mecanismos de defensa. En situaciones fisiológicas por ejemplo, solo pequeñas cantidades de ABs son conjugadas con glucurónico (en los grupos hidroxilo o carboxilo), por el contrario, en colestasis, la glucuronidación de los ABs se ve muy incrementada. Todas estas vías en principio minoritarias tienen como objetivo aumentar la hidrosolubilidad de las distintas especies para así ser eliminadas más fácilmente en orina (Stiehl, 1977).

Cuando existe un fallo en los procesos de secreción biliar como ocurre en la colestasis, las proteínas transportadoras de ABs sufren también respuestas adaptativas con el fin de proteger al hígado de la retención de productos tóxicos facilitándose las rutas de excreción extrahepáticas. Bajo condiciones normales, la pérdida de ABs en orina es mínima mientras que, en situaciones de colestasis la eliminación renal se convierte en una vía mayoritaria para la eliminación de estos compuestos.

Al repasar el papel de las proteínas transportadoras en colestasis (figura 4), hay que hablar del sistema implicado en el 80% de la captación hepática de ABs, la proteína NTCP/Ntcp. Esta proteína se encuentra inhibida en modelos experimentales de colestasis, así como en procesos de colestasis en humanos (Geier et al., 2003).

En condiciones normales, la mayor parte del transporte de ABs no dependiente de sodio en rata está mediado por Oatp1a1, sin embargo, en el modelo de colestasis por ligadura del conducto biliar en rata se produce una disminución de la expresión de Oatp1a1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, de manera que Oatp1a4 y Oatp1b2, cuyos valores de expresión permanecen inalterados, adquieren un papel relevante en el transporte de ABs (Gartung and Matern, 1997). En este mismo modelo de colestasis se ha demostrado que los cambios en los niveles de expresión de los distintos transportadores van acompañados de alteraciones en la zonación de éstos a lo largo del acino hepático (Donner et al., 2007).

Por el contrario, en ciertos estudios en pacientes con colangitis esclerosante primaria, los niveles de ARNm de OATP1A2 aparecen incrementados, sugiriendo que dicha proteína, que juega un papel secundario en la captación de ABs en hígado sano debido a su baja expresión, podría estar implicada en los mecanismos de reversión de colestasis. En pacientes con cirrosis biliar primaria inducida por alcohol e inflamación la expresión de OATP1B1 está disminuida (Zollner et al., 2001), lo que pone en evidencia la necesidad de realizar más estudios con el fin de aclarar el papel de los cambios producidos en la expresión de los Oatp/OATP durante la colestasis.

Recientemente se ha demostrado que MRP4 (*ABCC4*), expresada a nivel de la membrana basolateral de los hepatocitos, cotransporta ABs junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius et al., 2006; Rius et al., 2003). Su expresión a nivel de ARNm y de proteína aparece incrementada en colestasis (Gradhand et al., 2008), con lo que puede ejercer un papel importante en el eflujo de ABs hacia la sangre en situaciones patológicas.

Otros miembros de la familia ABCC con localización también basolateral, MRP1 (*ABCC1*) y MRP3 (*ABCC3*) parecen estar implicados en la excreción de ABs a sangre, ya que su expresión, que en condiciones normales es muy baja (Ogawa et al., 2000), aumenta en colestasis (Donner and Keppler, 2001). Este hecho supone una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefílicos, mediante su transporte de nuevo a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka et al., 2002). Se sabe que MRP1 es capaz de transportar ABs dianiónicos como ATQDC (Trauner and Boyer, 2003), sin embargo, la contribución de MRP3 en la homeostasis de los ABs aún no está clara (Zelcer et al., 2006). Mientras que su ortólogo de rata, *Mrp3*, tiene capacidad para transportar ABs divalentes, como el ATQDC, y monovalentes, como el ATC y el AGC (Hirohashi et al., 1999), en el hombre, MRP3 únicamente transporta AGC con baja afinidad (Zeng et al., 2000). Algunos estudios realizados en ratas indican que *Mrp3*, que se localiza habitualmente en los hepatocitos pericentrales venosos, en procesos de colestasis por ligadura del conducto biliar se distribuye ampliamente, llegando a aparecer a lo largo de todo el lóbulo hepático (Donner and Keppler, 2001). MRP3 también aparece sobreexpresada en la deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como el síndrome de Dubin-Johnson donde provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de bilirrubina en sangre, debido al reflujo de estos compuestos desde los hepatocitos hacia la sangre sistémica como mecanismo compensatorio del deficiente eflujo apical mediado por MRP2 (Kartenbeck et al., 1996).

Resulta llamativo el caso de la proteína canalicular MRP2 que participa en el eflujo de ABs y cuyos niveles de expresión de ARNm a nivel hepático permanecen inalterados en colestasis (Zollner et al., 2001). En varios estudios se ha demostrado mediante inmunofluorescencia que MRP2/*Mrp2* se internaliza en el hepatocito, lo cual produce una disminución paralela del flujo biliar resultado de la alteración de la

actividad transportadora (Mottino et al., 2002). El hecho de que sus niveles de expresión en el riñón se mantengan durante la colestasis contribuye a la respuesta adaptativa que tiene lugar en el curso de esta patología mediante la excreción de ABs por vía urinaria (Denson et al., 2002).

La expresión de Bsep se ha estudiado en tres modelos diferentes de colestasis en rata. En todos ellos, la expresión de Bsep apenas se vio modificada, especialmente si se comparan estos cambios con los que aparecen para los transportadores de membrana, manteniéndose así la secreción biliar. Además y contrariamente a lo que ocurre con la proteína MRP2/Mrp2, la localización canalicular de Bsep se mantiene durante la colestasis inducida en rata (Lee et al., 2000).

La expresión del heterodímero OST α /OST β se ha estudiado en pacientes con cirrosis biliar primaria y en ratas con ligadura del conducto biliar. En ambos casos los niveles de ARNm fueron muy superiores a los controles, por lo que parece que este transportador está involucrado en la respuesta adaptativa frente a colestasis a través del receptor FXR (Boyer et al., 2006).

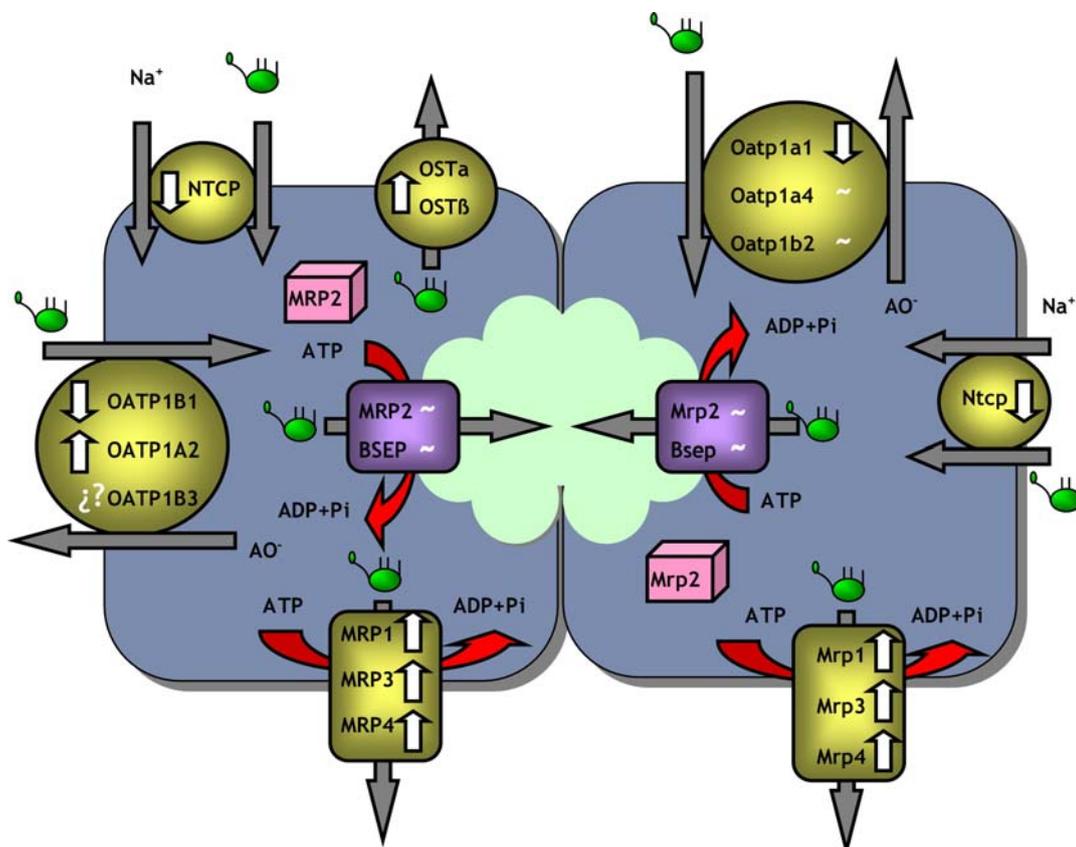


Figura 4. Cambios en la expresión de transportadores de ácidos biliares en situaciones de colestasis.

2.5. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO

Los tumores primarios de hígado y del circuito gastrointestinal constituyen un importante problema de salud mundial. Así, estos tumores constituyen la primera causa de muerte por cáncer, seguidos por los tumores de pulmón y mama respectivamente. A pesar de la larga lista de fármacos que han sido utilizados en el tratamiento de los tumores primarios de hígado, como derivados de platino, análogos de bases nitrogenadas, hormona del crecimiento, anti-estrógenos, anticuerpos monoclonales, antraciclinas e inhibidores de tirosina kinasa entre otros, la marcada refractariedad junto con la aparición de resistencia durante el tratamiento, suponen uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día la clínica a la hora de aplicar una terapia contra el cáncer.

Los mecanismos que pueden contribuir a reducir la eficacia de la quimioterapia antitumoral, son los siguientes (figura 5):

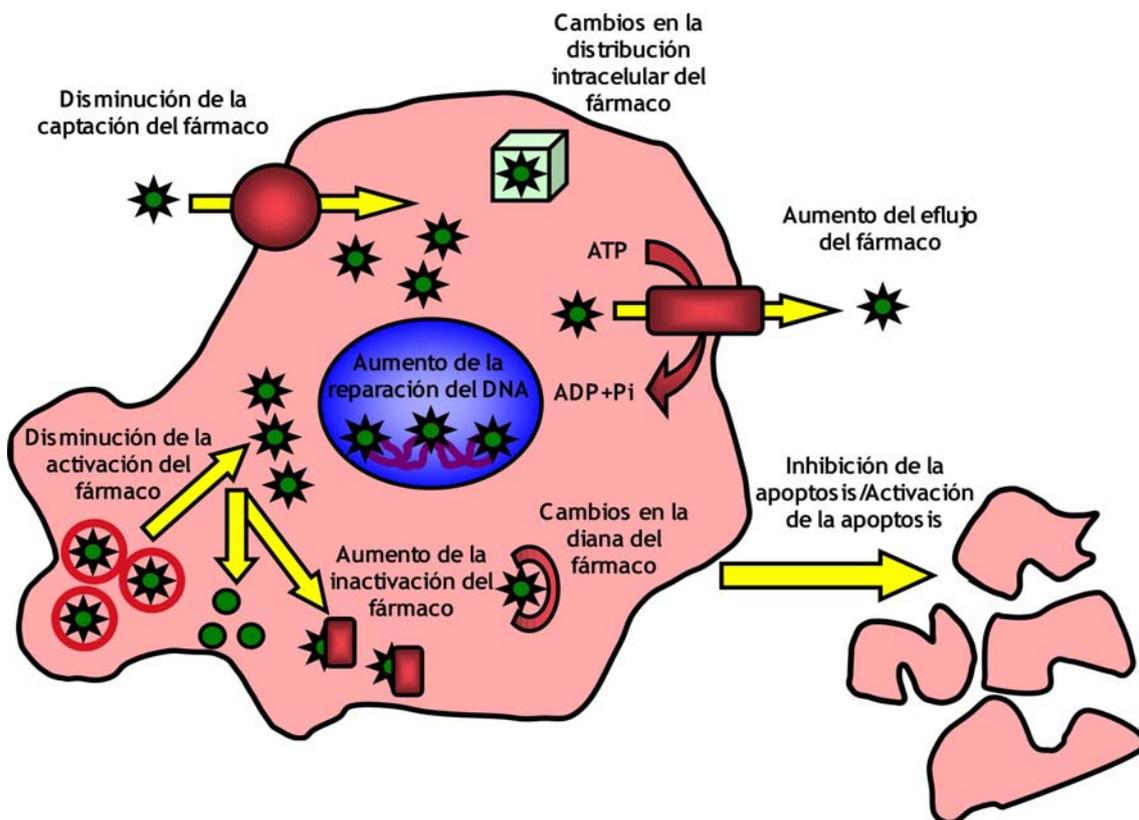


Figura 5: Mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral.

- 1-. Reducción de la concentración de fármaco dentro de las células tumorales: dos mecanismos pueden ser los responsables de este hecho a) disminución de la captación (Huang and Sadee, 2006) y b) activación del eflujo (Sharom, 2008).
- 2-. Inactivación del fármaco dentro de la célula tumoral
- 3-. Reducción en la tasa de activación de profármacos
- 4-. Cambios en la expresión de moléculas diana
- 5-. Factores que afectan a la reparación del ADN
- 6-. Desregulación de los mecanismos proapoptóticos/antiapoptóticos

En los últimos años, se ha descrito un papel relevante en la resistencia a fármacos para muchos miembros de las familias de transportadores SLC y ABC. El grupo SLC ("SoLute Carriers") engloba un conjunto de proteínas que median el transporte de sustratos muy diversos, desde moléculas orgánicas hasta iones inorgánicos. Y además de transportar sus sustratos naturales, muchos de estos transportadores también son capaces de mediar la captación de fármacos derivados de dichos sustratos naturales. La familia de proteínas ABC esta formada por bombas de extrusión y se caracteriza porque muchos de sus miembros están implicados en resistencia a fármacos. De hecho, en un estudio realizado en la colección de líneas celulares del US National Cancer Institute (NCI) en el que se analizó la expresión de 48 genes de la familia ABC por RT-PCR a tiempo real, se demostró una correlación entre la expresión de varios de éstos y la disminución de la sensibilidad al tratamiento antineoplásico. Además se observó que alrededor de 30 proteínas ABC son capaces de producir esta disminución en la sensibilidad de las células tumorales (Szakacs et al., 2004).

Ante estas evidencias, se ha creado el concepto de transportoma o conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos cuyo perfil de expresión pueda predecir la respuesta a un tratamiento antitumoral. Huang y colaboradores realizaron el primer trabajo de donde surgió el concepto de transportoma (Huang et al., 2004). En este estudio se analizaron los perfiles de expresión génica de un conjunto de genes formado por transportadores y canales de membrana, al que llamaron transportoma.

En este apartado de la introducción, por tanto, nos vamos a ocupar del primer punto de los mecanismos de resistencia expuestos arriba, la reducción del contenido intracelular de fármaco. Se pueden considerar dos partes con respecto a la

captación de fármacos antitumorales por el hígado: I) absorción oral de los fármacos por el intestino y el estómago y captación por el hígado desde sangre portal. Estos dos parámetros determinan la biodisponibilidad para el resto del cuerpo, incluyendo tumores localizados fuera de estos tejidos; II) la capacidad de los tumores hepáticos de captar los fármacos antitumorales.

La absorción intestinal de determinados fármacos de bajo peso molecular tiene lugar a través de la vía paracelular (Hayashi et al., 1999), sin embargo, la eficacia de esta ruta es baja debido a la existencia de “tight junctions”, que limitan los movimientos de difusión paracelular. La mayoría de los fármacos presentan además una capacidad muy limitada de difundir a través de la membrana plasmática debido a su bajo carácter lipofílico. Por ello, el tráfico transcelular de estos compuestos requiere, en la mayoría de los casos, de la participación de transportadores expresados en la membrana plasmática (Hunter et al., 1991). En cuanto al papel de los transportadores intestinales en la biodisponibilidad de los fármacos antitumorales, se debe tener en cuenta que la eficacia transportadora está condicionada por ciertos factores como el pH, solubilidad en el lumen gastrointestinal, e interacciones entre el fármaco y algunos alimentos o incluso entre varios fármacos (Sai and Tsuji, 2004).

La mayoría de compuestos, salvo los fármacos con mayor carácter lipofílico que pueden acceder a los tejidos por difusión simple, requieren de transportadores expresados en la membrana plasmática de los diferentes tejidos (Chandra and Brouwer, 2004). Por tanto, una reducción en la expresión de los transportadores implicados en la captación de fármacos citostáticos se traduciría en una disminución del efecto terapéutico.

2.5.1. Captación de fármacos

En el primer apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, ya se estudiaron algunos miembros de esta familia implicados en el transporte de ABs. Sin embargo, aquí trataremos de estudiar los fármacos citostáticos que transportan para tratar de determinar su implicación en cáncer.

Las proteínas SLC que se encuentran expresadas en células tumorales derivadas de tejido hepático, pueden determinar las concentraciones intracelulares de

determinados compuestos y por tanto su actividad antitumoral (Okabe et al., 2008). En este sentido hay que tener en cuenta que, aparte de las diferencias de expresión, la existencia de polimorfismos (Fromm et al., 2000; Kerb et al., 2001; Suzuki and Sugiyama, 2002) también determina grandes diferencias interindividuales en la captación de fármacos (Chan et al., 2004b). Además, la expresión de estas proteínas en los tejidos neoplásicos puede cambiar durante el desarrollo tumoral y particularmente en respuesta a la quimioterapia.

Según se ha demostrado en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, NTCP, el principal sistema de captación de ABs en el hígado, parece estar involucrado en la captación de derivados de cisplatino sintetizados en nuestro laboratorio, por unión de este compuesto a ABs, y que denominamos BAMETs (Briz et al., 2002).

La familia *SLCO* está formada por polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs) (Hagenbuch and Meier, 2004), que debido a su multiespecificidad pueden transportar gran cantidad de sustratos (Sai and Tsuji, 2004). Así, OATP1B1 es capaz de transportar fármacos antineoplásicos como el irinotecán (Nozawa et al., 2005) y conjugados de ABs con compuestos citotóxicos como el cisplatino (Briz et al., 2002). Otro transportador de la familia OATP como el OATP1B3, también expresado en la membrana basolateral de los hepatocitos se ha relacionado con la aparición de resistencia al metotrexato (Abe et al., 2001).

La familia *SLC22* incluye transportadores de cationes orgánicos (OCTs), aniones orgánicos (OATs) y transportadores de cationes/iones dipolares orgánicos (OCTNs) (Koepsell and Endou, 2004). OCT1 (*SLC22A1*) y OCT2 (*SLC22A2*) podrían estar implicados en la captación de derivados de cisplatino (Briz et al., 2002). Por otra parte, dentro de los transportadores de aniones orgánicos, OAT1 (*SLC22A6*) se asocia a la pérdida de sensibilidad a adefovir y metotrexato, mientras que OAT3 (*SLC22A8*) y OAT4 (*SLC22A11*) se han asociado al desarrollo de resistencia a metotrexato (Sai and Tsuji, 2004)

Las familias *SLC28* y *SLC29* incluyen los transportadores concentrativos de nucleósidos de alta afinidad (CNTs) y los de baja afinidad o también llamados equilibrativos (ENTs) (Baldwin et al., 2004; Gray et al., 2004). Ambos juegan un papel clave en la captación de diferentes agentes antitumorales con estructura

nucleosídica. La expresión de CNT2 (*SLC28A2*), capaz de transportar un derivado de pirimidina como la floxuridina puede determinar la sensibilidad de distintos tipos de tumores a este fármaco (Ritzel et al., 2001; Shin et al., 2006). CNT3 (*SLC28A3*) es capaz de transportar una larga variedad de drogas con actividad antitumoral, como la gemcitabina, floxuridina y zebularina (Govindarajan et al., 2007). Se ha propuesto que ENT1 (*SLC29A1*) y ENT2 (*SLC29A2*), que también transportan gran cantidad de compuestos antitumorales, pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia a gemcitabina y citarabina (Baldwin et al., 2004; Endo et al., 2007).

CTR1 (*SLC31A1*) constituye el principal mecanismo de captación de cobre. Se ha demostrado que este transportador participa, además, en la captación de cisplatino, por esta razón se han realizado estudios en los que se relaciona la expresión de esta proteína con la aparición de resistencia a dicho fármaco citostático (Ishida et al., 2002).

2.5.2. Eflujo de fármacos

Las principales proteínas responsables del eflujo de xenobióticos en el organismo pertenecen a la familia ABC. Esta familia de genes se divide, a su vez, en siete subgrupos diferentes según sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean, 2005).

La primera de estas subfamilias es *ABCA* de la que se han identificado hasta doce miembros en humanos, de los cuales algunos se expresan en hígado sano (*ABCA1*, 5, 6, 8, 9 y 10) (Albrecht and Viturro, 2007; Zarubica et al., 2007). Aunque bajo circunstancias fisiológicas la familia *ABCA* esta involucrada en la homeostasis de lípidos, *ABCA8* puede participar en la captación de doxorubicina (Tsuruoka et al., 2002). De hecho, la expresión de *ABCA2*, *ABCA3* y *ABCA6* esta incrementada en líneas celulares que presentan una mayor resistencia a determinados fármacos (Islam et al., 2003; Laing et al., 1998; Wulf et al., 2004).

La subfamilia *ABCB* incluye el prototipo de proteína de resistencia a múltiples fármacos, la glicoproteína P o MDR1 (*ABCB1*), que se encuentra expresada en la membrana apical de las células hepáticas, intestino, riñón y barrera hematoencefálica, donde este transportador desempeña un papel importante en la

expulsión de compuestos endógenos y xenobióticos (Hunter et al., 1993; Thiebaut et al., 1987). Esta bomba es capaz de mediar el eflujo de una gran cantidad de compuestos con actividad antitumoral y también de antibióticos y antivirales (Evans, 2000; Hunter et al., 1991). Entre la gran cantidad de compuestos antitumorales que son reconocidos como sustratos por MDR1 destacan las antraciclinas (Kartner et al., 1983), el metotrexato (de Graaf et al., 1996), los análogos de bases púricas (Zeng et al., 2004), el paclitaxel (Wils et al., 1994), el tamoxifeno (Rao et al., 1994) y el imatinib (Mahon et al., 2003).

Aunque los cambios de expresión de MDR1 en HCC se han investigado exhaustivamente, existe aún gran controversia acerca de este tema (Cho et al., 2000; Zollner et al., 2005). La primera evidencia del papel de MDR1 como mecanismo destoxicante fue obtenida en las líneas celulares Caco-2, HT29 y T84, donde la expresión de MDR1 se acompaña de un incremento en la capacidad de eflujo de vinblastina (Hunter et al., 1993). Además, se ha propuesto que MDR1 es capaz de inhibir la apoptosis inducida en ciertos modelos “in vitro” (Smyth et al., 1998). En ratones “knockout” para *Mdr1*, la biodisponibilidad de muchos fármacos administrados por vía oral se encuentra marcadamente aumentada (Schinkel et al., 1997). En humanos se ha propuesto una actividad similar para MDR1 a partir de experimentos en los que se utilizó digoxina en presencia o no de conocidos inhibidores de MDR1 (Drescher et al., 2003; Greiner et al., 1999; Schinkel and Jonker, 2003).

El papel de otros miembros de la familia *ABCB*, como MDR3 (*ABCB4*) y la bomba exportadora de sales biliares o BSEP en la resistencia a la terapia antitumoral en HCC, aunque posible, es menos evidente. El principal papel fisiológico de MDR3 en el hígado es la translocación de fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina) en la membrana canalicular de los hepatocitos (Ruetz and Gros, 1994). Sin embargo, esta proteína se encuentra expresada en la línea celular derivada de cáncer intestinal Caco-2 (Taipalensuu et al., 2001) y, aunque con menor eficacia que MDR1, es capaz de transportar fármacos como la vinblastina y paclitaxel (Smith et al., 2000). No se observó diferencia alguna en la expresión de MDR3 en HCC con respecto a hígado sano (Bonin et al., 2002).

Como ya se había visto en apartados anteriores de esta Tesis, BSEP constituye la principal vía de eflujo de ABs desde los hepatocitos hacia la bilis. Aunque el HCC

es una enfermedad rara en niños, el riesgo de desarrollo de estos tumores se incrementa en niños que presentan una deficiencia de BSEP, que causa colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3 (PFIC-3) (Knisely and Freimer, 1998). Sin embargo, el papel de BSEP en la resistencia a la quimioterapia en tumores hepáticos no está clara aún. Cuando se transfectaron células de mamífero con Bsep de rata, se apreció un incremento en la resistencia a vinblastina pero no a otros fármacos que forman parte del fenotipo de resistencia a múltiples drogas. Esta resistencia se revierte por agentes capaces de inhibir MDR1, como la ciclosporina A y el verapamilo, lo que sugiere la conservación de ciertas funciones entre MDR1 y BSEP (Childs et al., 1998).

La subfamilia *ABCC* incluye varios transportadores conocidos como proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRPs). MRP1 (*ABCC1*) se expresa a nivel de la membrana basolateral de muchos tejidos, incluyendo cerebro, intestino, riñón, pulmón, testículos y, aunque en menor medida, en el hígado (Cherrington et al., 2002; Flens et al., 1996). MRP1 transporta gran cantidad de fármacos antitumorales, como, antraciclinas, camptotecinas, etopósido y metotrexato (Paumi et al., 2001; Zhang et al., 2005). Experimentos "in vitro" con líneas celulares han puesto de manifiesto la capacidad de MRP1 de conferir resistencia a agentes citostáticos como la daunorrubicina, doxorrubicina y vincristina (Grant et al., 1994; Stride et al., 1997).

Al contrario que MRP1, MRP2 es un transportador apical que se encuentra expresado en intestino, riñón e hígado (Schaub et al., 1999). En el hígado, MRP2 se encuentra expresada en la membrana canalicular de los hepatocitos y constituye la isoforma MRP de mayor expresión hepática. Se encuentra implicada en la excreción a bilis de compuestos endógenos y xenobióticos, principalmente aquellos conjugados con ácido glucurónico (bilirrubina) y GSH (leucotrieno C4) (Kawabe et al., 1999). Con respecto a la especificidad del transporte, MRP2 muestra un marcado solapamiento de sustratos con MDR1 (Naruhashi et al., 2002). MRP2 es capaz de exportar ciertos agentes citostáticos como antraciclinas, camptotecinas, cisplatino, metotrexato y tamoxifeno (Cui et al., 1999; Evers et al., 1998; Zhang et al., 2005).

MRP3 es también una proteína basolateral (Kool et al., 1999) con una marcada similitud con MRP1, con quien comparte un 58% de la secuencia aminoacídica

(Belinsky and Kruh, 1999). MRP3 se expresa en hígado, intestino y, aunque en menor proporción, en el riñón (Kool et al., 1997; Scheffer et al., 2002b). Los niveles de expresión de MRP3 en hígado normal son bajos pero, como en el caso de MRP1 y MRP4, estos niveles aumentan bajo determinadas circunstancias fisiopatológicas, como en colestasis y en el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck et al., 1996). En cuanto al transporte de fármacos antitumorales, MRP3 es capaz de transportar etopósido, tenipósido, vincristina y metotrexato (Kool et al., 1999; Zeng et al., 2004).

MRP4 se expresa a bajos niveles en la membrana basolateral de los hepatocitos en condiciones normales (Kartenbeck et al., 1996), aunque también se encuentra presente en otros tejidos como yeyuno, riñón, cerebro, pulmón y vesícula biliar (Kool et al., 1997; Zhang et al., 2000). Es capaz de transportar oxazafosforinas, análogos nucleósidos acíclicos, derivados de purinas, metotrexato y camptotecinas (Chen et al., 2001; Tian et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Aunque se ha detectado la expresión de otros miembros de la familia ABCC en HCC, como MRP5 (*ABCC5*) (Kool et al., 1997), MRP6 (gen *ABCC6*) (Scheffer et al., 2002a) y MRP7 (*ABCC10*) (Hopper et al., 2001) en tejido hepático, no se ha estudiado aún la posible importancia de estos transportadores en la refractariedad a los agentes quimioterápicos que tiene lugar en HCC (Chan et al., 2004b).

Otros miembros de la familia ABC como *ABCD*, *ABCE* y *ABCF* no parecen estar implicadas en la resistencia antitumoral. Sin embargo, dentro de la familia *ABCG* se incluye un transportador, BCRP, responsable, en ciertos tumores, del fracaso de la quimioterapia. En tejido normal, la expresión de BCRP es particularmente alta en el trofoblasto de la placenta pero también aparece, aunque a niveles menores, en glándula mamaria, ovarios, intestino delgado, colon e hígado (Allikmets et al., 1998; Maliepaard et al., 2001). Existe un marcado solapamiento en cuanto a la especificidad de sustrato entre BCRP y MDR1 (Allen et al., 1999). Entre los sustratos naturales de BCRP se incluyen porfirinas y esteroides sulfatados. Sin embargo, la expresión del mismo en tumores constituye un problema importante en la resistencia a la quimioterapia, ya que además es capaz de exportar una gran variedad de fármacos antitumorales (Kusuhara and Sugiyama, 2007). Entre los fármacos transportados figuran el metotrexato, el tamoxifeno, la doxorubicina, el irinotecan y el imatinib (Burger et al., 2004; Doyle et al., 1998; Maliepaard et al., 1999; Sugimoto et al., 2003; Volk et al., 2000).

La capacidad de BCRP de transportar ciertos fármacos antitumorales se ha demostrado mediante estudios con células polarizadas derivadas de colon y estómago (Ross et al., 1999). Existen evidencias, al menos “in vitro”, que sugieren que el aumento de la expresión de BCRP y MDR1 jugaría un papel clave en la resistencia antitumoral observada en HCC (Li et al., 2007). Por tanto, la sensibilidad a irinotecan en líneas celulares derivadas de HCC podría aumentarse mediante la inhibición de BCRP, que se encuentra expresada a altos niveles en estas células (Takahata et al., 2008).

Se han identificado diferentes mutaciones en la región del gen que codifica para BCRP y algunas de ellas están presentes en células tumorales. Estas mutaciones pueden alterar la expresión, localización y actividad transportadora de la proteína, modificando el espectro de resistencia del tumor hacia los diferentes tratamientos utilizados en quimioterapia (Tamura et al., 2007; Yanase et al., 2006). En este sentido, las mutaciones p.R482G y p.R482T resultan en un incremento de la resistencia a antraciclinas y rodamina-123 (Honjo et al., 2001), sin embargo incrementa la sensibilidad al metotrexato, que no puede ser transportado por estas variantes (Janvilisri et al., 2005). Además, el polimorfismo p.C412A, bastante frecuente entre la población japonesa, resulta en una baja expresión de esta proteína y en un descenso de la capacidad transportadora de topotecán e irinotecán (Imai et al., 2002; Mizuarai et al., 2004). En la práctica clínica, cuando los pacientes portadores de esta variante de BCRP son tratados con diflomotecán como inhibidor de topoisomerasa, se alcanzan valores séricos del fármaco superiores a los de la población general (Sparreboom et al., 2004).

Aparte de la familia ABC, se han identificado otros transportadores que podrían estar involucrados en la resistencia a fármacos que aparece en HCC. En este sentido cabe destacar las proteínas ATPasas tipo-P de Menkes y de Wilson, así denominadas por las enfermedades que aparecen cuando la expresión/funcionalidad de estas proteínas esta comprometida. Ambas juegan un papel fundamental en la homeostasis del cobre en el organismo. La proteína de Menkes (*ATP7A*) se expresa en la mucosa intestinal, donde juega un papel clave en la absorción de cobre (Prohaska and Gybina, 2004), mientras que la proteína de Wilson (*ATP7B*) se encuentra principalmente expresada en hígado y riñón, donde participa en la eliminación del cuerpo del exceso de cobre (Hellman et al., 2002). El hecho de que *ATP7B* aparezca sobreexpresado en tumores con una marcada

resistencia a la quimioterapia, sugiere que este transportador quizás participe en el eflujo de derivados de platino (Komatsu et al., 2000). Además se ha propuesto la existencia de una relación entre los niveles de expresión de la proteína de Wilson y el grado de resistencia en el tratamiento del cáncer de ovario con cisplatino (Samimi et al., 2003). Esta relación probablemente también exista en HCC, ya que se ha encontrado una elevada expresión del gen *ATP7B* en HCC, lo que explicaría en parte la marcada refractariedad de estos tumores al cisplatino (Sugeno et al., 2004).

Finalmente, la LRP es una proteína de 110 kDa descubierta a partir de una línea celular de cáncer de pulmón (Scheper et al., 1993). También se conoce como MVP ("Major Vault Protein"), porque constituye el componente proteico principal de organelas celulares llamados "vaults" (Scheffer et al., 1995). Los "vaults", de descripción relativamente reciente (Kedersha and Rome, 1986), son ribonucleoproteínas con una compleja estructura en forma de barril. No se conoce exactamente como LRP puede afectar a la quimioterapia, aunque se especula sobre una probable regulación del transporte de fármacos entre núcleo y citoplasma y entre éste y el interior de vesículas citoplasmáticas (Scheper et al., 1993). La expresión de LRP se relaciona "in vitro" con la aparición resistencia a diferentes compuestos, como los derivados de platino, la doxorrubibina, la vincristina y el etopósido (Izquierdo et al., 1996; Marie, 2001).

2.5.3. Otros mecanismos de resistencia implicados en la falta de sensibilidad a la terapia farmacológica del carcinoma hepatocelular

Como hemos visto en el apartado anterior, la concentración del fármaco que se alcanza dentro de la célula, determinada a su vez por el balance captación/eflujo, constituye un punto clave en la posible eficacia de la terapia antitumoral. Existen, sin embargo otros factores que condicionan la actividad de los distintos fármacos utilizados en el tratamiento del HCC.

2.5.3.1. Disminución de la actividad intracelular del fármaco

Entre los mecanismos intracelulares involucrados en la quimiorresistencia que se revisarán a continuación se encuentran:

- 1-. Aquellos que modifican el metabolismo del fármaco, generándose un metabolito inactivo o, cuando se administra un profármaco que debe ser activado, disminuyendo la formación del compuesto activo
- 2- Cambios en la abundancia o características de la diana molecular o vía sobre la que el fármaco se supone que actúa, provocando una reducción en la eficacia de los fármacos antitumorales.

Cambios en el metabolismo intracelular

Las células tumorales pueden inactivar los fármacos antitumorales mediante la sobreexpresión de enzimas detoxificantes, incluyendo enzimas de fase I, como las relacionadas con el citocromo P450, o enzimas de fase II, como aquellas involucradas en la conjugación con ácido glucurónico o con GSH. La expresión de algunas de estas enzimas se ha encontrado alterada en células tumorales hepáticas y gastrointestinales (Fritz et al., 1993; Murray et al., 1993).

Un buen ejemplo del papel de las enzimas del citocromo P450 en la resistencia antitumoral en HCC es el irinotecán, que ha mostrado cierta eficacia en el tratamiento de HCC (Boige et al., 2006). El irinotecán es inactivado por las enzimas del citocromo P450 (Santos et al., 2000), y se ha descrito que la sensibilidad de las líneas celulares derivadas de HCC al irinotecán es dependiente de los niveles de expresión de CYP3A4 (Takahata et al., 2008).

Por otra parte, la conjugación con GSH por la glutatión S-transferasa (GST) juega un papel clave en la defensa frente a muchos compuestos endógenos y xenobióticos, incluyendo fármacos antitumorales, como el cisplatino y sus derivados (Boige et al., 2006). La conjugación con GSH resulta en la inactivación de estos compuestos (Meijer et al., 1992). Los aductos resultantes son entonces eliminados de la célula por medio de las bombas ABC (Ishikawa and Ali-Osman, 1993). Un aumento en la conjugación con GSH debido a una mayor expresión de GST puede determinar el grado de resistencia a ciertos fármacos antitumorales (Okuyama et

al., 1994). Esta resistencia también afecta a doxorubicina y otras antraciclinas (Sato et al., 1989; Takahashi and Niitsu, 1994).

En cuanto a la expresión de GST en HCC, tres isoformas, alfa, pi y mu se encontraron en un 48%, 39%, y 74% de los tumores estudiados respectivamente (Murray et al., 1993). Una marcada sobreexpresión de la isoforma pi se ha asociado con la resistencia al cisplatino en células tumorales (Kase et al., 1998).

La conjugación con ácido glucurónico a cargo de las enzimas UDP-glucuroniltransferasas (UGTs) desempeña un papel importante en la inactivación de fármacos. Por tanto un incremento en la actividad de algunas de ellas (UGT1A1, UGT1A8, UGT1A10) podría contribuir al desarrollo de quimiorresistencia. La primera evidencia de este concepto se encontró en tejido cancerígeno de rata (Burchell et al., 1990). En la clínica humana, este mecanismo se ha asociado con la refractariedad a irinotecán, cuya forma activa, SN-38, es inactivado por glucuronidación mediada por UGT1A1 (Xu and Villalona-Calero, 2002). Se ha sugerido un papel clave de las UGTs en el desarrollo de resistencia a irinotecán en cáncer (Cummings et al., 2006). La expresión de UGT1A1 se ha asociado también a una reducción en la sensibilidad de líneas celulares derivadas de HCC a irinotecán (Takahata et al., 2008). Además, polimorfismos en el gen que codifica para UGT1A1 parecen estar involucrados en un incremento de la sensibilidad tumoral y en la toxicidad general que se observa en algunos pacientes tratados con irinotecán (Iqbal and Lenz, 2001).

Cambios en las dianas moleculares

Alteraciones en los niveles de expresión o la aparición de mutaciones en las proteínas diana pueden tener un gran impacto en la resistencia a fármacos. De esta manera, el mecanismo de acción de muchos antineoplásicos está basado en su capacidad de interactuar con las ADN topoisomerasas, enzimas que actúan sobre el estado topológico del ADN facilitando su replicación. Uno de los fármacos más conocidos de este grupo es el irinotecán, cuyo metabolito SN-38 es un potente inhibidor de la topoisomerasa I (Xu and Villalona-Calero, 2002). El mecanismo de acción de SN-38 consiste en la formación de un aducto con el ADN que estabiliza el complejo ADN-topoisomerasa I y provoca roturas de la cadena de ADN (Tanizawa et al., 1995). La expresión de topoisomerasa I a nivel de ARNm disminuye

marcadamente en las líneas celulares resistentes al irinotecán (Boyer et al., 2004), debido a que las células tumorales superan la actividad tóxica de éste disminuyendo los niveles de expresión de la topoisomerasa I (Xu and Villalona-Calero, 2002). Además se han descrito varias mutaciones en la topoisomerasa I que resultarían en una menor afinidad por SN-38, lo que se traduce en un incremento de la resistencia al fármaco (Li et al., 1996). Por otra parte, la topoisomerasa II constituye la diana de antraciclinas tales como la doxorrubicina y podofilotoxinas como el etopósido. En líneas celulares resistentes a estos fármacos se han descrito varias alteraciones en la actividad de esta enzima, ya sea por disminución de su expresión a nivel de ARNm o por la presencia de mutaciones (Deffie et al., 1992; Friche et al., 1991). Así, en HCC se ha observado un aumento de la resistencia a doxorrubicina en aquellas células tumorales con mayores niveles de expresión de topoisomerasa II (Pang et al., 2005).

Se han repasado hasta ahora los cambios a nivel intracelular que participan en la resistencia a antitumorales clásicos. A continuación vamos a centrarnos en otra familia de antineoplásicos de más reciente aparición, como son los inhibidores de tirosina kinasa, cuyo miembro más representativo es el imatinib. Se considera que los receptores con actividad tirosina kinasa, además de estar implicados en la regulación de procesos celulares normales, pueden desempeñar un papel crítico en el desarrollo y progresión de muchos tipos de cáncer (Zwick et al., 2001). El imatinib, debido a sus características estructurales, interacciona con el sitio de unión del receptor con el ATP, bloqueando la señalización en este punto. Dos mecanismos distintos parecen estar implicados en la resistencia al tratamiento con imatinib: se han descrito mutaciones en receptores con actividad tirosina kinasa de aparición previa al tratamiento que se traduce en una falta total de respuesta, en lo que se conoce como resistencia primaria. Es posible, también, que el paciente responda inicialmente al tratamiento y que, como consecuencia de una exposición prolongada, se pierda sensibilidad al fármaco. En el caso del imatinib, este fenómeno se explica por la aparición de mutaciones en el dominio con actividad kinasa de la proteína (Wardelmann et al., 2005).

2.5.3.2. Cambios en los mecanismos que participan en la reparación del ADN

La alteración directa o indirecta del ADN constituye la base del mecanismo de acción de muchos fármacos citostáticos. En el caso de estos agentes, el mecanismo de resistencia parece estar mediado por un incremento en la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales (Lage and Popek, 1993).

Las células expuestas a agentes genotóxicos deben reparar el daño en el ADN para sobrevivir o tolerarlo. La respuesta celular al daño en el ADN consiste en repararlo o, si el daño es irreversible, activar la apoptosis. Existen dos tipos de agentes genotóxicos usados en el tratamiento del cáncer: aquellos que actúan directamente, como ocurre con el cisplatino, o indirectamente, como es el caso del 5-fluorouracilo (5-FU).

La reparación y escisión de nucleótidos acoplados a transcripción funcional (NER, de "nucleotide excision repair") es uno de los principales mecanismos involucrados en la reparación de aductos de ADN, como aquellos que se forman con el cisplatino (Furuta et al., 2002; Reardon et al., 1999). Aunque hay, al menos, 12 proteínas involucradas en NER, la sobreexpresión de algunas de ellas puede incrementar considerablemente la capacidad de la célula para llevar a cabo la reparación del ADN. Uno de estos elementos clave es la proteína ERCC1 ("excision repair cross-complementing 1 protein"). La sobreexpresión de esta proteína se ha asociado a la resistencia a cisplatino y sus derivados (Arnould et al., 2003; Youn et al., 2004) en varios tipos de cáncer, entre ellos HCC, donde los niveles de expresión de ERCC1 son mayores en células tumorales que en el tejido sano circundante (Fautrel et al., 2005).

Otro de los mecanismos implicados en la reparación del ADN es el constituido por los genes de corrección de errores de emparejamiento (MMR, de "mismatch repair MMR system") que juegan un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. De hecho, el defecto de éstos es el responsable del llamado fenotipo de inestabilidad de microsatélites, que se caracteriza por la aparición de un incremento en la tasa de mutagénesis y confiere a la célula una alta tolerancia a la modificación del ADN por agentes químicos como el cisplatino (Lin et al., 1999). Además, la pérdida de algunos elementos de este sistema de reparación favorece la capacidad de las células con daños graves en el ADN de eludir la apoptosis. De

hecho, los niveles de expresión de ciertos genes implicados en MMR, como hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6 y hMSH2 aparecen disminuidos en HCC (Zekri et al., 2005).

2.5.3.3. Control del balance supervivencia/apoptosis

La inactivación de determinados genes es crucial para el control del crecimiento celular. Algunos de los genes implicados en la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN se reactivan en las células tumorales y llegan a expresarse de nuevo. Esto da como resultado un crecimiento celular no controlado, pero también una disminución en la sensibilidad a la quimioterapia (Brown, 2002).

Algunos fármacos antitumorales, como el cisplatino, la citarabina, el etopósido y la doxorubicina actúan en parte induciendo la apoptosis en las células tumorales (Ormerod et al., 1996). Por lo tanto, las posibles alteraciones de los mecanismos que conducen a la activación de la apoptosis se traducen generalmente en un incremento de la resistencia a estos fármacos (Bunz, 2001; Segal-Bendirdjian and Jacquemin-Sablon, 1995).

Dentro de estos mecanismos se incluyen la pérdida de factores pro-apoptóticos, como Bax o p53, la sobreexpresión de factores anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-X y la activación de vías de supervivencia.

La proteína supresora de tumores p53 constituye un factor clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a la quimioterapia o radioterapia, ya que desempeña un papel central en el control del ciclo celular (Vogelstein et al., 2000). Además, p53 puede activar otros mecanismos que resultan en la eliminación de aquellas células con un mayor grado de daño a nivel del ADN a través de la sobreexpresión de genes pro-apoptóticos, como Bax o Fas (Miyashita et al., 1994; Petak et al., 2000). La actividad supresora de tumores de p53 se debe también a su capacidad de unirse a Bcl-2 e inhibir así el efecto anti-apoptótico de éste. Cuando esta proteína no es funcional, las células son menos propensas a entrar en apoptosis y por tanto, más resistentes a un posible daño en el ADN como el inducido por los agentes utilizados en quimioterapia (Bunz, 2001). De hecho, la falta de expresión funcional de p53 contribuye a la resistencia a muchos fármacos (Longley and Johnston, 2005). La funcionalidad de p53 aparece alterada en muchas células tumorales

resistentes a fármacos (Anthoney et al., 1996). Aproximadamente en el 50% de los tumores aparecen mutaciones en el gen que codifica para p53 (Levine, 1997).

Bcl-2 es un importante elemento anti-apoptótico, expresado en muchos tumores sólidos. En estos tumores la sobreexpresión de Bcl-2 resulta en un incremento de la resistencia a la quimioterapia (Miyashita and Reed, 1992). Por el contrario, la sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica Bax aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia (Sakakura et al., 1997). Un aumento en los niveles de expresión de los factores anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-XL provoca un incremento de la resistencia a paclitaxel en líneas celulares derivadas de HCC (Chun and Lee, 2004).

RPL6 es un miembro de la familia de proteínas ribosomales L6E. La sobreexpresión de RPL6 se asocia con un incremento de la resistencia a muchos fármacos antitumorales, como 5-FU y cisplatino. Este efecto parece estar mediado por un incremento en la expresión de Bcl-2 y una disminución en la expresión de Bax (Teixeira et al., 1995).

Otra familia implicada en la resistencia a la quimioterapia es la de los inhibidores de apoptosis (IAPs). Las proteínas de esta familia inhiben las caspasas efectoras 3 y 7, lo que bloquea el paso final en la vía de activación de apoptosis inducida por muchos agentes antitumorales (Hunter et al., 2007; Notarbartolo et al., 2004). Diversos estudios han demostrado la presencia de varios miembros de la familia de IAPs en HCC (Morinaga et al., 2004). La inhibición por agentes farmacológicos de esta familia resulta en un incremento de la sensibilidad de los tumores (incluido HCC) a la quimioterapia (Yamaguchi et al., 2005).

En circunstancias normales, el factor de transcripción nuclear (NF- κ B) se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor (I- κ B). La fosforilación de I- κ B da como resultado la separación de NF- κ B y la traslocación de este último al núcleo, donde NF- κ B participa en la regulación de la proliferación celular y la transcripción de proteínas apoptóticas. Este factor se encuentra involucrado también en la inhibición de la apoptosis mediada por la familia IAPs (Wang et al., 1998). En muchos tumores se activa NF- κ B como mecanismo de defensa frente a la quimioterapia (Chuang et al., 2002). Con respecto a HCC, se ha visto frecuentemente una sobreexpresión de NF- κ B en estos tumores (Chan et al., 2004a; Chiao et al., 2002;

O'Neil et al., 2007). Además, parece existir una correlación entre la activación de NF- κ B y los niveles de expresión de IAPs y MDR1, lo que supondría un mecanismo de resistencia combinado (Kuo et al., 2002).

Entre los mecanismos que confieren a las células tumorales la capacidad de proliferar está la sobreexpresión de proteínas tirosin-kinasa involucradas en la señalización de factores de crecimiento. Este es el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR) que, en respuesta a TGF-alfa o a EGF, activa vías intracelulares de supervivencia, como PI3-K/Akt, ERK1/2, STAT3 y STAT5 (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Jorissen et al., 2003).

Cuando se sobreexpresa experimentalmente EGFR en líneas celulares se observa un aumento en la resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales (Chen et al., 2000). De hecho, EGFR parece estar sobreexpresado en muchos casos de HCC (Buckley et al., 2008). Este hallazgo ha supuesto una vía de actuación prometedora para superar la resistencia de las células tumorales, mediante el diseño de fármacos que bloquean la actividad de EGFR. Cuando las células tumorales (incluidas las de HCC) se exponen a gefitinib, un inhibidor selectivo de EGFR, se bloquean las vías de proliferación y supervivencia celular (Okano et al., 2006).



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico

Muestras humanas

Las muestras de pacientes con tumores hepáticos (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma) se obtuvieron a través del Servicio de Aparato Digestivo y del Servicio de Cirugía Hepatobiliar y Pancreática del Hospital Universitario de Salamanca. Se utilizaron restos de piezas quirúrgicas o el excedente de biopsias realizadas por imperativos diagnósticos. Como grupo control se utilizaron muestras de tejido sano de piezas quirúrgicas obtenidas por extirpación de una lesión sobre tejido sin signos de inflamación ni fibrosis.

La toma de muestras se hizo con el consentimiento escrito de los pacientes según determina la legislación vigente. Los datos personales fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de Salamanca.

Una parte de este trabajo se realizó en colaboración con Catherine Williamson (Imperial College School of Science, Londres, Reino Unido), en la que se utilizaron muestras de suero que procedían de 10 mujeres no gestantes (que no tomaban anticonceptivos orales) y 8 mujeres gestantes (30-38 semanas de embarazo sin historia clínica previa de enfermedades hepáticas colestáticas). Además, se emplearon muestras de hígado humano, que se tomaron de regiones no tumorales en intervenciones que tenían por objeto la eliminación de tumores hepáticos secundarios. Esta parte del trabajo se realizó de acuerdo a protocolos establecidos por el comité ético del Hospital de Hammersmith (Londres) (REC 97/5197 y RFH38-2000).

Animales

Para la obtención de oocitos, se utilizaron ranas hembra *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania). Se mantuvieron en tanques con agua cuya calidad (pH,

dureza, contenido en nitratos, nitritos y cloro) se controlaba periódicamente y se alimentaron con pienso *Xenopus* XE40 (Mucedola, Milán, Italia) e hígado de rata. En todo momento los animales fueron tratados según las especificaciones de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (“Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook”, 2ª edición, 2002). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Líneas Celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona): células de hepatoblastoma humano, HepG2 (HB-8065); células de carcinoma hepatocelular, SK-Hep1 (HTB-52); células de hepatoma humano, Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024).
- La línea celular salvaje CHO-K1, de ovario de hámster chino, y las transfectadas con *Oatp1a1* de rata (CHO-03), OATP1B1 (CHO-OATP1B1) y OATP1B3 (CHO-OATP1B3) fueron amablemente cedidas por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zurich (Suiza).

Bacterias

- Se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

3.1.2. Productos

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- 5 PRIME (Hamburgo, Alemania): Tubos phase lock gel de 1,5 ml y 2 ml para la extracción fenol-cloroformo.
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo monoclonal frente a OATP1B1 (clon ESL).

Air Liquide (Valladolid): CO₂, N₂ líquido.

- Ambion (Applied Biosystems, Madrid): acetato de amonio, kit para transcripción “in vitro” “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra”.
- American Radiolabeled Chemicals (Itisa, Madrid): ácido taurocólico ([³H]-ATC) con una actividad específica (AE) de 10 Ci/mmol, 17beta-glucurónido de estradiol ([³H]-17βGE, AE 45,8 Ci/mmol) y glutatión reducido ([³H]-GSH, AE 41,5 Ci/mmol). Los ácidos biliares taurodesoxicólico ([³H]-ATDC, AE 30 Ci/mmol), tauroquenodesoxicólico ([³H]-ATQDC, AE 10 Ci/mmol) y tauroursodesoxicólico ([³H]-ATUDC, AE 10 Ci/mmol), fueron proporcionados por el Dr. Alan F. Hofmann de la Universidad de San Diego (EE.UU.) (Sorscher et al., 1992). El éster metílico de ácido cólico (ME-[¹⁴C]-AC) fue sintetizado en nuestro laboratorio por la Dra. Marta Vallejo Barrón por reacción del [¹⁴C]-AC con un exceso de diazometano recién destilado en dietil éter (Vallejo et al., 2006).
- AppliChem (Madrid): ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, fenol y triptona.
- Applied Biosystems (Madrid): “SYBR Green I PCR Master Mix”, “Taqman[®] Universal PCR Master Mix” y kit de ARN ribosómico 18S Taqman[®] y tarjetas microfluídicas o TLDAs.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- BD Biosciences (Madrid): Solución tampón FACS-Flow para citometría de flujo, colágeno tipo I.
- Biomers.net (Donau, Alemania): algunos cebadores o “primers”.
- GE Healthcare (Barcelona): algunas enzimas de restricción.
- Invitrogen (Barcelona): estándares de ADN (25 y 100 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), el kit comercial “SuperScript[®] VILO™ cDNA Synthesis” y las sondas fluorescentes acetoximetil éster del SNARF-4F 5-(y -6)-ácido carboxílico, y DilC₁(5).

- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Merck (Barcelona): ácido fosfomolibdico, etanol, glicerol e isopropanol.
- Molecular Probes (Invitrogen): kits comerciales “PicoGreen dsDNA Quantitation Kit” y “Ribo-Green RNA-Quantitation Kit” para la cuantificación de ADN y ARN, respectivamente.
- MP Biomedicals LLC (Santa Ana, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.
- Parke-Davis (Barcelona): anestésico ketamina (Ketolar).
- Perkin Elmer Life Sciences (Boston, EE.UU.): ácido cólico ($[^{14}\text{C}]$ -AC, AE 48,6 mCi/mmol), ácido glicocólico ($[^{14}\text{C}]$ -AGC, AE 55 mCi/mmol), $[^3\text{H}]$ -inulina (AE 304,8 Ci/g) y $[^{14}\text{C}]$ -manitol (AE 55 Ci/Mol).
- Progen Biotechnik (Heidelberg, Alemania): anticuerpo monoclonal frente a OATP1B3 (clon mMDQ).
- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): algunas enzimas de restricción y el kit comercial “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” para determinar la viabilidad celular.
- Pronadisa (Hispalab, S.A., Madrid): agarosa normal, agarosa de alta resolución y agarosa de bajo punto de fusión.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): “MiniElute Gel Extraction Kit”, “QIAprep Spin Miniprep Kit”, el líquido estabilizador “RNA/later” y “RNeasy Kit”.
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), algunas enzimas de restricción, ADNasa I, proteinasa K y tripsina de páncreas porcino.
- Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μm de tamaño de poro para filtrar soluciones utilizadas en citometría de flujo.

- Sigma-Aldrich (Madrid): sal sódica de los ácidos cólico (AC), taurocólico (ATC), taurolitocólico-3-sulfato (TSLC) y glicocólico (AG); albúmina bovina; amiloride; azul de bromofenol; azul de Tripán; ácido etilendiamino tetraacético (AEDT); ampicilina; butirato sódico; carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP); cloruro de colina; cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino); colagenasa; carbonato cálcico; dietilpirocarbonato (DEPC); digitonina; dimetilsulfóxido (DMSO); dodecil sulfato sódico (SDS); 17beta-glucurónido de estradiol (17 β GE); D-glucosa; glutamina; glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG); ioduro de propidio; isotiocianato de fluoresceína (FITC); medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)”, “Minimum Essential Medium Eagle (MEM)”; mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B); paraformaldehído; piruvato sódico; sulfato de gentamicina; kit para transcripción reversa “Enhanced Avian RT-PCR Kit”; Triton X-100; trizma base; xileno cianol y valinomicina.
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido): algunos cebadores o “primers”.
- Steraloids (Newport, EE.UU.): Progesterona y sus derivados: alopregnenolona (PM4), epialopregnenolona (PM5), alopregnenolona sulfato (PM4-S) y epialopregnenolona sulfato (PM5-S).
- T.D.I. (Madrid): suero bovino fetal.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido clorhídrico, bicarbonato sódico, bromuro de etidio, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol absoluto, fosfato disódico, hidróxido sódico, indicador universal de pH, metanol, sulfato de magnesio, reactivo de Folin ciocalteu.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.1.3. Medios instrumentales

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crisol Instruments, Barcelona). El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Kalsberg, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman). También se utilizó una picofuga Stratagene (VWR International Eurolab, Barcelona).

Para las medidas espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper) y un lector de ELISA modelo 550 Microplate Reader (Bio-Rad, Madrid). Para la cuantificación fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (Duerolab, Salamanca).

Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab).

Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador Mastercycler Pro marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems. Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía. El sistema se controló desde un ordenador Intel Core 2 (modelo DELL OPTIPLEX 755) utilizando el software DataAssist version 2.0.

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplados a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos se empleó el equipo de captura y análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid).

Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes, se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss, Madrid).

Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).

Para la realización de los cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona) y una estufa New Brunswick Scientific Co. Inc. (Pacisa). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss).

Los cortes histológicos se realizaron con un criostato (Leica Microsystems, modelo 1900UV, Barcelona). Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duero Lab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica), perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) en el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica).

Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

Los oocitos se incubaron en una estufa Selecta (Pacisa). La selección de los oocitos se realizó con la ayuda de una lupa ZOOM 2000 (Leica, Búfalo, EE.UU.) y una fuente de luz fría KL750 (Schott, Wiesbaden, Alemania). Para la microinyección de los oocitos de *Xenopus laevis* se utilizó un equipo Nanoliter 2000 (WPI, Hertfordshire, Reino Unido).

La radiactividad de los isótopos ³H y ¹⁴C se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid), utilizando líquido de centelleo UniverSol (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, EE.UU.).

Se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, LC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A) que permite mezclas en baja presión de hasta cuatro solventes; un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm y 3,5 µm de tamaño de poro termostatzada a 35°C (Agilent Technologies, Madrid). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una Fuente de Ionización a Presión Atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.

Para las medidas por citometría de flujo se utilizó un modelo FACSCALIBUR™ de la casa BD Biosciences (New Jersey, EE.UU.). Este equipo permite la detección simultánea de cuatro fluorocromos gracias un sistema de doble láser (488 nm y 635 nm). El citómetro se manejó desde un ordenador Macintosh (Mac OS X) utilizando el software CELL Quest V 3.1.

Para la cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas de gel de sílice (60 F₂₅₄, 20 x 20 cm) sobre soporte de aluminio, de 0,2 mm de espesor y sobre soporte de vidrio de 2 mm de espesor (Merck). La fluorescencia de las placas de TLC se visualizó con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, Francia).

Las muestras se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Pacisa) y en contenedores de nitrógeno líquido.

Además se contó con un pequeño equipamiento como agitadores magnéticos Selecta (DureoLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES

3.2.1.1. Síntesis de colilglicilamido fluoresceína (CGamF)

Para la síntesis del derivado fluorescente colilglicilamido fluoresceína (CGamF) se utilizó el método descrito por Sherman y Fisher (Sherman and Fisher, 1986), según el cual se obtiene este compuesto por reacción entre el GC y el isotiocianato de fluoresceína (FITC) en DMSO a 95°C. El producto mayoritario de la reacción es aquel en el que el FITC se une al grupo carboxilo del GC mediante un enlace amida (Schteingart, 1992).

Fórmula molecular: $C_{47}H_{52}N_2O_{10}$

Reactivos utilizados: GC, FITC, DMSO, agua destilada, HCl, acetato de etilo, metanol, cloroformo, NaCl y Na_2SO_4 anhidro.

Procedimiento: Se disolvieron 0,25 mmol de FITC y 0,25 mmol de GC en 2 ml de DMSO, y se calentó a 95°C durante 1 h. Al cabo de ese tiempo, cuando la mezcla se enfrió, se añadieron 40 ml de agua y se acidificó esta solución con HCl 1 N hasta $pH < 3$. El ácido biliar fluorescente, soluble en acetato de etilo, se extrajo con este solvente orgánico en un embudo de decantación. La extracción se repitió otras dos veces, recogiendo la fase orgánica. El siguiente paso consistió en eliminar primero los restos de ácido, lavando con una disolución saturada de NaCl, y eliminar después los restos de agua, añadiendo Na_2SO_4 anhidro y filtrando por papel.

En ese punto se comprobó por TLC, utilizando como fase móvil cloroformo:metanol (7:3), qué compuestos se obtuvieron en la reacción anterior, disolviendo previamente en metanol el producto sólido obtenido al secar la fase orgánica de acetato de etilo. Al ver la placa a la luz UV se observó una mancha fluorescente, que también se tiñó con ácido fosfomolibdico, y que correspondía a la CGamF.

Por último se purificó este ácido biliar fluorescente por medio de una cromatografía preparativa consiguiendo una pureza mayor del 95%. Se disolvió en metanol y se centrifugó para eliminar los restos de sílice. Se comprobó por TLC que la

separación había sido correcta y se evaporó el metanol para guardar la CGamF seca, protegida de la luz y a temperatura ambiente.

3.2.2. CULTIVOS CELULARES

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares Alexander, HepG2 y SK-Hep1 fue MEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 26,2 mM de bicarbonato sódico y 1 mM de piruvato sódico.

El medio de cultivo estéril para las células CHO fue DMEM suplementado con 2 mM L-glutamina, 10 mM de bicarbonato sódico y 0,43 mM de L-prolina. El medio de cultivo de las células CHO transfectadas contenía, además, 400 µg/ml de geneticina G418.

El tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4 estaba compuesto por: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄·12 H₂O y 1,5 mM KH₂PO₄.

La solución de tripsina era al 0,25% (p/vol) con AEDT 0,02 M en PBS (2,5 g/l tripsina + 0,2 g/l AEDT disódico disueltos en PBS estéril).

A todos se les añadió suero bovino fetal inactivado al 10%. La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 minutos. También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomina (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 µg/ml).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux que se introdujo en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Una vez confluyente el cultivo se realizó una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y

así, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

3.2.2.1. Experimentos de citometría de flujo

Este método permite la realización de varias medidas simultáneas en células, orgánulos celulares u otras partículas que viajan inmersas en un fluido. Estas partículas son alineadas frente a una fuente de luz láser, gracias a la presión ejercida por otro fluido denominado envolvente, de manera que se consigue su paso individual y constante frente a la luz. De este modo es posible recoger la información correspondiente a dos tipos de parámetros, los que reflejan la dispersión de la luz cuando incide sobre una partícula y los relacionados con la emisión de la luz por fluorocromos presentes en dicha partícula, cuando ésta es excitada por el láser.

La luz que incide sobre la partícula en suspensión es dispersada en todas las direcciones y la intensidad luminosa a distintos ángulos constituye un índice relativo de ciertos parámetros relacionados con dicha partícula:

- La cantidad de luz dispersada en un ángulo inferior a 10° es recogida por un detector situado frente a la fuente luminosa, constituyendo uno de los parámetros analizados, el FSC ("forward light scatter"). La magnitud de este parámetro depende del índice de refracción de la partícula y es directamente proporcional al tamaño de la misma.

- La luz dispersada lateralmente y recogida en ángulo cercano a 90° constituye otro de los parámetros analizados, el SSC ("side light scatter"). En este caso, la dispersión de la luz depende de múltiples factores como la rugosidad de la membrana o la densidad y complejidad interna de la partícula (Muirhead et al., 1985).

La citometría de flujo permite también detectar la presencia de fluorocromos, ya formen parte de las partículas que se están analizando (fluorescencia natural o autofluorescencia), o bien se hallen unidos a las partículas artificialmente. También permite analizar la captación o el eflujo de los fluorocromos cuando las partículas

han sido previamente incubadas con ellos, como en el caso de los experimentos realizados con células en este trabajo de Tesis Doctoral.

Empleando fluorocromos que emiten luz a diferentes longitudes de onda, es posible medir al mismo tiempo varias propiedades de una misma partícula. Un sistema óptico formado por diferentes espejos dicróicos, que reflejan parte de la luz incidente y permiten el paso de otra fracción de la misma, se encarga de separar la fluorescencia emitida en función de su longitud de onda. Las señales de luz son captadas por los detectores y procesadas por un sistema electrónico que las transforma en señales eléctricas, las amplifica y las clasifica según su intensidad en grupos denominados canales de intensidad de fluorescencia. Luego, el sistema informático interpreta estas señales.

En este trabajo hemos utilizado la técnica de citometría de flujo para cuantificar la captación del análogo fluorescente de un ácido biliar (CGamF) y otros compuestos por células silvestres o transfectadas con las proteínas de interés. Para la detección del FITC (y de CGamF) se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm (láser azul) y se registró la fluorescencia en el canal FL1 del citómetro (530 nm; paso de banda 30 nm). Para las sondas DiIC₁(5) y SNARF-4F se utilizó una longitud de onda de excitación de 635 nm y la fluorescencia se determinó en el canal FL4 (661 nm; paso de banda 16 nm).

En todos los análisis se recogieron datos correspondientes a 5.000 eventos como mínimo (células) y se registró la fluorescencia media (\pm desviación estándar -SD-) de la población celular.

Compuestos utilizados: FITC, CGamF, SNARF-4F, DiIC₁(5), amiloride, CCCP, valinomicina, bicarbonato sódico, acetato sódico.

Soluciones utilizadas:

- Medio de incubación de sodio, pH 7,4: Cloruro de sodio 96 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.

- Medio de incubación de colina, pH 7,4: Cloruro de colina 96 mM, KCl 5,3 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, MgSO_4 0,8 mM, CaCl_2 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.
- Medio de incubación de potasio, pH 7,4: Cloruro de potasio 96 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, MgSO_4 0,8 mM, CaCl_2 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.

Todas las soluciones utilizadas en los experimentos de citometría de flujo se filtraron con un filtro de 0,2 μm de tamaño de poro (Sartorius).

- FACsFlow (fluido envolvente para el citómetro).

Procedimiento:

Las células se sembraron en placas de 10 cm de diámetro, a una densidad de 2×10^6 células/placa. El experimento se inició a las 72 horas del cultivo, tiempo necesario para que se alcanzara subconfluencia. En todos los casos, 24 horas antes de su utilización, se añadió al medio de cultivo butirato sódico a una concentración final de 5 mM para inducir la expresión proteica. En este punto se seleccionaron placas de células de 3,5 cm de diámetro, que se utilizaron para visualizar al microscopio la acumulación de CGamF tras 15 minutos de incubación a 37°C con el sustrato fluorescente a una concentración final de 10 μM . En el resto de placas, las células, tras la tripsinización, se precipitaron y resuspendieron en 1 ml de medio de captación. Se determinó la carga celular del ácido biliar fluorescente CGamF en presencia o no de diferentes compuestos y el efecto de éstos sobre el pH intracelular y el potencial de membrana a partir de la fluorescencia de SNARF-4F y DiIC₁(5), respectivamente. Se realizaron dos tipos de experimentos diferentes:

1-. Experimentos de captación en función del tiempo

Las suspensiones de células se incubaron a 37°C, en la oscuridad y con agitación, en medio de incubación que contenía el compuesto fluorescente a estudiar, a la concentración adecuada. La captación se paró añadiendo 900 μl de medio frío inmediatamente tras el inicio de experimento (tiempo 0) o al tiempo indicado.

Finalmente, se analizaba la fluorescencia de las células en el citómetro de flujo. Los compuestos fluorescentes estudiados fueron FITC, CGamF, SNARF-4F y DiIC₁(5).

2-. Experimentos de captación a 15 min.

Las suspensiones de células se incubaron a 37°C, durante 15 minutos en la oscuridad y con agitación, en medio de incubación con sodio, colina o potasio que contenía el compuesto fluorescente a estudiar en presencia o no de los compuestos: amiloride (1 mM), CCCP (50 µM), valinomicina (10 µM). Los compuestos fluorescentes estudiados fueron: FITC y CGamF a una concentración en el rango 1-5 µM dependiendo del transportador a estudiar, SNARF-4F 2 µM y DiIC₁(5) 2 nM. Tras una incubación de 15 minutos, se paraba la captación por adición de 900 µl de medio de incubación a 4°C y se medía la fluorescencia de las células en el citómetro de flujo.

3.2.2.2. Experimentos de captación de ATC radioactivo en células CHO

Soluciones utilizadas:

Medio de preincubación (MP), pH 7,4: Cloruro de sodio 96 mM, KCl 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, D-glucosa 11 mM, y HEPES 50 mM.

Medio de captación (MC), pH 7,4: Igual composición que el medio de preincubación. El pH del MC se ajustó hasta 6,5 por adición de la cantidad adecuada de HCl.

Medio Lowry: NaOH 100 mM y Na₂CO₃ 189 mM.

Procedimiento:

Los experimentos de captación de [³H]-ATC se realizaron siguiendo un protocolo puesto a punto previamente en nuestro grupo de investigación (Marin et al., 2003). Las células se sembraron en placas de 3,5 cm de diámetro, a una densidad de 2x10⁵ células/placa. El experimento se inició a las 72 horas del cultivo, tiempo necesario para que se alcanzara semiconfluencia en todos los casos. Las células

se preincubaron a 37°C durante 30 min con MP. Tras aspirar el medio, se añadió 1 ml de MC que contenía [³H]-ATC a una concentración final de 10 µM disuelto en cada una de las soluciones de pH 7,4 ó 6,5 y se realizó la incubación a 37°C durante 15 min. Terminado el tiempo de incubación se colocaron las placas sobre hielo, se aspiró el medio y se añadió rápidamente 1 ml de MP frío. Los lavados se repitieron 4 veces, y a continuación, se añadió 1 ml de medio Lowry a temperatura ambiente para despegar y digerir las células. Las placas se raspaban con una espátula para obtener el extracto celular y se tomaba una alícuota de 25 µl para determinar proteínas (apartado 3.2.7.4) y otra de 700 µl para determinar radioactividad (apartado 3.2.7.5).

3.2.2.3. Experimentos con hepatocitos primarios en cultivo

Estos experimentos son fruto de una colaboración y se llevaron a cabo en el grupo de la Dra. Catherine Williamson en el Imperial College de Londres.

Los hepatocitos se obtuvieron a partir del tejido por perfusión con colagenasa (Selden et al., 2007). Una vez aislados se sembraron en placas de 24 pocillos cubiertas de colágeno tipo I utilizando medio base para hepatocitos con los suplementos correspondientes (Selden et al., 2007).

Captación de [³H]-ATC en hepatocitos primarios en cultivo: Los hepatocitos sembrados en placas de 24 pocillos se incubaron a 4°C/37°C con 250 µl de medio de captación, compuesto por 0,2 µM de [³H]ATC y ATC no marcado hasta alcanzar la concentración deseada en PBS durante 5-60 minutos en presencia o no de 50 µM de PM4-S/PM5-S. La captación se paró lavando con 500 µl de una solución 1 mM de ATC a 4°C y las células se lisaron con 250 µl de buffer RIPA (nonidet 1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1% en PBS). Posteriormente se mezclaron 175 µl del lisado con 2 ml de líquido de centelleo para determinar la radioactividad (apartado 3.2.7.5). El remanente se utilizó para medir la cantidad de proteína y así poder corregir los resultados (apartado 3.2.7.4). Cuando se quería determinar la captación dependiente o no de sodio, se utilizaron medios de cloruro sódico o cloruro de colina, según interés, en lugar de PBS (Vicens et al., 2007).

Determinación de la acumulación intracelular de PM5-S en hepatocitos primarios en cultivo: Los hepatocitos, sembrados en placas de 24 pocillos, se incubaron a 4°C/37°C en presencia o no de 50 µM de PM5-S durante 10 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS a 4°C, y se añadieron 250 µl de metanol para raspar las placas. Los lisados celulares se sonicaron durante 30 segundos. Las muestras se sometieron a solvolisis con tetrahidrofurano y ácido trifluoroacético y fueron finalmente analizadas por GC-MS (Marschall et al., 2001).

3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para determinar los niveles de expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de aniones orgánicos se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, 1990), la PCR cuantitativa a tiempo real (PCRQ). Esta técnica además de amplificar una secuencia específica de ADN, permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto acumulado en la reacción durante la fase exponencial del proceso, cuando todos los componentes de la reacción están en exceso y no son limitantes.

La PCRQ se realizó en el termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem) que detecta la fluorescencia emitida por un fluorocromo excitado a una determinada longitud de onda. Uno de los más utilizados es el SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción "SYBR Green PCR Master Mix"). Este compuesto se une al surco menor de cualquier doble hélice de ADN generada aumentando enormemente sus propiedades fluorescentes. El incremento de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto sintetizado. Además, nos permite confirmar la especificidad de los productos amplificados, a través de un ciclo de desnaturalización que se programa al terminar la PCR. La curva de disociación que se obtiene al representar la primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura sólo tendrá un pico cuando un único fragmento de ADN haya sido amplificado, a partir del cual se puede determinar la temperatura de fusión (T_m).

Una alternativa a los agentes intercalantes, como el SYBR Green I, es el uso de sondas Taqman[®] que son oligonucleótidos complementarios a una de las cadenas del ADN diana y se localizan entre el cebador directo ("forward") y el inverso ("reverse"). Llevan unidos dos fluorocromos, uno en el extremo 5' ("reporter") y otro

en 3' ("quencher"). A medida que la reacción progresa, la actividad 5'-3' exonucleasa de la AmpliTaq ADN polimerasa degrada la sonda a su paso liberando al "reporter" y aumentando la emisión de su fluorescencia, que es proporcional al producto generado. A diferencia de los agentes intercalantes, la hibridación entre la sonda y la diana para generar señal fluorescente es específica, por lo que la amplificación inespecífica producida por uniones incorrectas de los primers o la formación de dímeros de primers no genera ningún tipo de señal.

3.2.3.1. Obtención y cuantificación del ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial "RNeasy[®] spin columns" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido ó 1×10^6 células, según el caso.

Las muestras se conservaron inmediatamente a -80°C en el agente de estabilización "RNA*lute*" (Qiagen) hasta el momento de la extracción del ARN total. Para comenzar, las muestras se lisaron y homogeneizaron en un tampón desnaturante que contenía tiocianato de guanidina, que inactiva las ARNasas y asegura la integridad del ARN durante la extracción. A continuación se añadió etanol, para proporcionar las condiciones adecuadas de retención, y las muestras se aplicaron a las columnas, donde el ARN se une a las membranas y los contaminantes se eliminan por lavados y centrifugaciones sucesivas. El ARN adsorbido en la membrana se trató con ADNasa I (GE Healthcare). Finalmente, el ARN total se eluyó de las columnas con agua bidestilada libre de ARNasas y se cuantificó fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.2.7.1).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1% (apartado 3.2.3.5). Las muestras (0,5 μg del ARN total extraído) se disolvieron en una solución de carga desnaturante con bromuro de etidio y se incubaron a 75°C durante 10 min antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizaba en tampón MOPS a voltaje constante. Al finalizar, los geles se fotografiaron en un transiluminador. Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

3.2.3.2. Transcripción reversa (RT)

Una vez aislado el ARN se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc) que sirvió como molde en la reacción de PCR. La retrotranscripción se lleva a cabo con la transcriptasa reversa, una enzima de origen viral. Las más usadas son la del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) o del virus de la mieloblastosis aviar (AMV).

En esta memoria se han utilizado dos métodos para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, el primero se utilizó como método estándar para obtener el ADNc que se iba a usar en las reacciones de PCR a tiempo real y el segundo se utilizó para obtener los ADNc que se iban a usar en las tarjetas microfluídicas.

En el primer caso, la reacción se inició incubando durante 5 min a 65°C 2 µg del ARN total con una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y “random” hexámeros u “oligo-dT”, según el caso, que actuaron como cebadores o “primers” de la transcripción. A continuación, para que se llevase a cabo la síntesis del ADNc, se añadió la enzima AMV-RT, transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV-RT) en su tampón adecuado y las muestras se incubaron primero 10 min a 25°C seguidos de un ciclo de 50 min a 50°C, cuando se utilizaron “random” hexámeros, o sólo un ciclo de 50 min a 50°C, cuando se usaron “oligo-dT” como cebadores. Por último, se calentaron 5 min a 85°C, para inactivar la retrotranscriptasa, evitando así su posible interferencia en pasos posteriores.

En el segundo caso, tal como recomienda el fabricante de las placas microfluídicas (Applied Biosystems), se utilizó el “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen). Se partió de 2,5 µg del ARN total y se añadió una mezcla que contenía cebadores “random”, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y MgCl₂. A continuación, para que se llevase a cabo la síntesis del ADNc, se añadió la enzima del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) en su tampón adecuado y las muestras se incubaron primero 10 min a 25°C seguidos de un ciclo de 60 min a 42°C. Finalmente, y al igual que en el caso anterior, se realizó una incubación de 5 min a 85°C para inactivar la retrotranscriptasa.

3.2.3.3. Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADN codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El programa busca cebadores teniendo en cuenta las siguientes pautas:

- El fragmento a amplificar o amplicón, tendrá un tamaño de entre 50 y 150 pb.
- Mantener el contenido de G-C en el rango de 20-80%.
- Evitar varios nucleótidos idénticos seguidos, especialmente guaninas (<4G).
- La temperatura de desnaturalización (T_m) debe estar entre 58-60°C.
- Los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' no deben tener más de 2 G y/o C.

Los cebadores se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales Sigma-Genosys, Isogen o Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua bidestilada y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

3.2.3.4. Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron, en todos los casos, las mismas. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 seg a 95°C y de 1 min a 60°C.

Como se mencionó anteriormente, tras finalizar la reacción de PCR, las muestras se calentaron en el termociclador desde 60 a 95°C, mientras que se monitorizó la fluorescencia, para obtener las curvas de desnaturalización del ADN amplificado.

Durante la puesta a punto de los métodos para amplificar el ADNc de cada proteína, se comprobó la especificidad de la reacción de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante al 2,5% (apartado 3.2.3.5) de los productos amplificados y de los blancos de reacción. Se incluyó en todos los geles un estándar comercial de ADN de 25 pb. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE a voltaje constante (80 V).

Para corregir las pequeñas variaciones que pueden producirse en la obtención del ARN total y en la transcripción reversa (RT), se determinaron, paralelamente en cada muestra, los niveles de expresión del gen normalizador ARN ribosómico (ARNr) 18S utilizando los reactivos “Taqman® Ribosomal RNA Control Reagents Kit” y la mezcla de reacción “Taqman® Universal PCR Master Mix”. Las determinaciones se realizaron siempre por triplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

3.2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Geles de agarosa desnaturalizantes

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa adecuada para alcanzar la concentración del 1% (p/v) y se disolvió en agua bidestilada. Para facilitar la disolución, la mezcla se calentó hasta ebullición y se mantuvo en agitación constante. Seguidamente, se añadió el tampón MOPS 10x (10% v/v) y el formaldehído al 37% (18% v/v). Cuando la solución se enfrió hasta unos 50°C, se depositó sobre un molde y se colocó el peine adecuado al número de muestras. Una vez polimerizada la agarosa, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis que contenía el tampón de electroforesis MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante que contenía bromuro de etidio al 0,008% y se calentaron a 75°C durante 10 min. Antes de cargar las muestras, el gel se sometió a una corriente de 50 V para limpiar las calles.

Todo el material utilizado en la realización de los geles fue convenientemente tratado para eliminar las RNAsas y evitar así la degradación del ARN.

Reactivos utilizados:

- Tampón MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, AEDT 10 mM, pH 7,0.
- Solución de carga desnaturizante: formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), xileno cianol 0,025% (p/v), AEDT 18 mM y SDS 0,025% (p/v).

Geles de agarosa no desnaturizantes

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa necesaria y se disolvió en TAE para alcanzar el 1% o el 2,5% (p/v) en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Para disolver la agarosa, la mezcla se calentó hasta ebullición. Según el caso, se añadió a continuación bromuro de etidio hasta conseguir una concentración de 0,005% (v/v), o se realizó la tinción del gel tras la electroforesis. Una vez que la agarosa hubo polimerizado en un molde con el peine adecuado, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de carga antes de depositarse en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 100 pb, 500 pb ó 1 kb, según los casos. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica a una velocidad constante de 80 V. Si el bromuro de etidio se había añadido previo a la electroforesis el gel se reveló. Cuando el gel no contenía bromuro de etidio, se tiñó por inmersión en una solución de TAE con bromuro de etidio 5 µg/ml durante 15 min en agitación y se realizaron dos lavados de 10 min con TAE, antes de visualizar las bandas al UV.

Reactivos utilizados:

- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8.
- Solución de carga no desnaturizante: sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v).

3.2.3.6. Cuantificación de los resultados

La reacción de PCR a tiempo real se basa en el ciclo en el que se detecta la amplificación de un determinado producto, y no en la cantidad del producto acumulado después de un determinado número de ciclos. Cuantas más copias del gen de interés hubiera inicialmente, antes se detectará un incremento de la fluorescencia. En los primeros ciclos de la PCR, hay pocos cambios en la fluorescencia y ésta es más inestable, a esta fase se le llama línea base (“baseline”). Se considera que hay amplificación de un producto cuando se detecta un incremento en la fluorescencia a partir de la línea base. Por otro lado, se ha de fijar un umbral (“threshold”) por encima de la línea base y común para todas las muestras y que coincida con la fase lineal de la curva de incremento de fluorescencia.

El parámetro Ct (ciclo umbral o “threshold cycle”) se define como el ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral fijado y éste será el parámetro que nos permita realizar la cuantificación. Cuanto menor sea el Ct de una muestra, mayor será la cantidad de producto inicial de la misma, ya que habrá alcanzado el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos.

Cuantificación Absoluta

Para la cuantificación absoluta se realizaron rectas de calibrado utilizando diluciones seriadas a partir de una cantidad conocida de un fragmento ADNc de cada gen obtenido por PCR a partir de un tejido o línea celular donde está abundantemente expresado. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante al 2,5% (apartado 3.2.3.5) teñidos por inmersión durante 15 min a temperatura ambiente en una solución de bromuro de etidio 5 µg/ml disuelto en TAE y protegidos de la luz. La banda correspondiente al amplicón en cada caso se extrajo del gel y se purificó utilizando el kit “QIAquick Extraction Gel”, siguiendo las especificaciones del proveedor. Tras valorar por PicoGreen la cantidad de ADN purificado (apartado 3.2.7.2), se calculó el número de copias/µl del amplicón utilizando la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ de copias}/\mu\text{l} = ([\text{ADN}]/\text{Pm}) \times N$$

donde;

- [ADN]: concentración de ADN determinada por PicoGreen (ng/μl).
- Pm: peso molecular del amplicón calculado en función a su contenido en GC y AT.
- N: número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$).

Los resultados se expresaron como número de copias del gen de interés por cada 10^6 copias del ARNr 18S.

Cuantificación Relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno nos dará un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ARN añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para que el método de cuantificación relativa tenga validez es necesario realizar un experimento para comprobar que las eficacias de amplificación de la diana y el control endógeno son aproximadamente iguales. En caso negativo se tendría que trabajar con las curvas estándar. Una vez asegurada la misma equivalencia en la amplificación de la diana y el control, éste es el método más práctico. Aunque para poder llevarlo a cabo y comparar los resultados, es necesario designar una muestra como calibrador. El calibrador es una muestra que sirve como base para comparar los resultados, es decir, es al que se le otorga el valor 1 de expresión. La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

1. Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (en cada placa se dispone de cada muestra por duplicado).
2. Calcular ΔCt como Ct diana - Ct control endógeno.
3. Calcular $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt muestra - ΔCt calibrador/muestra control.

3.2.3.7. Tarjetas microfluídicas

Las tarjetas o placas microfluídicas ("Microfluidic Cards" o "Taqman Low Density Arrays") son placas de 384 pocillos, comercializadas por Applied Biosystems en diversos formatos. Esta tecnología se basa en la PCR a tiempo real con las sondas Taqman de Applied Biosystems, pudiendo analizar una muestra por cada pocillo de la placa, es decir, 384 reacciones de PCR al mismo tiempo. Las ventajas que presenta son que se puede diseñar la placa a medida en función de las necesidades que requiera el estudio que se pretenda realizar y que el volumen de ADNc que se utiliza para cada reacción de PCR es mucho menor. Es un método sensible, fiable, más barato que si se compran todas las sondas por separado y, sobre todo, muy rápido. Las sondas Taqman que se escojan vienen liofilizadas en cada uno de los pocillos y, en función del formato que se elija, se puede analizar la expresión de entre 12 y 384 genes diferentes.

Por ejemplo, si se escoje el formato de 12, en la placa habrá 12 sondas diferentes por cuadruplicado y se podrán analizar 8 muestras por placa. En cambio, si se escoje el formato de 384, en la placa se tendrán 384 sondas diferentes y tan sólo se podrá analizar una muestra por placa. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el formato 96 de las tarjetas microfluídicas, en el cual se escogieron 93 genes y los controles endógenos ARNr 18S, GAPDH y β -actina.

Replicatas																								Port			
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	1	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B		2
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C		
72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D			
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E	3	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F		4
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G		
72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H			
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	5	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J		6
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K		
72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	L			
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	7	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N		8
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O		
72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P			

Figura 1. Formato de las tarjetas microfluidicas utilizadas.

Como muestra la figura 1, cada placa tiene 8 puertos por los que se cargan las muestras (en nuestro caso, cargamos 2 muestras por duplicado en cada placa). En el momento de poner la reacción de PCR, se mezclan cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de retrotranscripción con la Taqman Master Mix, y se carga la muestra por cada uno de los 8 puertos de la placa. Una vez cargados todos los puertos, la placa se centrifuga 2 veces a 300 xg durante 1 minuto cada vez para que toda la muestra se reparta entre los 48 pocillos que tiene cada puerto. Posteriormente se sella la placa y se lleva a cabo la reacción de PCR en el aparato AB Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). En estas tarjetas el análisis de los resultados únicamente se puede llevar a cabo mediante cuantificación relativa por comparación de Ct (apartado 3.2.3.6) utilizando los genes GAPDH y β -actina como controles endógenos. Para el análisis de expresión de los diferentes genes de un mismo paciente, se utilizo la muestra control como calibrador. Para el análisis de expresión entre los diferentes pacientes, se utilizo el valor de Ct promedio de cada gen como calibrador.

3.2.4. SÍNTESIS “IN VITRO” DE ARNm DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Para la síntesis “in vitro” del ARNm de los transportadores de aniones orgánicos de rata *Oatp1a1* y *Bsep*, y de los transportadores humanos *OATP1B3*, *OATP1B1*, y *NTCP* se utilizó el kit comercial “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” (Applied Biosystems) y se partió de bacterias que contenían los plásmidos recombinantes *pSPORT1-Oatp1a1*, *pSPORT1-Besp*, *pSPORT1-NTCP*, *pCMV6-XL4-OATP1B3* y

pCMV6-XL4-OATP1B1 que fueron cedidos generosamente por los Drs. Peter Meier, Bruno Hagenbuch y Bruno Stieger del Hospital Universitario de Zurich (Suiza). Las bacterias con el plásmido pSPORT1-hCE1 prodecían de nuestro grupo de investigación donde la Dra. Marta Vallejo Barrón realizó la clonación de esta secuencia (Vallejo et al., 2006).

3.2.4.1. Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformantes

Reactivos:

- Medio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7. El medio LB para las placas Petri contenía, además, 15 g/l de agar y 100 µg/ml de ampicilina.
- Medio SOC: triptona 20 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 200 g/l, MgSO₄ 240 g/l, glucosa 20 mM, pH 7.

En primer lugar, para seleccionar los transformantes, se sembraron 200 µl de bacterias en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 12 h. Después de ese tiempo, se seleccionaban algunas colonias bien definidas, aisladas y sin colonias satélites. Cada clon se sembraba en un tubo con 6 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado y se incubaban a 37°C en agitación durante unas 16 horas, tiempo en que se saturaba el crecimiento del cultivo, con una densidad óptica de más de 1,5 UA a una longitud de onda de 600 nm.

La suspensión de bacterias transformadas se centrifugó a 8000 xg, durante 2 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en un tampón que contenía ARNasa A, para eliminar restos del ARN de *E. coli*, y se añadió una solución detergente alcalina para romper las células y desnaturalizar las moléculas de ADN cromosómicas y plasmídicas, así como también las proteínas. A continuación se neutralizó el lisado y se ajustó al pH adecuado para la adsorción del ADN a la membrana la columna de extracción, añadiendo un tampón que contenía sales caotrópicas (hidrocloruro de guanidina y ácido acético). Después de centrifugar el lisado, se añadió el sobrenadante a la columna. A continuación se realizaron dos lavados sucesivos,

donde se eliminaron las endonucleasas y las sales. Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó de las columnas, en condiciones de baja salinidad, en un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. La concentración de ADN se calculó por el método de PicoGreen (apartado 3.2.7.2).

3.2.4.2. Estudio de restricción de los plásmidos

Este estudio se realizó con objeto de confirmar que los clones aislados de las bacterias contenían el vector más el fragmento de ADN que nos interesaba. En el caso del plásmido pCMV6-XL4-OATP1B3 se eligieron las enzimas XbaI, que cortaba cerca del extremo 3' del inserto y KpnI, que cortaba cerca del punto medio del inserto, y se compararon los productos resultantes de la digestión enzimática con los pesos moleculares esperados. Para pCMV6-XL4-OATP1B1 y pSPORT1-Oatp1a1 se utilizaron las enzimas NotI y XbaI. Para pSPORT1-Bsep se utilizaron las enzimas EcoRV y Hind III. Para pSPORT1-NTCP se utilizaron las enzimas XbaI y PvuII.

En un tubo se mezclaron 250 ng de ADN, el tampón correspondiente de la enzima, 1 U de enzima y agua ultrapura hasta completar un volumen de 20 µl. Se incubó durante 3 h a 37°C. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel no desnaturizante de agarosa al 1% (apartado 3.2.3.5). Sus tamaños moleculares se calcularon por comparación con un patrón de ADN de diferentes tamaños.

3.2.4.3. Linealización y purificación del ADN plasmídico

El primer paso para la síntesis "in vitro" del ARNm a partir de ADN plasmídico es la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la secuencia codificante. De este modo se evita generar transcritos heterogéneos y extremadamente largos debido a la alta procesividad de la polimerasa del fago T7. En la tabla 1 están indicadas las enzimas de restricción escogidas en cada caso para la linealización. Para cada reacción se mezclaron 10 µg de cada tipo de ADN, 100 U de enzima en su tampón correspondiente, albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración final de 0,01% y agua hasta completar un volumen de 100 µl. Se incubó durante 4 h a 37°C. La reacción se paró congelándola a -20°C y su eficacia

se comprobó visualizando el producto en un gel de agarosa al 1% (p/vol) (apartado 3.2.3.5).

Tabla 1. Plásmidos recombinantes que contienen la secuencia codificante de estas proteínas.

Plásmido recombinante	Tamaño del plásmido recombinante (pb)	Sitio clonación	Linealización	Tamaño del ARNm sintetizado (pb)
pSPORT1-Oatp1a1	6853	Sall/NotI	XbaI	2744
pSPORT1-Bsep	9194	SpeI/NotI	HindIII	5085
pSPORT1-NTCP	5676	Sall/NotI	XbaI	1576
pCMV6-XL4-OATP1B1	7070	EcoRI/Sall	XbaI	2370
pCMV6-XL4-OATP1B3	7427	EcoRI/Sall	NotI	2727
pSPORT1-hCE1	6100	Acc 65I/Bam HI	MluI	2000

Finalmente, para eliminar la endonucleasa de restricción del ADN molde, se realizó un tratamiento con la enzima proteinasa K (Roche), una serín proteasa no específica que elimina proteínas de moléculas de ácidos nucleicos. Se utilizaron 200 µg/ml de la enzima y la reacción transcurrió a 50°C durante 30 min. El material se purificó por extracción fenol:cloroformo, seguida de precipitación con etanol y acetato sódico 3 M.

3.2.4.4. Reacción de transcripción “in vitro” y purificación del ARNm

Una vez libre de contaminantes, se usaron de 0,5 a 1 µg del ADN plasmídico linealizado para la síntesis “in vitro” del mensajero. La reacción transcurrió a 37°C durante 2 h. Durante este tiempo se transcribió la ORF del gen a partir del promotor T7 dando lugar a moléculas de ARNm con 7-metilguanosina en 5’.

Al finalizar la transcripción, se eliminó el ADN molde por tratamiento con ADNasa I. Para hacer más estable a los mensajeros y mejorar su tasa de traducción, el kit incorpora un último paso para la adición de la cola de poli(A) utilizando una polimerasa poli(A) de *E. coli* y ATP. Para finalizar, el ARNm sintetizado se purificó por extracción con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol y acetato sódico 3 M. A continuación, el precipitado, secado en un “speed vacuum”, se resuspendió en 15 µl de TE (Tris 10 mM, pH 8,0) y se cuantificó por el método del RiboGreen (apartado

3.2.7.1). Por último, el tamaño molecular de los productos de la transcripción “in vitro” (Tabla 1) se confirmó por electroforesis en un gel desnaturizante al 1% (p/v) (apartado 3.2.3.5).

Todo el material utilizado en este apartado estuvo libre de ARNasas.

3.2.5. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Para los estudios funcionales de transportadores de membrana se utilizó el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*. Previo a la realización de los experimentos, los oocitos se extrajeron y se seleccionaron para la microinyección del ARNm sintetizado “in vitro” de la o las proteínas objeto de estudio.

3.2.5.1. Extracción y selección de los oocitos

Reactivos utilizados:

- Medio Barth: NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, HEPES 15 mM, KCl 1 mM, Ca (NO₃)₂ 0,3 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, gentamicina 50 mg/l, pH 7,6. El medio Barth se suplementó con una mezcla de antibióticos y antimicótico al 1% (20 U/ml penicilina, 0,02 mg/ml estreptomina y 0,05 µg/ml anfotericina B).
- Medio OR-2: NaCl 82,5 mM, HEPES 5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,8.

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de ketamina. El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral en la parte inferior del abdomen. Se extrajeron los racimos de oocitos con unas pinzas delgadas, se cortaron y se introdujeron en medio OR-2. Una vez finalizada la extracción, se cerró la incisión del abdomen con sutura continua en la capa muscular y con dos puntos individuales en “U” en la piel.

Para disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con 2 mg/ml de colagenasa disuelta en medio OR-2. Se observó entonces el estado de madurez de los oocitos y se seleccionaron los

que se encontraron en el estadio 6 de maduración que presentaban una región parda y otra amarillenta, separadas por una banda blanquecina. Los oocitos más maduros, en el estadio 7, pierden esta banda blanca y no son adecuados para los estudios de captación.

Otro criterio de calidad fue la ausencia de deformaciones. En la selección, se eliminaron los oocitos lisados, los inmaduros más pequeños y los demasiado maduros. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18°C en medio Barth hasta que se realizó la inyección del ARN. En la figura 2 se muestra una imagen de oocitos de *X. laevis* en distintos estadios de maduración.

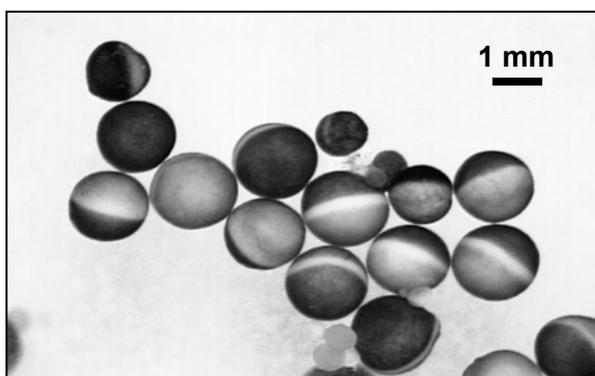


Figura 2. Imagen de oocitos de *X. laevis* extraídos y disgregados.

3.2.5.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los capilares para inyectar el ARN se obtuvieron por separación, tras calentamiento, de tubos de microhematocrito. Antes de su utilización, se cortó con unas tijeras la punta de cada capilar para asegurarse que no estuviese cerrada. A continuación, el capilar se llenó de aceite de parafina y se montó en el microinyector Nanoliter 2000 (WPI), evitando generar burbujas, y se cargó el capilar con 2 μ l del ARN disuelto en TE libre de ARNasas. Entonces, los oocitos seleccionados se colocaron sobre una placa de inyección que tenía una rejilla en el fondo para inmovilizarlos. De este modo, se facilitó su inyección bajo una lupa.

Los oocitos se inyectaron uno a uno con el volumen necesario para conseguir en el interior del oocito la cantidad deseada de ARN cargado en el microinyector. El

volumen de inyección se mantuvo constante entre los distintos grupos de oocitos y se ajustaron las diferencias de volumen con TE libre de ARNasas.

Para los experimentos de captación de un transportador de membrana en ausencia de ortólogos, cada oocito se inyectó con 9 ng del ARNm sintetizado “in vitro” (18-21 nl/oocito).

Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días, tiempo en que según experimentos previos la expresión de las proteínas transportadoras fue óptima. Diariamente, se retiraron los oocitos deteriorados y se reemplazó el medio Barth por medio fresco.

3.2.5.3. Experimentos de captación

Soluciones utilizadas

Medios de captación:

- Medio de captación con colina: Cloruro de colina 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, MES/HEPES 10 mM, pH 7,5 ajustado con Tris base 1 M. A partir de esta solución se prepararon las de pH 6,5, 5,5, 4,5 y 3,5 añadiendo la cantidad adecuada de HCl.
- Medio de captación con sodio: Cloruro de sodio 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,5 ajustado con Tris base 1 M.
- Medio de potasio: KCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,5 ajustado con Tris base 1 M.

Se preparaba una disolución de cada sustrato problema en el medio de captación a la concentración deseada en presencia o no de activadores o inhibidores. Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaron 3 veces con solución de captación sin sustrato, se separaron en grupos de 10 oocitos/condición y se aspiró el medio. A continuación, se retiraba la solución de colina con una micropipeta y se incubaba cada tubo con 100 µl de la solución que contenía el sustrato cuya captación se quería determinar, a 25°C durante el tiempo deseado. La reacción se

paraba lavando 4 veces con 4 ml de medio de captación enfriado previamente en hielo. Para finalizar se separaron los oocitos y se colocaron individualmente en tubos de centelleo, añadiendo 200 μ l de SDS al 10% para solubilizarlos. A continuación se medía la radiactividad.

La determinación del contenido celular de los derivados de progesterona PM4S y PM5S no marcados radiactivamente se realizó mediante LC-MS-MS (apartado 3.2.7.6).

En todos los casos, un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm de los transportadores (silvestres) se incubaron en paralelo y se utilizaron para determinar el transporte inespecífico.

La captación neta mediada por transportadores de carga se calculó como la diferencia del contenido celular de los oocitos que expresaban el transportador menos el contenido encontrado en los oocitos silvestres (captación inespecífica) al final del periodo experimental.

3.2.5.4. Experimentos de eflujo de ácido cólico

Este tipo de experimentos había sido previamente puesto a punto en nuestro laboratorio (Vallejo et al., 2006) y constaba de tres etapas: inyección del ARNm, carga de los oocitos con un éster de un ácido biliar, que era hidrolizado dentro de los oocitos por una esterasa cuyo ARNm se coinyectaba con el del transportador, y medida del eflujo del ácido biliar.

Los oocitos fueron inyectados con 9 ng del ARNm del OATP1B3 y con 9 ng del ARNm de la carboxilesterasa humana 1 (hCE1) o sólo con ARNm de hCE1 (grupo control). Como control positivo del experimento de eflujo un grupo de oocitos fue coinyectado con 9 ng del ARNm de la bomba exportadora de ácidos biliares (Bsep) y con 9 ng del ARNm de hCE1.

El ME-[¹⁴C]-AC fue cargado en los oocitos por incubación con 100 μ l de una solución 50 μ M del compuesto en medio de captación durante 1 h a 15°C. En este paso, unos oocitos se separaban para determinar la carga de ME-[¹⁴C]-AC por

medida de la radiactividad después de lavarlos 4 veces con 4 ml de medio de captación enfriado en hielo.

El resto de oocitos se trasladaban a un tubo con 2 ml de medio de captación sin ME-[¹⁴C]-AC, pero que en algunos casos contenía un compuesto cuyo efecto sobre el eflujo del AC se quería investigar. Los tubos se incubaban durante 2 h a 25°C.

Transcurrido este tiempo, se lavaban 4 veces con 4 ml de medio de captación enfriado en hielo. Cada oocito se introducía en un tubo, se solubilizaba con 200 µl de SDS al 10% (p/vol), y a continuación se medía la radiactividad. El eflujo de [¹⁴C]-AC se determinó por diferencia de la radiactividad de los oocitos al terminar la carga y después de las 2 h de incubación a 25°C.

3.2.5.5. Experimentos de electrofisiología

Soluciones utilizadas

- Medio de captación con sodio: Cloruro de sodio 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,5 ajustado con Tris base 1 M.
- Medio de captación con colina: Cloruro de colina 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,5 ajustado con Tris base 1 M.
- Medio de captación con ácido taucólico: El medio de captación con sodio o con colina se suplementó con ATC a una concentración final de 100 µM.

Los oocitos extraídos de rana *Xenopus laevis* (apartado 3.2.5.1) se inyectaron con 9 ng de ARNc que codificaba para las proteínas NTCP, Oatp1a1, OATP1B1 y OATP1B3 como se describe en el apartado 3.2.5.2. Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días. Como controles negativos se utilizaron oocitos no inyectados (TE).

Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando el método de mantenimiento de voltaje mediante dos electrodos (Larrayoz et al., 2006). El potencial de membrana de los oocitos se pinzó a -50 mV y se

recogieron los datos del flujo de corriente a través de la membrana utilizando el software Axoscope V1.1.1.14 (Axon Instruments, Foster City, CA, EE.UU.).

3.2.6 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.2.6.1. Obtención de muestras

Cortes de oocitos

Los oocitos de rana se procesaron siguiendo el método descrito previamente por Nakanishi (Nakanishi et al., 2003). Dos días después de inyectar el ARNm de interés en los oocitos, grupos de seis oocitos se lavaron tres veces con PBS para eliminar los restos del medio de incubación donde se encontraban. A continuación se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min sobre hielo. Tras lavar de nuevo con PBS, los oocitos se transfirieron a un tubo que contenía 1 ml de sacarosa al 30% (p/v) en PBS y se mantuvieron a 4°C durante 12 h. Una vez embebidos en la sacarosa, los oocitos se congelaron en OCT sobre isopentano frío y se almacenaron a -80°C.

Los cortes de oocitos de 5 µm se realizaron en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C y se colocaron en portas, que se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

3.2.6.2. Inmunodetección

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 3 min, y tras 3 lavados rápidos, se realizó un bloqueo con suero bovino fetal al 10% en PBS durante 30 min.

Se realizó una incubación durante 1 h a 37°C con los anticuerpos primarios monoclonales frente a OATP1B1 (clon ESL), OATP1B3 (clon MDQ) y Oatp1a1 (K-10), este último amablemente cedido por los Dres. Peter Meier, Bruno Hagenbuch y Bruno Stieger del Hospital Universitario de Zurich. A continuación se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con los anticuerpos secundarios apropiados en cada caso. La visualización de la fluorescencia se realizó con un microscopio confocal Leica TCS SP2.

3.2.6.3. Controles negativos

Para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia se llevaron a cabo los siguientes controles negativos:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.
- Omisión de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para detectar autofluorescencia de las muestras o de los anticuerpos primarios.

3.2.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.7.1. Valoración del ARN por el método del RiboGreen

El ARN total se valoró por fluorimetría, utilizando el método comercial "RiboGreen RNA Quantification kit". La técnica se basa en la unión específica de un fluorocromo (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra. Las muestras se diluyeron convenientemente en tampón TE 1x, pH 7,5. Se realizó una recta patrón con ARN ribosomal estándar 100 µg/ml comprendida entre 0 y 100 ng. Se añadió el reactivo RiboGreen diluido 1:400 a las muestras y a los puntos de la recta patrón. Se agitaron las mezclas y se protegieron de la luz durante 5 min, tras los cuales se midió la fluorescencia en un fluorímetro (Hitachi F-4010) a una longitud de onda de excitación de 500 nm y de emisión de 525 nm.

3.2.7.2. Valoración del ADN por el método del PicoGreen

Para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena se utilizó el método comercial "Pico-Green DNA-Quantitation Kit". La técnica es similar a la descrita anteriormente para el ARN y se basa en la unión de un grupo fluorocromo al ADN, el cual emite una señal proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. Las muestras se diluyeron convenientemente en TE 1x, según los casos. Se realizó una recta patrón con el ADN de doble cadena 100 µg/ml comprendida entre 0 y 100 ng (250 µl de cada dilución). Se añadieron 250 µl del reactivo PicoGreen diluido 1:400 a las muestras y a los puntos de la recta patrón. Se agitaron las mezclas y se protegieron

de la luz durante 5 minutos, tras los cuales se midió la fluorescencia en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 502 nm y 523 nm de emisión.

3.2.7.3. Determinación de la viabilidad celular

Test de Formazán

Reactivos utilizados:

- Kit “CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. En este caso se utilizó para evaluar la calidad de los oocitos. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall et al., 1995). Se puede cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de formazán producido ya que es un compuesto que absorbe a 490 nm, lo que es directamente proporcional al número de células vivas.

Los oocitos se incubaron en presencia de la mezcla MTS:PMS (1:20) a 18°C durante 16 h. Transcurrido este tiempo se determinó la intensidad del color existente en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm, en el lector de ELISA. Como blanco se usó medio de incubación en varios pocillos que habían sido incubados de igual forma que las demás placas.

El resultado se expresa como porcentaje de formazán en los pocillos en las diferentes condiciones experimentales respecto a los controles. Para ello se compara la densidad óptica obtenida en las placas expuestas a las distintas concentraciones de los compuestos con la correspondiente a las placas control.

3.2.7.4. Determinación de proteínas

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951) realizada por Markwell (Markwell et al., 1978).

En cada tubo de ensayo se añadieron 240 μl de agua destilada, 10 μl de muestra problema diluida según conveniencia y 750 μl de reactivo C. Se agitaron e incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 75 μl de reactivo Folin Ciocalteu al 50% en agua destilada y se volvieron a agitar. Por último, se incubaron 45 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

Para calcular la concentración de proteínas presente en las muestras, se elaboró una recta patrón utilizando una solución madre de BSA con un rango de concentraciones de: 12,5, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 $\mu\text{g/ml}$. La concentración final de proteínas, una vez tenidas en cuenta las diluciones realizadas, se expresó en mg/ml .

Reactivos utilizados:

- Reactivo A: Na_2CO_3 2% (p/v), NaOH 0,4% (p/v), tartrato disódico 0,16% (p/v) y SDS 1% (p/v).
- Reactivo B: CuSO_4 4% (p/v).
- Reactivo C: mezcla de los reactivos A y B en proporción 100:1 (A:B).
- Reactivo Folin-Ciocalteu: dilución del preparado comercial Folin al 50% (v/v) en agua destilada.
- Solución estándar de proteínas: BSA 0,0025% (p/v) en agua destilada.

3.2.7.5. Determinación de radiactividad

La radiactividad de los isótopos ^3H y ^{14}C se midió en un contador de centelleo líquido, utilizando en cada medida 4 ml de líquido de centelleo.

3.2.7.6. Determinación de derivados de progesterona por LC-MS-MS

Para la cuantificación del contenido de los derivados de progesterona, PM4S y PM5S, en los oocitos de *Xenopus laevis* se utilizó la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas. Esta técnica combina las propiedades de separación física mediante HPLC junto con la capacidad de análisis de la espectrometría de masas (MS), por lo que permite la detección e identificación específica de un compuesto químico dentro de una mezcla de compuestos o matriz.

La espectrometría de masas está basada en el análisis de iones que están en movimiento en condiciones de vacío. En un espectrómetro de masas hay que distinguir una fuente de ionización, donde se produce la ionización de la muestra y su conversión a fase gaseosa; posteriormente, un analizador de masas que controla el movimiento de los iones en estado gaseoso y actúa como filtro separando los iones en función de los valores de su relación masa/carga (m/z); y un detector que, según lo alcanzan los iones, genera las señales que se registran.

En el equipo utilizado en este estudio, el analizador de masas es un triple cuadrupolo (QQQ). Un cuadrupolo está formado por cuatro rodillos paralelos sobre los que se aplican potenciales eléctricos de corriente continua (CD) y radiofrecuencias (RF), que serían los componentes alternos. Los rodillos filtrarán todos los iones excepto aquellos con un valor de m/z específico, en función de los voltajes aplicados. Así, sólo los iones cuyo valor m/z sea el correspondiente al que los voltajes aplicados permitan pasar a través del cuadrupolo, alcanzarán el detector.

El funcionamiento del equipo está basado en la espectrometría de masas en tándem, en concreto, la del triple cuadrupolo, formado por tres cuadrupolos conectados en serie. El primer cuadrupolo sigue un mecanismo de actuación idéntico al explicado anteriormente y permite seleccionar iones por filtrado. El segundo cuadrupolo es una celda de colisión en la cual se requiere la presencia de un gas de colisión inerte, como el nitrógeno, y en la que se aplica un voltaje para conseguir la fragmentación de los iones que llegan a ella. Los fragmentos iónicos resultantes pasan al tercer cuadrupolo, donde se lleva a cabo una segunda etapa de filtrado, a partir de la cual se puede aislar y examinar un único ión producto, generado en la celda de colisión a partir de un determinado ión precursor al que se

permitió específicamente el paso en el primer cuadrupolo. Este modo de trabajo, denominado MRM (“Multiple Ion Monitoring”), garantiza una elevada especificidad en el análisis.

Preparación de las muestras

Los oocitos se procesaron individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se digirieron con 100 μ l de solución de lisis/extracción (metanol:agua, 9:1) conteniendo TSLC 0,5 μ M, que se utilizó como estándar interno. Tras sonicarse durante 1 min a máxima potencia se centrifugaron a 20,000 xg durante 5 min a 4°C y se recogieron 70 μ l del sobrenadante claro para el análisis del contenido de PM4-S/PM5-S por LC-MS-MS.

Análisis de derivados de progesterona por LC-MS-MS

El análisis de PM4S, PM5S y TSLC por LC-MS-MS se llevó a cabo utilizando una modificación del método descrito por Ye et al. (Ye et al., 2007).

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa, Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm, 3,5 μ m) termostaticada a 35°C. Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol:agua (60:40), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,01% de ácido fórmico, pH 4,6. El tiempo del análisis fue de 3 min. El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 2 μ l.

En primer lugar, el equipo se utilizó en modo MS2Scan para seleccionar los iones precursores. En ambos casos el parámetro m/z resultó ser de 397,1, ya que PM4-S y PM5-S son compuestos epímeros (figura 3). La ionización negativa se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de trabajo para la fuente iónica: temperatura del gas (N_2) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ión molecular - H^+) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso del TSLC se siguió la transición específica de 280,7 m/z a 464 m/z.

Se construyeron rectas patrón para cada uno de los compuestos a determinar mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,05 a 5 μ M.

Se corrigió la concentración de PM4S y PM5S calculada a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida para el estándar interno TSLC ($88 \pm 7\%$), que se detectó siguiendo la transición específica de 280,7 m/z a 464 m/z.

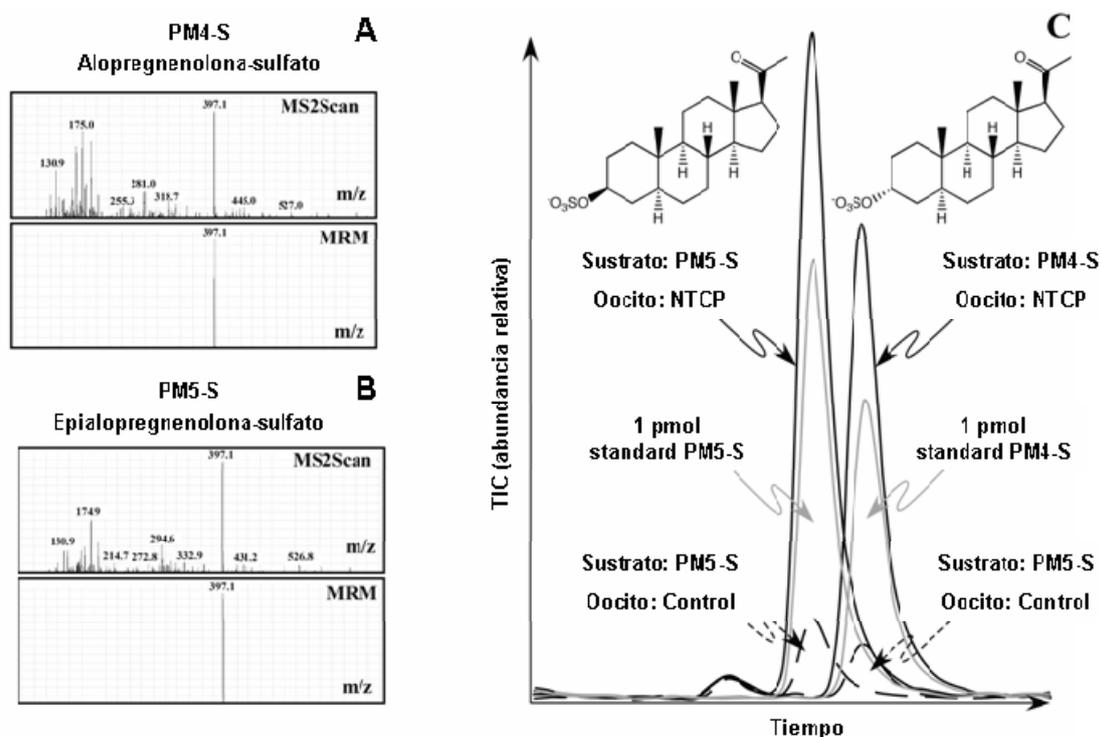
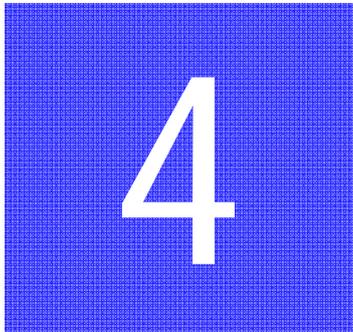


Figura 3. Espectro de masas representativo de PM4-S (A) y PM5-S (B) obtenido en el modo MS2-scan y MRM por HPLC-MS/MS usando ionización negativa por electrospray. El ión precursor (397,3 m/z) fue seleccionado en el modo MRM para generar el cromatograma del ión total (TIC). (C) Resultados representativos de TIC del análisis de un oocito por grupo experimental. Se añadió ácido taurolitocólico-3-sulfato ($0,5 \mu\text{M}$) a la solución de lisis/extracción como estándar interno. En la parte superior se muestra estructura química de PM4-S y PM5-S.

3.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de la t de Student. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o el test de t de Student de valores apareados, según el caso. Las correlaciones se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados. El análisis estadístico se realizó en un ordenador Macintosh G4 (Appel Computer, Inc., Supertino, CA) y el programa Microsoft Excel 2003.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE ANIONES ORGÁNICOS EN HEPATOCITOS MEDIADO POR EL TRANSPORTADOR OATP1B3

La eliminación de la sangre de aniones orgánicos colefílicos, ya sean xenobióticos, como fármacos y toxinas, o endógenos, como los ABs, la bilirrubina y las hormonas esteroideas, es una de las principales funciones llevadas a cabo por el hígado. El transporte vectorial de estos compuestos a cargo de los hepatocitos incluye la captación a través de la membrana plasmática basolateral o sinusoidal y la posterior eliminación a la bilis a través de la membrana canalicular. Debido a su carga y tamaño, para la mayoría de estas sustancias la difusión simple a través de ambas membranas está muy limitada, por tanto, la mayor parte del proceso depende de la expresión polarizada de proteínas transportadoras (Kullak-Ublick et al., 2004).

El transportador de taurocolato y sodio, NTCP, media una captación eficaz de ABs dependiente de sodio a través de la membrana plasmática sinusoidal (Hagenbuch et al., 1991). Junto con los transportadores de la familia de genes *SLC22A*, como los transportadores de aniones orgánicos (OATs) (Ogawa et al., 2000) y de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) (Koepsell and Endou, 2004), muchos miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP, genes *SLCO*) son los responsables, en gran medida, de la captación de aniones orgánicos colefílicos por un mecanismo independiente del gradiente de sodio (Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004). Los OATPs transportan una amplia variedad de sustratos, incluyendo ABs conjugados y no conjugados, bilirrubina, hormonas tiroideas, péptidos aniónicos y diversos fármacos (Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004).

Existen tres isoformas de OATPs expresadas en el hígado humano sano y adulto con capacidad de transportar ABs: OATP1A2, OATP1B1 y OATP1B3. El papel de OATP1A2 en la captación de ABs por los hepatocitos es probablemente menor comparada con la aportación de las otras isoformas, debido a sus bajos niveles de expresión en estas células (Briz et al., 2003b; Kullak-Ublick et al., 1995). Por contra, en base a su amplia especificidad de sustrato, altos niveles de expresión y localización a nivel de la membrana basolateral, el OATP1B1 desempeña, probablemente, un papel fundamental en la captación de aniones orgánicos (Konig et al., 2000). El OATP1B3 se encuentra también expresado a nivel de la membrana

basolateral (Konig et al., 2000) y transporta una amplia variedad de sustratos, probablemente similar a la que se ha descrito para OATP1B1 (Kullak-Ublick et al., 2001), lo que sugiere que este transportador podría contribuir a la captación de aniones orgánicos tanto en el hígado como en otros tejidos que lo expresan (Briz et al., 2003b).

La fuerza motriz responsable del transporte mediado por OATPs no se conoce aún con exactitud (Ballatori et al., 2005). Se ha sugerido la posible participación del GSH en el intercambio aniónico mediado por algunas isoformas de rata de la familia Oatp (Hofmann, 1998; Li et al., 2000), por lo que uno de los objetivos de este apartado fue dilucidar si otros miembros de la familia de OATPs humanos, especialmente OATP1B1 y OATP1B3, pueden funcionar como intercambiadores aniónicos o transportadores de GSH.

En condiciones fisiológicas, varios miembros de la familia de proteínas ABC exportan aniones orgánicos colefilicos a la bilis a través de la membrana canalicular de los hepatocitos, mientras que otras proteínas ABC como MRP1, MRP3 y MRP4 se sobreexpresan en respuesta a situaciones de colestasis y llegan a ser una ruta con relevancia funcional para la expulsión de aniones orgánicos colefilicos a través de la membrana basolateral (Marin et al., 2005). Esto previene la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos dentro de los hepatocitos. Puesto que los transportadores de la familia OATP también se localizan en la membrana basolateral, decidimos investigar si estos transportadores podrían contribuir a esta función.

4.1.1. Expresión de OATP1B1 y OATP1B3 en hígado humano

En primer lugar decidimos determinar mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de expresión en hígado humano de las principales isoformas de OATPs con capacidad para transportar ABs, es decir, OATP1A2, OATP1B1 y OATP1B3. Además de en muestras de tejido sano, procedente de biopsias realizadas sobre tejido sin signos de inflamación ni fibrosis con fines diagnósticos o excedente de piezas quirúrgicas, se determinó la expresión de los OATPs en biopsias hepáticas de pacientes con enfermedades que cursan con colestasis hepática, lo que complementa diversos estudios previos realizados por otros grupos en este sentido (Oswald et al., 2001; Zollner et al., 2003; Zollner et al., 2001).

Nuestros resultados confirman algunos de los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo y otros (Briz et al., 2003b; Kullak-Ublick et al., 1995), indicando que en hígado sano la expresión de OATP1A2 es muy baja (tabla 1) como para poder jugar un papel importante en el proceso de captación hepática de aniones orgánicos desde la sangre sinusoidal. No se detectó una mayor expresión de este transportador en situaciones colestáticas que pudiera cambiar la relevancia de OATP1A2 en condiciones fisiopatológicas. Sin embargo, no se puede descartar que sea cierto lo que se ha sugerido sobre que este transportador desempeñe un papel importante en la reabsorción de ABs desde bilis hacia el plexo capilar periductular (Chignard et al., 2001).

Tabla 1. Niveles absolutos de ARNm de distintos OATPs en tejido hepático control y en muestras de pacientes con diversas enfermedades colestáticas.

	OATP1A2	OATP1B1	OATP1B3	Relación 1B1/1B3
	(Copias/10 ⁶ copias ARNr 18S)			
Control	8 ± 2	4894 ± 1208	923 ± 148	5,3
Colestasis hepatocelular	12 ± 4	7444 ± 1146	1205 ± 132	6,2
Cirrosis biliar primaria	15 ± 7	4022 ± 657	893 ± 68	4,5
Esteatohepatitis no alcohólica	7 ± 4	5500 ± 1779	873 ± 108	6,3
Hepatitis no viral	6 ± 3	5982 ± 1954	961 ± 273	6,2
Hemocromatosis	16 ± 4	6288 ± 1448	1335 ± 358	4,7

Los valores representan la media de 3 determinaciones para cada muestra llevadas a cabo por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando ARN obtenido de muestras procedentes de tejido hepático sano (control) (n=6) ó 42 biopsias obtenidas de pacientes con colestasis hepatocelular (n=12), cirrosis biliar primaria I-II (n=7), esteatohepatitis no alcohólica (n=7), hepatitis no viral (n=8) y hemocromatosis (n=8). Los niveles de expresión se normalizaron en base al contenido de ARNr 18S medido en las mismas muestras. Ninguno de los valores fue estadísticamente significativo (p<0,05), comparado con el control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

En hígado sano la expresión de OATP1B1 a nivel de ARNm fue mayor que la de OATP1B3 (tabla 1 y figura 1), aunque ambos transportadores se encuentran altamente expresados, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel fundamental en el transporte de compuestos orgánicos a través de la membrana basolateral de los hepatocitos. Además se observó una correlación significativa entre la expresión de OATP1B1 y OATP1B3 cuando los datos procedentes de todas las muestras se representaron conjuntamente, indicando que la relación cuantitativa a nivel de ARNm entre ambas isoformas era aproximadamente de 5:1 (OATP1B1 frente a OATP1B3).

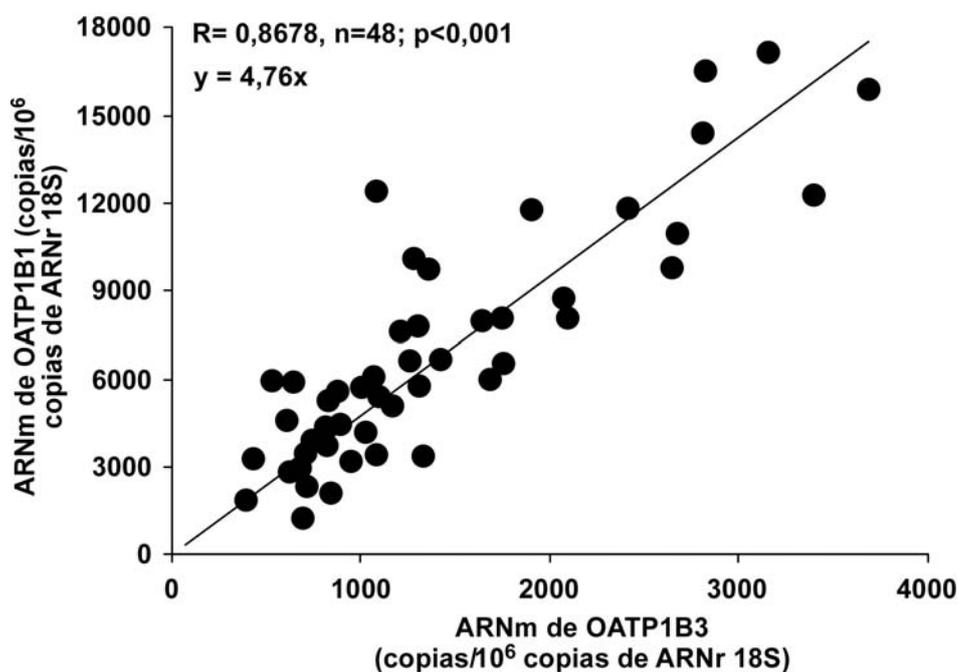


Figura 1. Relación entre la cantidad absoluta de ARNm de OATP1B1 y OATP1B3 en tejido hepático sano y de pacientes con diferentes enfermedades que cursan con colestasis hepática. Los valores representan la media de 3 determinaciones para cada muestra llevadas a cabo por RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando ARN obtenido de muestras procedentes de tejido hepático sano (n=6) ó 42 biopsias obtenidas de pacientes con colestasis hepatocelular (n=12), cirrosis biliar primaria I-II (n=7), esteatohepatitis no alcohólica (n=7), hepatitis no viral (n=8) y hemocromatosis (n=8). Los niveles de expresión se normalizaron en base al contenido de ARNr 18S medido en las mismas muestras.

No se observó una reducción significativa de la expresión de ninguna de las tres isoformas en los hígados colestáticos aquí estudiados. Sin embargo, esta no puede ser considerada como una regla general. Así, en un estudio previo de cuatro pacientes con colangitis esclerosante primaria, los niveles de ARNm de OATP1B1 estaban reducidos a la mitad (Oswald et al., 2001). La expresión, tanto de OATP1B1 como de OATP1B3 también se ha visto reducida en los tipos 2 y 3 de

colestasis intrahepática familiar progresiva (Keitel et al., 2005). Además, en pacientes con cirrosis biliar primaria grado III, se ha observado una caída en la expresión de OATP1B1 (Zollner et al., 2001). En el presente estudio, aunque no significativa, se ha observado una tendencia a la baja, en la expresión de OATP1B1 en biopsias procedentes de pacientes con cirrosis biliar primaria I-II.

4.1.2. Capacidad de OATP1B3 para transportar ácidos biliares

Puesto que existe controversia acerca de la participación del OATP1B3 en la captación hepática de ABs, se estudió la capacidad de esta proteína de captar diferentes especies moleculares de ABs mayoritarios, ya sean no conjugados, o conjugados con taurina o glicina. Para realizar estudios funcionales con esta proteína, se utilizó el modelo experimental de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*.

Debido a que en experimentos anteriores de nuestro grupo no se habían observado diferencias significativas entre oocitos inyectados con la solución tampón en la que se disuelve el ARNm (TE) y oocitos no inyectados, en cuanto a su capacidad para captar ABs o 17 β GE (Briz et al., 2003a), en este estudio se utilizaron oocitos no inyectados para determinar la captación no específica.

Como muestra la figura 2, todos los ABs estudiados fueron reconocidos como sustratos en mayor o menor medida por este transportador, ya que su captación por los oocitos fue significativamente superior en los inyectados con OATP1B3 que en los no inyectados. La captación de las diferentes especies de ABs por oocitos control varía en función del estado de conjugación y del grado de hidroxilación, aunque la captación aumentó marcadamente cuando los oocitos fueron inyectados con el ARNm de OATP1B3 (figura 2). La mayor o menor captación se atribuye a las diferencias estructurales entre los ABs.

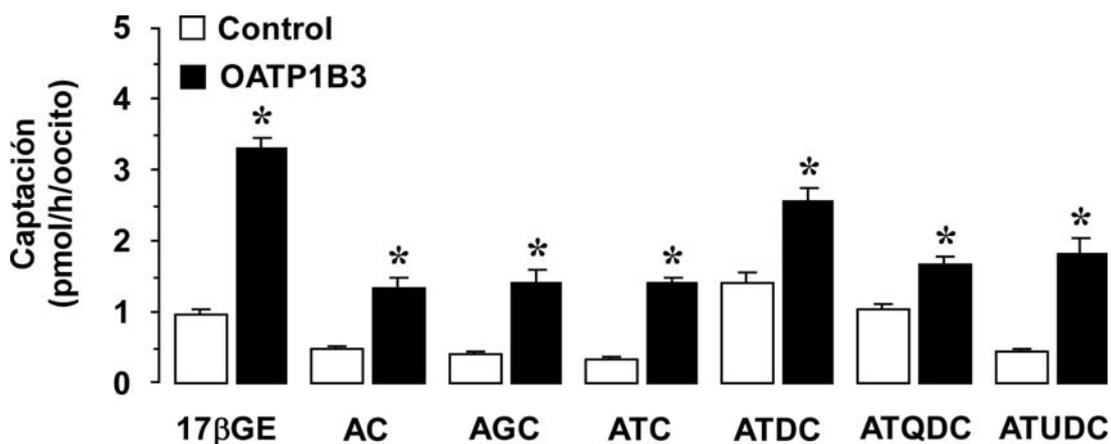


Figura 2. Captación de 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) y diferentes ácidos biliares por oocitos inyectados o no (grupo Control) con ARNm de OATP1B3. Los oocitos se inyectaron con 9 ng de ARNm de OATP1B3 y después de 2 días de incubación a 18°C se determinó la captación a 25°C durante 1 h de 10 μM 17βGE y 10 μM de los ácidos cólico (AC), glicocólico (AGC) taucólico (ATC), taurodesoxicólico (ATDC), tauroquenodesoxicólico (ATQDC) y taoursodesoxicólico (ATUDC). Los valores representan la media ± EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, p<0,05 comparado con el grupo control por el test de t de Student para valores apareados.

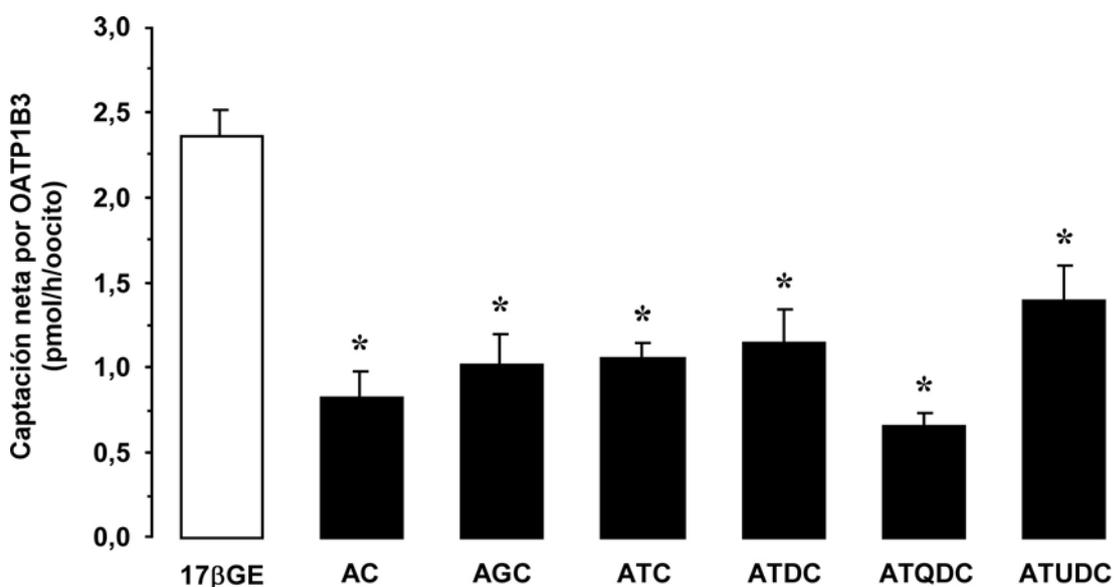


Figura 3. Captación neta de 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) y diferentes ácidos biliares mediada por OATP1B3 expresado en oocitos. Estos se inyectaron con 9 ng de ARNm de OATP1B3 y después de 2 días de incubación a 18°C se determinó la captación a 25°C durante 1 h de 10 μM 17βGE y 10 μM de los ácidos cólico (AC), glicocólico (AGC) taucólico (ATC), taurodesoxicólico (ATDC), tauroquenodesoxicólico (ATQDC) y taoursodesoxicólico (ATUDC). Para determinar la captación neta se restó la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación por OATP1B3 de cada uno de los compuestos. Los valores representan la media ± EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, p<0,05 comparado con la captación de 17βGE por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

La captación neta se calculó por diferencia entre el transporte del grupo inyectado y no inyectado y reveló que aparentemente todos los ABs se transportaban con una eficacia similar independientemente del grado de hidroxilación del núcleo esteroide y del estado libre o conjugado de la cadena lateral, así como de si estaban conjugados con glicina o taurina. En todos los casos, la captación neta de ABs fue inferior a la captación de 17β GE, un sustrato típico de OATP1B3 (Konig et al., 2000) (figura 3).

Estos resultados no concuerdan con un estudio publicado en el año 2000 (Konig et al., 2000), en el que los autores no encontraron una estimulación de la captación de ABs por células HEK293 transfectadas con OATP1B3. La aparente discrepancia de resultados referida a la capacidad de OATP1B3 de transportar ABs, probablemente se debe a que durante la construcción del plásmido recombinante usado para la transfección celular en ese trabajo se introdujo inadvertidamente una mutación artificial que, para ciertos sustratos, como la BSP, reduce la capacidad transportadora de la proteína, y para otros, como es el caso de los ABs, la elimina completamente (Letschert et al., 2004). A favor de esta hipótesis se encuentra el hecho de que la capacidad de OATP1B3 de transportar ATC y AGC también ha sido observada por otros grupos que han expresado esta proteína en oocitos (Kullak-Ublick et al., 2001), lo que, junto con nuestros resultados, confirma la capacidad de OATP1B3 de transportar ABs, aunque la magnitud de este proceso parece inferior a la llevada a cabo por OATP1B1 (Kullak-Ublick et al., 2001).

Con objeto de llevar a cabo análisis cinéticos en condiciones de velocidad inicial, se estudió la captación de un AB por oocitos que expresaban OATP1B3 en función del tiempo (figura 4). Para realizar estos experimentos elegimos el AGC entre otros ABs. Como se observa en la figura, durante los primeros 20 min la captación neta de AGC mediada por OATP1B3 fue lineal, apreciándose una pérdida progresiva de linealidad del proceso de transporte, aunque no se llegó a alcanzar una meseta en el periodo. A partir de estos resultados elegimos 15 minutos como un tiempo adecuado para posteriores estudios cinéticos en condiciones de velocidad inicial.

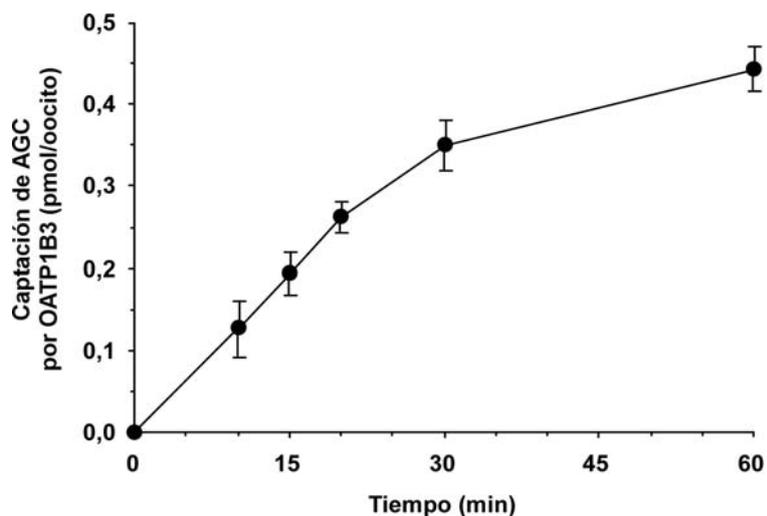


Figura 4. Evolución temporal de la captación de ácido glicocólico (AGC) mediada por OATP1B3 expresado en oocitos. Estos se inyectaron con 9 ng de ARNm de OATP1B3 y después de 2 días de incubación a 18°C se determinó la captación a 25°C durante 1 h de 10 μ M AGC. Se representa la captación neta de AGC, calculada restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación por OATP1B3. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 10 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes.

En estudios de captación a diferentes concentraciones de sustrato en condiciones de velocidad inicial, se obtuvieron curvas de saturación a concentraciones crecientes de sustrato (figura 5). El mejor ajuste para la captación mediada por OATP1B3 se obtuvo para la ecuación de Michaelis-Menten.

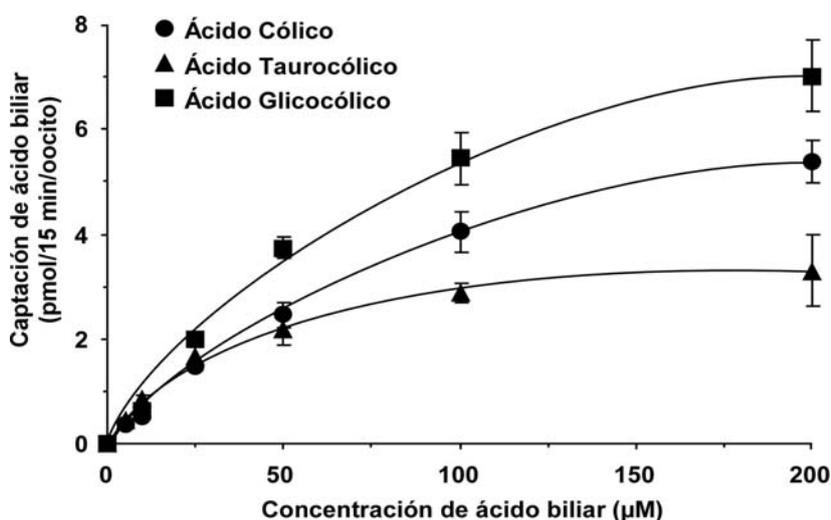


Figura 5. Cinética de la captación de ácido cólico, glicocólico y taurocólico mediada por OATP1B3 expresado en oocitos. Estos se inyectaron con 9 ng de ARNm de OATP1B3 y después de 2 días de incubación a 18°C se determinó la captación a 25°C durante 15 min del AB. Se representa la captación neta del AB, calculada restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación por OATP1B3. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 10 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes.

Los parámetros cinéticos se calcularon mediante el método de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (tabla 2). Los valores de la constante aparente de afinidad, K_M , para el AC, ATC y AGC fueron similares a los descritos previamente para el transporte de ABs mediado por otras isoformas de la familia OATP (Kullak-Ublick et al., 2001; Noe et al., 1997; Tamai et al., 2000).

Tabla 2. Parámetros cinéticos del transporte de ácido cólico (AC), glicocólico (AGC) y taurocólico (ATC) mediado por OATP1B3 en oocitos de *Xenopus laevis*.

Ácido biliar	K_M (μM)	V_{max} (pmol/15 min/oocito)	E_T (V_{max}/K_M)
AC	142,4 \pm 20	9,3 \pm 0,7	0,065
ATC	35,3 \pm 2,1	3,8 \pm 0,1	0,110
AGC	140 \pm 6,4	13,3 \pm 3,4	0,095

Los valores representan la media \pm EEM y se calcularon mediante el método de Lineweaver-Burk a partir de los datos de captación mostrados en la figura 5. E_T : Eficacia del transporte; K_M : Constante aparente de afinidad. V_{max} : Velocidad máxima del transporte.

4.1.3. Trans-activación del transporte de ácidos biliares mediado por OATP1B3

Una vez que se comprobó la capacidad de OATP1B3 de transportar ABs, el siguiente paso fue dilucidar cuál es la fuerza motriz que rige este transporte. Para diversas isoformas de la familia OATP, como el Oatp1a1 y Oatp1a4, se ha demostrado que el transporte de ABs es un proceso potencialmente bidireccional y trans-estimulado por glutatión (Li et al., 1998b; Li et al., 2000; Shi et al., 1995). Para comprobar esta hipótesis utilizamos el modelo experimental de oocitos de *Xenopus laevis* pero con algunas modificaciones respecto a los anteriores experimentos de captación y que había sido previamente puesto a punto en nuestro grupo de investigación (Vallejo et al., 2006).

Para medir el flujo de ABs, oocitos que expresaban carboxilesterasa humana 1 (hCE1) se incubaron con el éster metílico de AC marcado radioactivamente (ME-AC). Esto permitía una carga eficaz del compuesto dentro de los oocitos por difusión. Una vez incorporado en los oocitos, el ME-AC se hidrolizaba por la hCE1, estando disponible la forma libre del compuesto, el AC, para los transportadores de ABs desde la cara interna de la membrana plasmática. Como era de esperar, la

salida del compuesto aumentaba cuando la proteína Bsep se co-expresaba en los oocitos (figura 6), por lo que se usó como control positivo del experimento. Aunque de forma mínima, la expresión de OATP1B3 también aumentó el eflujo de AC (figura 6). Añadiendo ATC al medio extracelular, se observó una trans-activación del eflujo de AC mediado por OATP1B3; hecho que se puede interpretar como indicativo de que el transporte es bidireccional.

Para investigar si el OATP1B3 puede funcionar como un intercambiador trans-activado por GSH, se impuso un gradiente de GSH hacia el interior celular. Sorprendentemente, el GSH y GSSG extracelulares, que no tuvieron ningún efecto sobre el eflujo de AC en oocitos silvestres, indujeron una inhibición significativa sobre el eflujo de AC en oocitos que expresaban OATP1B3. De hecho, la reducción en el contenido de AC fue incluso menor que el observado en oocitos que expresaban sólo hCE1 (figura 6).

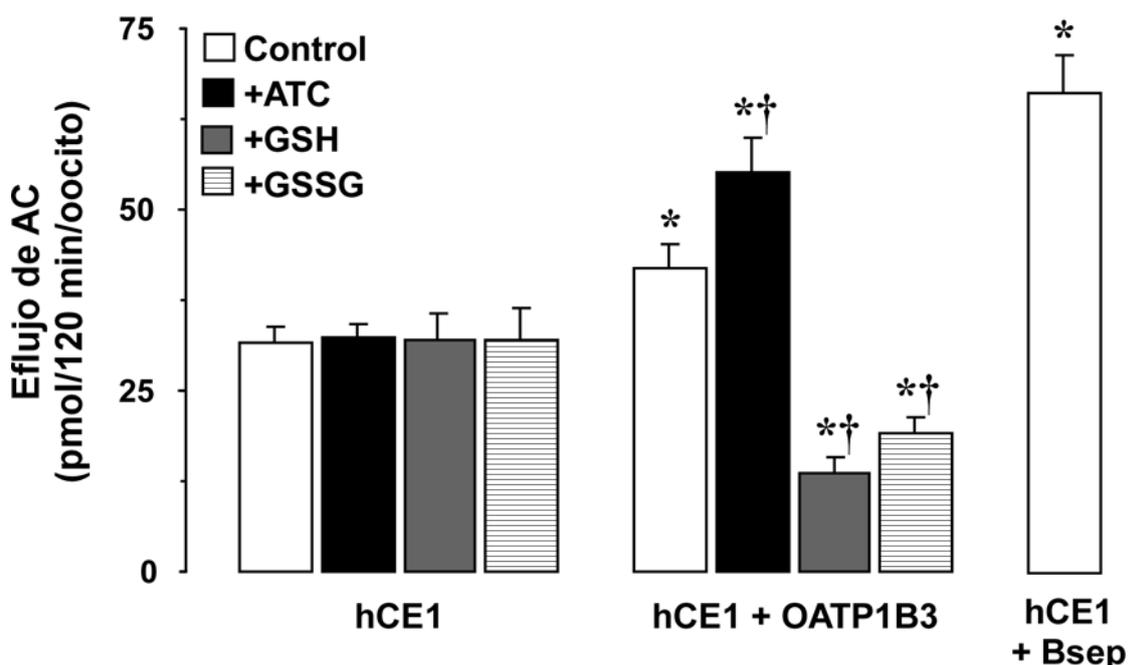


Figura 6. Efecto de la presencia de 200 μ M de ácido taucólico (ATC), 20 mM de glutatión reducido (GSH) ó 20 mM de glutatión oxidado (GSSG) sobre el eflujo de ácido cólico (AC) durante 2 h a 25°C en oocitos de *Xenopus laevis* previamente cargados con ME-AC durante 1 h a 15°C. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con ARNm de Bsep de rata (control positivo) y carboxilesterasa humana 1 (hCE1), OATP1B3 y hCE1 o sólo con hCE1. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con los oocitos inyectados sólo con hCE1 por el test de *t* de Student para valores apareados. †, $p < 0,05$ comparado con el grupo control (eflujo en ausencia de otros compuestos) por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

4.1.4. Cis-activación del transporte de ácidos biliares por OATP1B3

La observación de la caída del eflujo provocada por la presencia de glutatión en el medio extracelular hizo que nos planteásemos dilucidar el mecanismo por el cual tenía lugar este proceso. Descartada la hipótesis de que el glutatión estuviese bloqueando la salida de ABs, el otro mecanismo por el que el glutatión podría mediar esta disminución del eflujo es que favoreciera la reentrada de AB hacia el interior del oocito. Para evaluar esta posibilidad se llevaron a cabo experimentos de captación de un AB en presencia de glutatión en oocitos que expresaban OATP1B3 (figura 7). El AB elegido para realizar estos experimentos fue el ATC, ya que los estudios cinéticos realizados anteriormente (figura 5, tabla 2) revelaron que la eficacia del transporte mediado por OATP1B3 fue mayor para este AB que para el AC o el AGC. Al mismo tiempo, quisimos comparar el posible efecto estimulador del glutatión con otros activadores del transporte de aniones orgánicos en otros OATPs descritos en bibliografía como el bicarbonato (HCO_3^-) (Satlin et al., 1997).

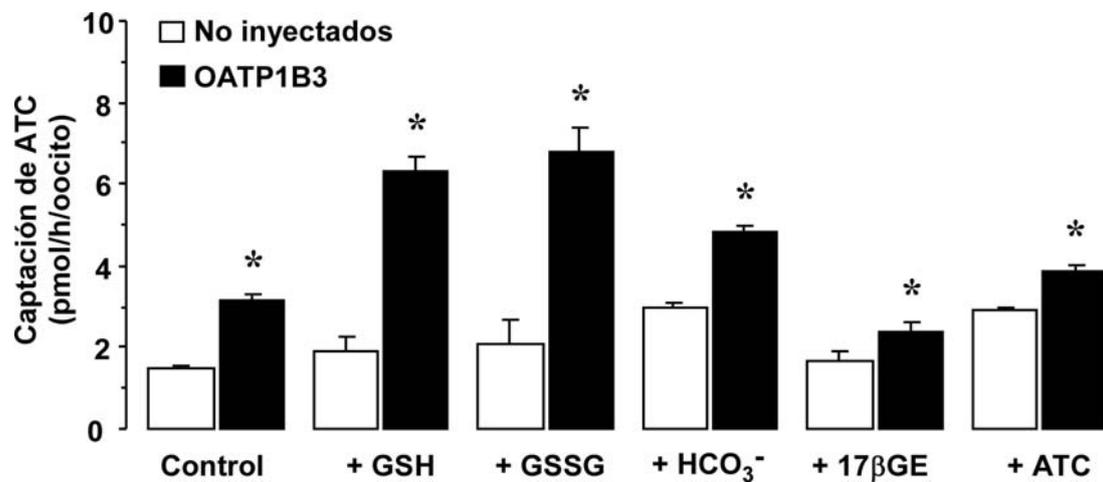


Figura 7. Efecto de diferentes compuestos sobre el transporte de ácido taurocólico (ATC) por oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban OATP1B3 o no (no inyectados). Se determinó la captación de 10 μM de ATC incubando los oocitos a 25°C durante 1 h en presencia o no (control) de 20 mM de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), bicarbonato (HCO_3^-) ó 50 μM de 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) y ATC. Los valores se expresan como media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con los oocitos sin inyectar por el test de t de Student para valores apareados.

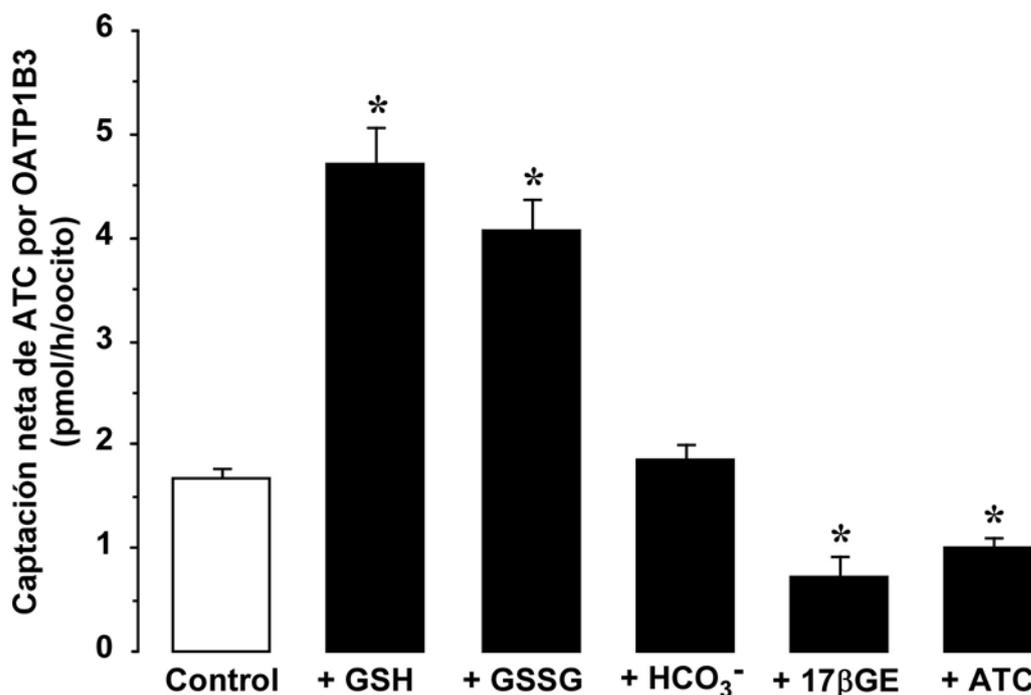


Figura 8. Efecto de diferentes compuestos sobre la captación neta de ácido taurocólico (ATC) mediada por OATP1B3 en oocitos de *Xenopus laevis*. Se determinó la captación de 10 μM de ATC incubando los oocitos a 25°C durante 1 h en presencia o no (control) de 20 mM de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), bicarbonato (HCO_3^-) ó 50 μM de 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) y ATC. Para determinar la captación neta se restó la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación por OATP1B3. Los valores se expresan como media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con el grupo control en ausencia de activadores o inhibidores por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Se observó que ambas formas de glutatión, GSH y GSSG, pero no otros aniones como el bicarbonato, fueron capaces de inducir cis-estimulación de la captación de ATC mediada por OATP1B3 (figuras 7 y 8). Por otra parte, tanto el 17 β GE como el ATC inhibieron la captación de ATC por OATP1B3, lo que era esperable si consideramos que ambos compuestos son sustratos de estas proteínas y por lo tanto median una inhibición competitiva (figuras 7 y 8). Además, el efecto estimulador del GSH y del GSSG no fue exclusivo para el ATC, ya que, tal y como se aprecia en la figura 9, la captación de otros aniones orgánicos como el 17 β GE, AC y AGC también se vio incrementada por la presencia en el medio de incubación de GSH.

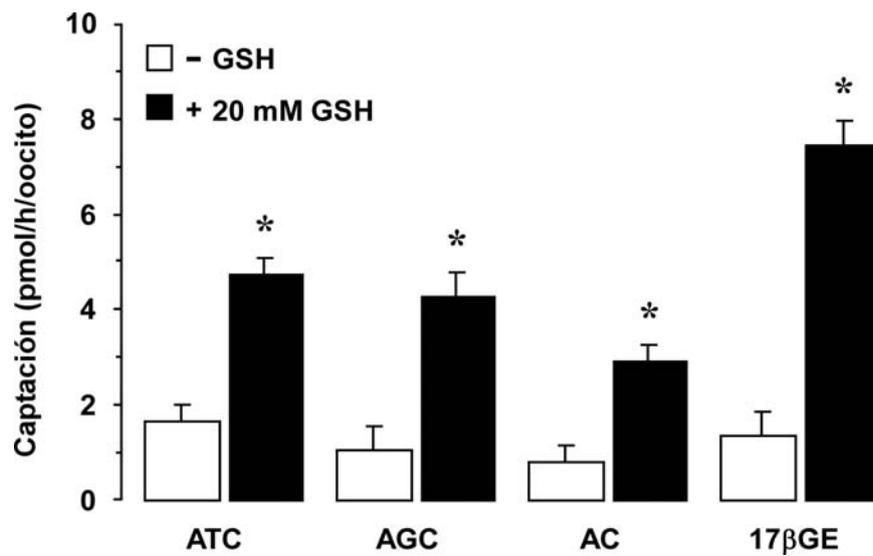


Figura 9. Efecto del glutatión reducido (GSH) sobre el transporte de ácido cólico (AC), taurocólico (ATC), glicocólico (AGC) y 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) por oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban OATP1B3. Se determinó la captación de 10 μM del sustrato incubando los oocitos a 25°C durante 1 h en presencia o no de 20 mM de GSH. Los valores se expresan como media ± EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, p<0,05 comparado con la captación en ausencia de GSH por el test de *t* de Student para valores apareados.

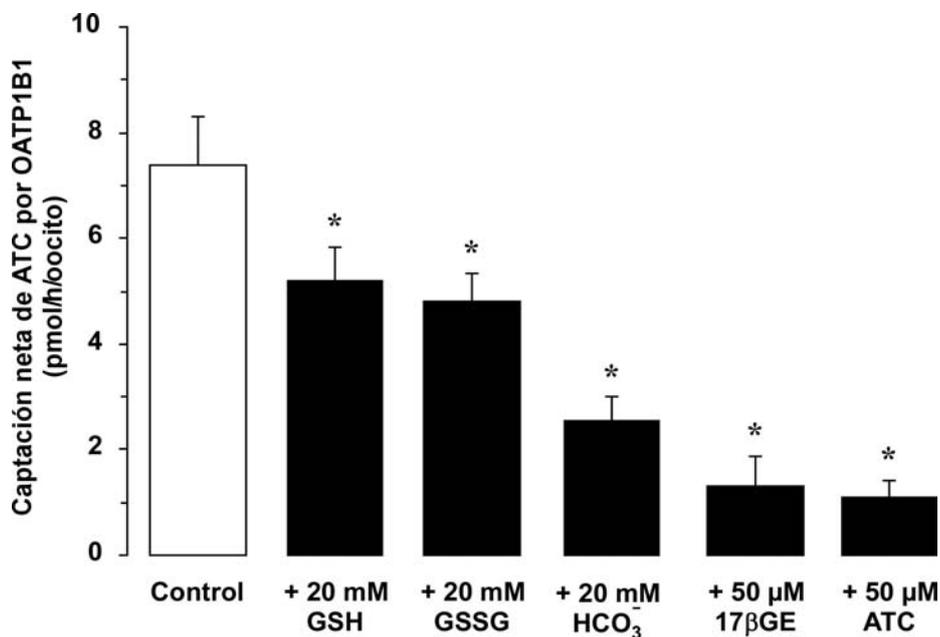


Figura 10. Efecto de diferentes compuestos sobre la captación neta de ácido taurocólico (ATC) mediada por OATP1B1 en oocitos de *Xenopus laevis*. Se determinó la captación de 10 μM de ATC incubando los oocitos a 25°C durante 1 h en presencia o no (control) de 20 mM de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), bicarbonato (HCO₃⁻) ó 50 μM de 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) y ATC. Para determinar la captación neta se restó la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación por OATP1B1. Los valores se expresan como media ± EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, p<0,05 comparado con la captación del grupo control por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Se investigó, entonces, si el transporte mediado por OATP1B1 era sensible también a la presencia de glutatión. Contrariamente a lo que se había encontrado para OATP1B3, la adición de 20 mM de GSH o GSSG al medio de incubación redujo significativamente la captación neta de ATC por OATP1B1 (figura 10). La adición de bicarbonato, ATC o 17 β GE al medio de incubación también disminuyó la captación de ATC por OATP1B1 (figura 10). Para el ATC y el 17 β GE, esta inhibición se explica, al igual que en el caso de OATP1B3, por el hecho de que ambos compuestos competirían con el sustrato para ser transportado. Por otra parte, el bicarbonato que no medió ningún efecto sobre la captación de ATC por OATP1B3 (figura 8), sí que inhibió la actividad de OATP1B1 (figura 10), lo que concuerda con el comportamiento esperado para el OATP1B1, similar al de otros miembros de la familia OATP, como intercambiador de aniones orgánicos (Hagenbuch and Meier, 2003; Satlin et al., 1997). Por el contrario, estos estudios sugieren que OATP1B3 no es un intercambiador aniónico sino probablemente un sistema de transporte pasivo.

Finalmente, para profundizar en el mecanismo de activación del GSH sobre el transporte mediado por OATP1B3 se llevaron a cabo estudios cinéticos de captación de ATC en presencia de GSH. Para fijar las condiciones de velocidad inicial se realizaron experimentos de captación de ATC en función del tiempo, de manera similar a los experimentos llevados a cabo previamente con AGC (figura 4). El periodo de tiempo en que la captación neta de ATC mediada por OATP1B3 fue lineal (figura 11A) fue similar al encontrado para AGC, durante los primeros 20 minutos, por lo que 15 minutos también fue el tiempo adecuado para posteriores estudios cinéticos en condiciones de velocidad inicial. Como se aprecia en la figura 11B, el GSH no modificó la captación inespecífica de ATC, sin embargo, incrementó la captación de ATC mediada por OATP1B3.

Los parámetros cinéticos para la captación de ATC por OATP1B3 en presencia o no de GSH se calcularon mediante el método de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (figura 11C y tabla 3) y revelaron que el incremento en la eficacia del transporte de estos sustratos (E_T) mediado por OATP1B3 – parámetro definido como el cociente entre la velocidad máxima del transporte (V_{max}) y la constante aparente de afinidad (K_M) – fue debido principalmente a un aumento de la V_{max} , mientras que la K_M no se modificó significativamente por la presencia de GSH (tabla 3).

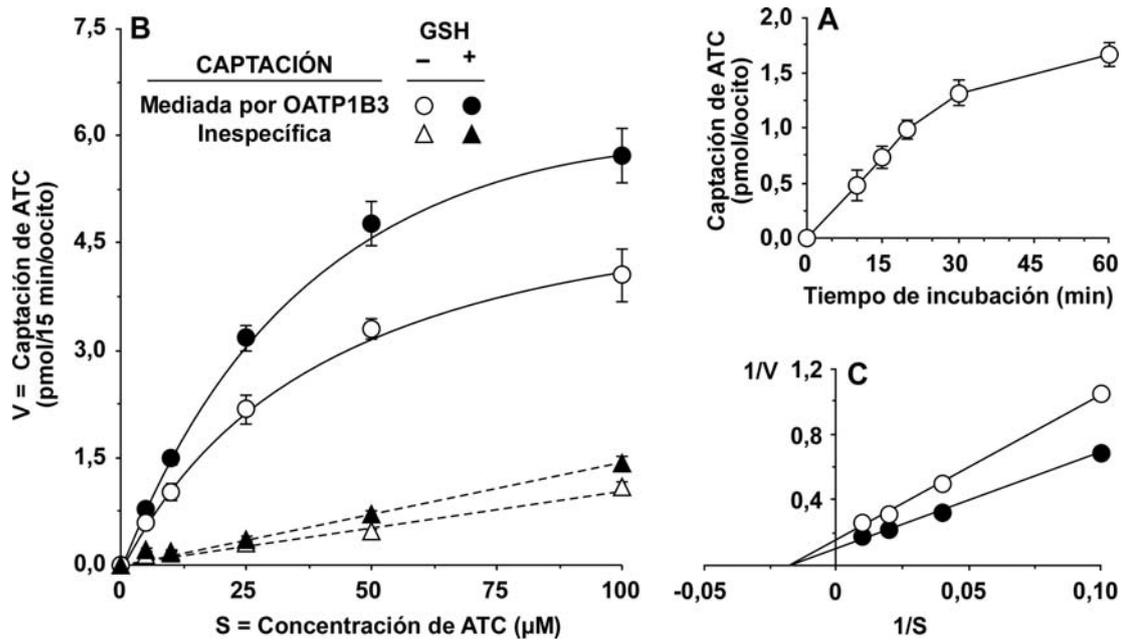


Tabla 3. Parámetros cinéticos del transporte de ácido taurocólico (ATC) mediado por OATP1B3 en oocitos de *Xenopus laevis* en presencia o no de 20 mM de glutatión reducido (GSH).

Sustrato	Activador	K_M (μM)	V_{\max} ($\text{pmol}/15 \text{ min}/\text{oocito}$)	E_T (V_{\max}/K_M)
ATC		$42,2 \pm 4,2$	$5,9 \pm 0,3$	0,14
ATC	GSH	$43,3 \pm 4,3$	$8,6 \pm 0,4^a$	$0,20^a$

La captación neta de ATC se determinó restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación mediada por aquellos que expresaban OATP1B3. Los valores representan la media \pm EEM de 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. ^a, $p < 0,05$ frente a la captación de ATC en ausencia de GSH por el test de t de Student para valores apareados. E_T : Eficacia del transporte; K_M : Constante aparente de afinidad. V_{\max} : Velocidad máxima del transporte.

Inicialmente estos resultados fueron interpretados como debidos a una activación directa del transportador por la presencia de GSH (Briz et al., 2006). Sin embargo, posteriormente, a pesar de la capacidad tamponante del medio de incubación, observamos que tanto el GSH como el GSSG inducían un descenso del pH, por lo que se llevaron a cabo estudios similares en condiciones de ajuste posterior del pH. Los resultados mostraron que en condiciones de pH controlado tanto el GSH como el GSSG carecían de efecto. Esto nos llevó a concluir que ambos transportadores OATP1B1 y OATP1B3 eran muy sensibles al pH del medio. Este fenómeno se estudió a fondo en la sección 4.2 de esta Tesis Doctoral. Los resultados concuerdan con los obtenidos en esta etapa si adelantamos que el desplazamiento del pH extracelular desde 7,5 hacia valores más ácidos determina una estimulación de OATP1B3 y una inhibición de OATP1B1.

Gracias al eficaz funcionamiento de la bomba exportadora de ABs que bombea estos compuestos hacia el canalículo biliar, en condiciones fisiológicas, el gradiente de ABs a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos se dirige hacia el interior celular. Sin embargo, en situaciones de colestasis, este gradiente se invierte. Por tanto se puede especular con que, en determinadas situaciones, OATP1B3 funcione como una ruta de exportación de aniones orgánicos. El balance entre la captación y el eflujo a través de la membrana basolateral del hepatocito estaría determinado por la magnitud y dirección del gradiente para un determinado sustrato y por la contribución al proceso de captación de diferentes transportadores.

Se han sugerido dos mecanismos adicionales que, junto con OATP1B3, podrían participar en el eflujo de ABs a través de la membrana basolateral de los hepatocitos. Uno de ellos es la bomba exportadora MRP4, que es capaz de cotransportar ABs con glutatión reducido (Rius et al., 2006). El otro es el heterodímero OST α -OST β , que está sobreexpresado en colestasis y media un transporte pasivo a favor de gradiente de sustrato (Boyer et al., 2006).

En condiciones fisiológicas, la función de OATP1B3 puede suponer una reducción en la eficiencia del proceso de captación neta, pero, en compensación, representa un rápido mecanismo para la exportación a sangre de derivados producidos por la biotransformación de aniones orgánicos colefilicos, que son posteriormente captados por otros tejidos o eliminados por el riñón, cuando la vía de excreción biliar se encuentra comprometida. La expulsión de los aniones orgánicos a través

de la membrana basolateral mediante OATP1B3 puede suponer una ruta de excreción alternativa útil para proteger a los hepatocitos cuando la expresión de OST α -OST β y MRP4 a nivel de la membrana basolateral es aún muy baja y los cambios adaptativos en la expresión de transportadores, para disminuir el efecto tóxico debido a la retención biliar, no han tenido lugar aún.

Además, nuestros resultados muestran que la expresión de OATP1B3 no se ve marcadamente disminuida en diversas enfermedades colestáticas, por lo que se puede sugerir, al menos en las condiciones estudiadas aquí, un papel de OATP1B3 en la expulsión de aniones orgánicos colefilicos hacia la sangre.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL pH Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN EL MECANISMO DE TRANSPORTE DE OATPs

Los hepatocitos están expuestos a una gran variedad de sustancias endógenas y xenobióticas que son destoxificadas por el hígado. A pH fisiológico la mayoría de estas moléculas se encuentran cargadas, por lo que su captación desde la sangre portal a través de la membrana basolateral de los hepatocitos requiere generalmente de la participación de transportadores (Kullak-Ublick et al., 2004; Meier and Stieger, 2002). Como ya se comentó en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, debido a su localización basolateral y su especificidad de sustrato, la familia de transportadores OATP participa en la captación hepática de ABs y otros compuestos colefílicos mediante un mecanismo no dependiente de sodio.

A pesar del interés de estos transportadores en diferentes aspectos de la Fisiología y la Farmacología, algunas características como la fuerza motriz del transporte y el mecanismo de funcionamiento no se conocen aún con exactitud para muchos de estos transportadores (Ballatori et al., 2005). Con respecto al potencial de membrana ($\Delta\psi$) y la electrogenicidad, se ha sugerido que los OATPs funcionan como intercambiadores electroneutros de aniones. No obstante, sólo se han obtenido evidencias claras que apoyen este concepto para el transportador de rata Oatp1a1. Por otra parte, diversos estudios han confirmado el papel del pH en el mecanismo de transporte de OATP2B1, donde la captación de ATC se incrementa considerablemente a pH ácido (Nozawa et al., 2004).

La dependencia del pH en el transporte mediado por OATPs es de gran relevancia tanto fisiológica como farmacológica, ya que la captación de sustratos se vería afectada por el pH local, que, en determinados casos, puede alejarse de los valores comunes.

A la vista de la escasa información disponible respecto a las características funcionales de dos importantes isoformas de OATP en hígado humano, OATP1B1 y OATP1B3, nos planteamos caracterizar en profundidad la dependencia del $\Delta\psi$ y del pH extracelular (pHe) en el transporte mediado por ambas isoformas humanas. En nuestros estudios decidimos incluir como referencia la isoforma de rata Oatp1a1 por ser la más conocida de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos.

4.2.1. Puesta a punto del modelo experimental de expresión de OATPs en oocitos de rana *Xenopus laevis*

Para investigar el efecto del pH sobre el mecanismo de transporte del Oatp1a1 de rata, como OATP de referencia, y de OATP1B1 y OATP1B3 humanos se utilizó en primer lugar el modelo experimental de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis*. Antes de llevar a cabo estudios funcionales, para comprobar que la expresión de estos transportadores tenía lugar de forma eficaz y específica en la membrana plasmática de los oocitos, se llevó a cabo un análisis por inmunocitoquímica. Oatp1a1 (figura 12A), OATP1B1 (figura 12B) y OATP1B3 (figura 12C) se detectaron en la membrana plasmática de los oocitos 48 horas después de la inyección del ARNm correspondiente. No se observó señal inespecífica de fluorescencia cuando los oocitos no inyectados (controles) se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios y secundarios. Como ejemplo representativo de ello, en la figura 12D se muestra un oocito control tratado con los anticuerpos utilizados para la detección de Oatp1a1. Se obtuvieron resultados similares para OATP1B1 y OATP1B3 (datos no mostrados).

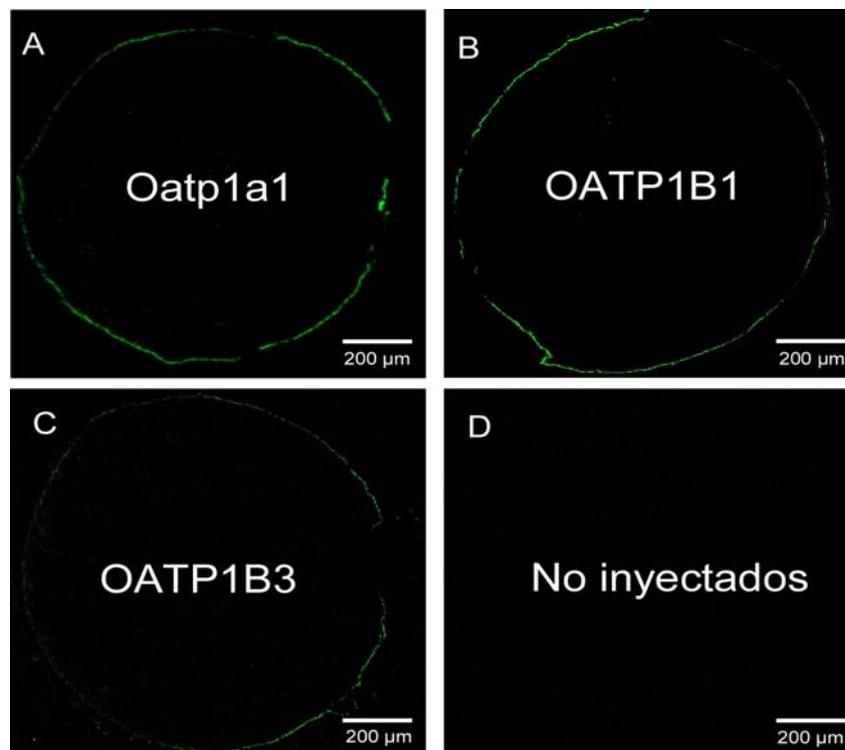


Figura 12. Imágenes de inmunofluorescencia que muestran la localización de Oatp1a1 (A), OATP1B1 (B) y OATP1B3 (C) en cortes de oocitos silvestres (D) o inyectados con 9 ng del ARNm correspondiente 48 horas antes de la detección de las proteínas mediante anticuerpos específicos.

A continuación, se determinó la sensibilidad de la membrana plasmática de oocitos de *Xenopus laevis* a los cambios en el pH extracelular (pHe). Para ello, utilizamos dos compuestos neutros de un peso molecular diferente, inulina y manitol, con una baja capacidad de difundir a través de la membrana plasmática. La acumulación de dichos compuestos a pHe 7,5 fue muy baja, pero se incrementó hasta 9 veces cuando las células se trataban con el detergente Triton X-100, valor que se consideró como 100% en los experimentos (figura 13). Al acidificar el pHe hasta 4,5 se observaron diferencias mínimas en la acumulación de inulina y manitol. Sin embargo, a un pHe de 3,5, probablemente más tóxico, tuvo lugar un marcado incremento en la captación de ambos.

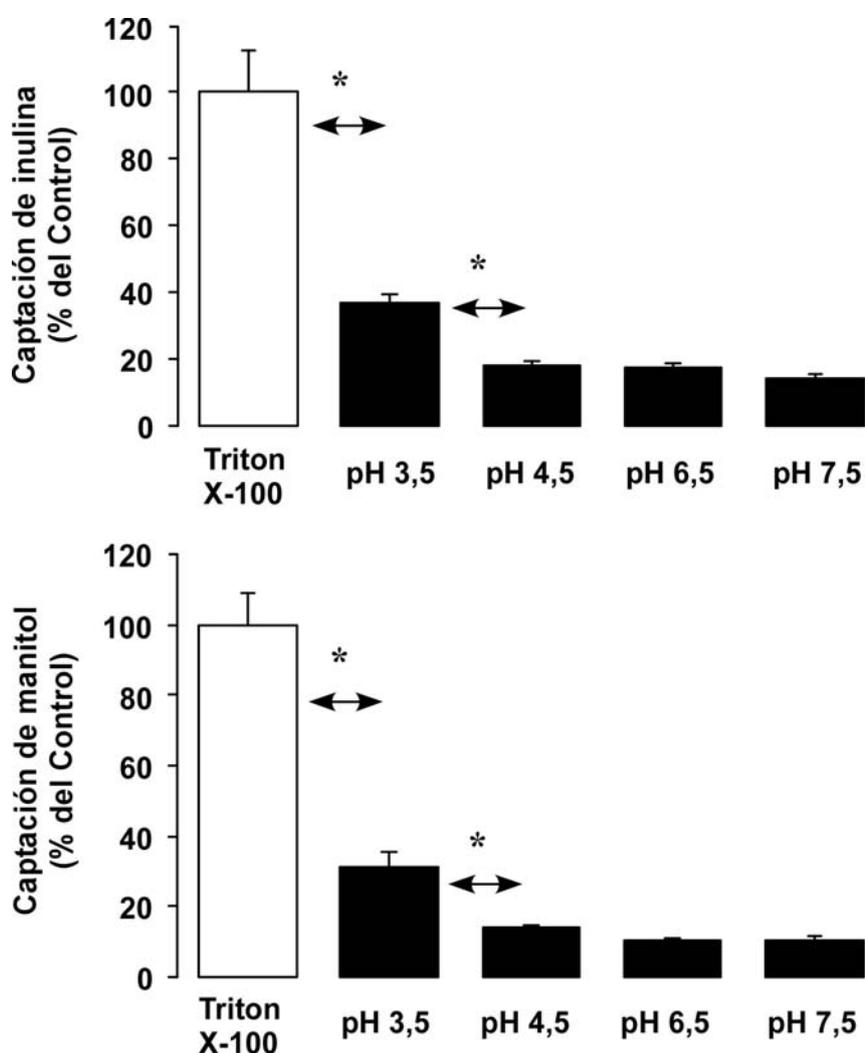


Figura 13. Efecto del pH extracelular sobre la integridad de la membrana plasmática de oocitos. Los oocitos sin inyectar se incubaron en medio de captación al pH indicado que contenía inulina o manitol a 25°C durante 1 h. Los valores se expresan como % de sustrato radioactivo acumulado en los oocitos incubados en medio que contenía además 0,05% de Triton X-100 a pH 7,5 (Control) y representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto, utilizando oocitos de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Un efecto similar, aunque menos marcado, se observó para la captación inespecífica de ATC y 17 β GE en oocitos no inyectados (figura 14).

Estos resultados indican que los cambios en la captación mediada por los diferentes transportadores no pueden ser atribuidos a modificaciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, al menos cuando se trabaja con valores de pHe iguales o mayores de 4,5.

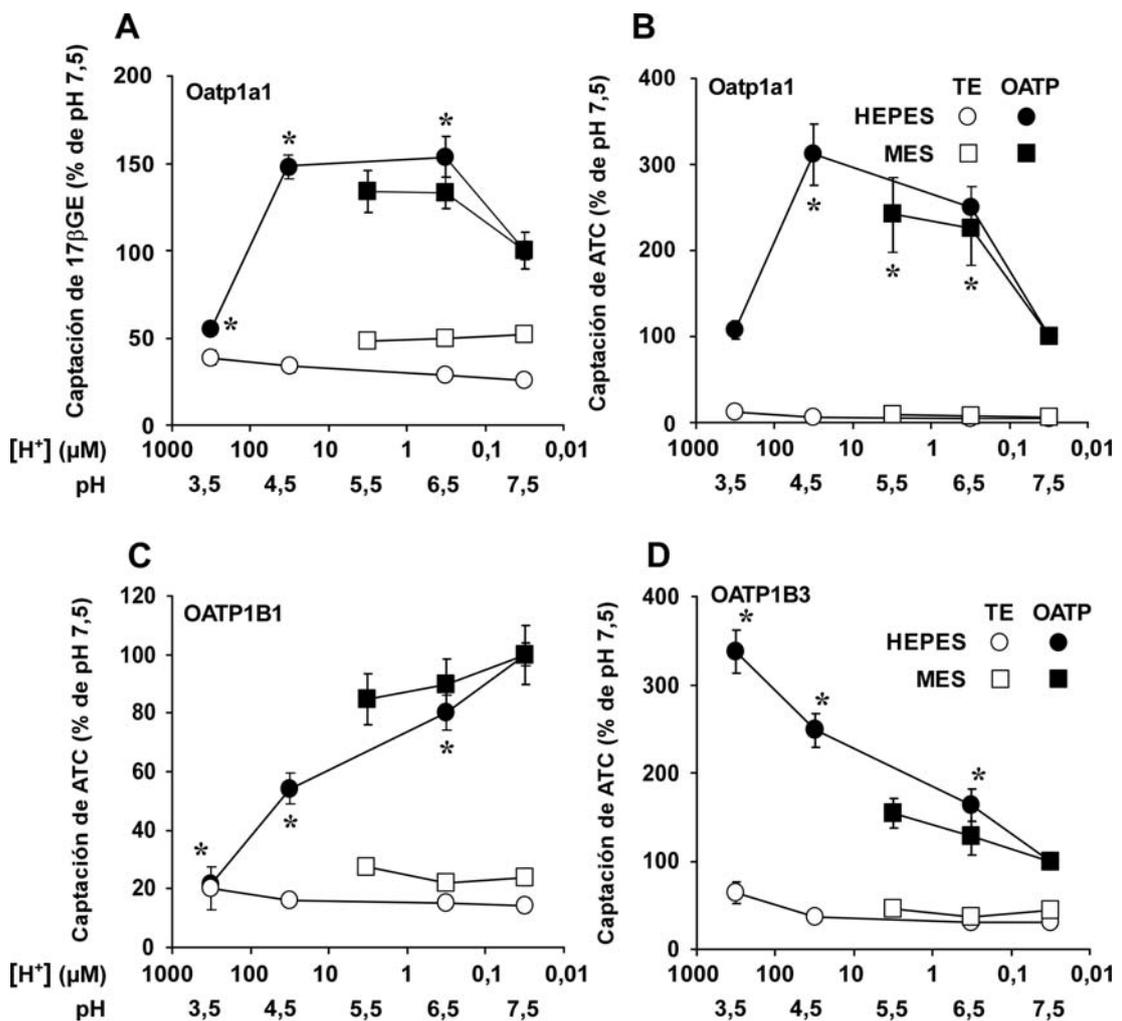


Figura 14. Captación de ácido taurocólico (ATC) y 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) por oocitos que expresaban Oatp/OATPs. Los oocitos no inyectados (TE) o que expresaban Oatp1a1 (A, B), OATP1B1 (C) y OATP1B3 (D) se incubaron durante 1 h a 25°C en medio de captación con 10 mM HEPES ó 50 mM MES al pH indicado y que contenía 10 μ M de ATC ó 10 μ M de 17 β GE. Los valores se expresan como porcentaje de la captación de los oocitos incubados en medio con HEPES o MES a pH 7,5 y representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto, utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

4.2.2. Papel del pH en la captación de ácido taucólico y 17β-glucurónido de estradiol mediada por Oatp1a1, OATP1B1 y OATP1B3

Cuando los oocitos que expresaban Oatp1a1 se incubaron en presencia de ATC a un pHe de 6,5 se apreció una marcada estimulación en la captación de ATC en comparación con la determinada a un pHe de 7,5 (figura 14B). Se observó una tendencia muy similar cuando se utilizó 17βGE como sustrato, una molécula con un valor de pKa 1,5 puntos superior al del ATC. En ambos casos, a un pHe de 3,5 la captación mediada por Oatp1a1 apenas fue distinguible de la de los oocitos silvestres. Para OATP1B1, sin embargo, el patrón de respuesta al pHe fue completamente diferente. La captación neta de ATC (figura 14C) y 17βGE (datos no mostrados) disminuyó progresivamente a medida que el pHe que se imponía era más ácido en todo el rango de pHe estudiado. En el caso de OATP1B3 se observó el efecto contrario, ya que la captación de ATC se estimuló a medida que el pHe era más ácido (figura 14D).

Para investigar aún más en profundidad el efecto del pHe sobre el transporte de ATC mediado por Oatps/OATPs, elegimos otro modelo experimental: células CHO establemente transfectadas con Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3. En los experimentos se utilizaron únicamente valores de pHe de 7,5 y de 6,5 (tabla 4), ya que valores por debajo de 6,5 producían alteraciones en el tamaño y complejidad de las células, según se comprobó en experimentos de citometría de flujo (datos no mostrados).

Tabla 4. Efecto del pH extracelular sobre la captación neta de ácido taucólico (ATC), expresada como pmol/15 min/mg proteína, mediada células CHO transfectadas con Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3.

	Oatp1a1	OATP1B1	OATP1B3
pH 7,5	11 ± 2	38 ± 4	35 ± 3
pH 6,5	22 ± 2 ^a	28 ± 5 ^a	55 ± 7 ^a

Las células que expresaban Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3 se incubaron en medio de captación al pH indicado que contenía 10 μM ATC a 37°C durante durante 15 min. La captación neta se determinó restando la captación inespecífica por las células silvestres (CHO-K1) a la captación mediada por las células transfectadas. Los valores representan la media ± EEM de al menos 9 determinaciones por punto, procedentes de 3 cultivos diferentes. ^a, p<0,05 comparado con la captación a pH 7,5 por el test de *t* de Student para valores apareados.

En cualquier caso, y al igual que habíamos visto en el modelo experimental de oocitos, la acidificación del pHe desde 7,5 hasta 6,5 estimuló marcadamente la captación de ATC mediada por Oatp1a1 y OATP1B3, mientras que se observó el efecto contrario en las células establemente transfectadas con OATP1B1 (tabla 4).

Estos resultados sugieren que los cambios en el pHe pueden afectar marcadamente a la capacidad transportadora de OATP1B1 y OATP1B3, lo que sucede a valores de pHe cercanos a los que se dan en tejido sano normal o en determinados territorios en situaciones patológicas. Estos valores de pHe estarían, en cualquier caso, alejados de aquellos capaces de alterar las características físicas de la membrana plasmática (lo que parece ocurrir por debajo de un pHe de 4,5 en el modelo de oocitos). Para valores de pHe por encima de 4,5, el patrón de respuesta a cambios en el pHe fue específico para cada transportador, aunque fueron similares cuando, en cada caso, se utilizaron dos sustratos diferentes como el ATC y 17 β GE. Esta respuesta es coherente con la existencia de dominios de protonación dependientes del pH en estas proteínas (Leuthold et al., 2009), lo que podría afectar a la actividad transportadora. Los resultados obtenidos coinciden, al menos en parte, con estudios previos en los que se demostró que la captación de ciertos compuestos como la prostaglandina E₂ y L-tiroxina por OATP1B3 en oocitos fue mayor a pHe 6,5 que a pHe 8. Por el contrario, el transporte mediado por OATP1B1 no se vio afectado por esta acidificación del pHe (Leuthold et al., 2009).

4.2.3. Papel del gradiente de protones y del potencial de membrana en el mecanismo de transporte de Oatps/OATPs

A continuación se decidió investigar si, además de los hipotéticos cambios conformacionales en la proteína inducidos por el pH (Leuthold et al., 2009), la actividad de estos transportadores podría estar determinada, al menos en parte, por cambios en la magnitud y dirección del gradiente transmembrana de protones. Antes de analizar los resultados hay que tener en cuenta que, aunque hemos decidido arbitrariamente usar el término gradiente de protones, no es posible distinguir entre un gradiente de protones y un gradiente invertido de OH⁻. Para dilucidar si los cambios en la actividad transportadora podrían estar relacionados con el gradiente de protones transmembrana se llevaron a cabo experimentos de captación en oocitos de *Xenopus laevis* en presencia de un protonóforo, CCCP, y de un ionóforo de iones potasio, valinomicina, que hiperpolariza la membrana

plasmática. A todos los valores de pHe ensayados a tiempos de incubación de una hora, el CCCP indujo una marcada inhibición en la captación de ATC por Oatp1a1 (figura 15A). Esta caída en la actividad de Oatp1a1, probablemente, fue debida más a cambios en el flujo de protones que a un proceso dependiente de voltaje, ya que, la valinomicina, un ionóforo selectivo de potasio que hiperpolariza la membrana plasmática, no tuvo efecto sobre la captación de ATC por este transportador.

El OATP1B1 comparte ciertas características funcionales que han sido previamente descritas para Oatp1a1 (Hagenbuch and Meier, 2003), pero con algunas peculiaridades. Así, al contrario que Oatp1a1, la actividad de OATP1B1 se redujo a medida que el pHe se volvía más ácido. Este hecho tendría, al menos, dos posibles explicaciones: i) el incremento en la concentración extracelular de H^+ y, por tanto, del gradiente de protones transmembrana, no tiene un efecto activador directo sobre OATP1B1; ii) la captación de H^+ (o el eflujo de OH^-) por OATP1B1 activa el transportador, pero este efecto queda enmascarado por la existencia de un efecto inhibitorio opuesto debido a cambios estructurales en la proteína inducidos por la acidificación extracelular. Los experimentos con CCCP ayudaron a resolver esta cuestión, ya que este protonóforo produjo una inhibición del transporte mediado por OATP1B1, lo que confirmó que este transportador es sensible a una reducción en el gradiente de protones transmembrana. Además, la valinomicina, aunque ligeramente, también inhibió el transporte mediado por OATP1B1, lo que sugiere que OATP1B1 es sensible a cambios en el $\Delta\psi$ (figura 15B).

Las respuestas del transportador OATP1B3 a estas maniobras fueron, en algunos casos, similares a las registradas para Oatp1a1 y en otros casos similares a las determinadas para OATP1B1. A pesar de la marcada activación del transporte mediado por OATP1B3 cuando el pHe se acidificaba, la presencia de un protonóforo no tuvo efecto significativo (figura 15C). Esto sugiere que el flujo de protones a través de la membrana juega un papel menor en la activación de OATP1B3 por el pHe. Sin embargo, probablemente debido a cambios conformacionales (Leuthold et al., 2009), este transportador es muy sensible a un ambiente ácido, lo que puede explicar ciertos resultados controvertidos respecto a la activación de OATP1B3 por glutatión que hemos mostrado en el apartado 4.1 (Briz et al., 2006). Por otra parte, OATP1B3 resultó ser la isoforma más afectada por la presencia de valinomicina (figura 15C), lo que indica que este transportador es muy sensible a cambios en el $\Delta\psi$.

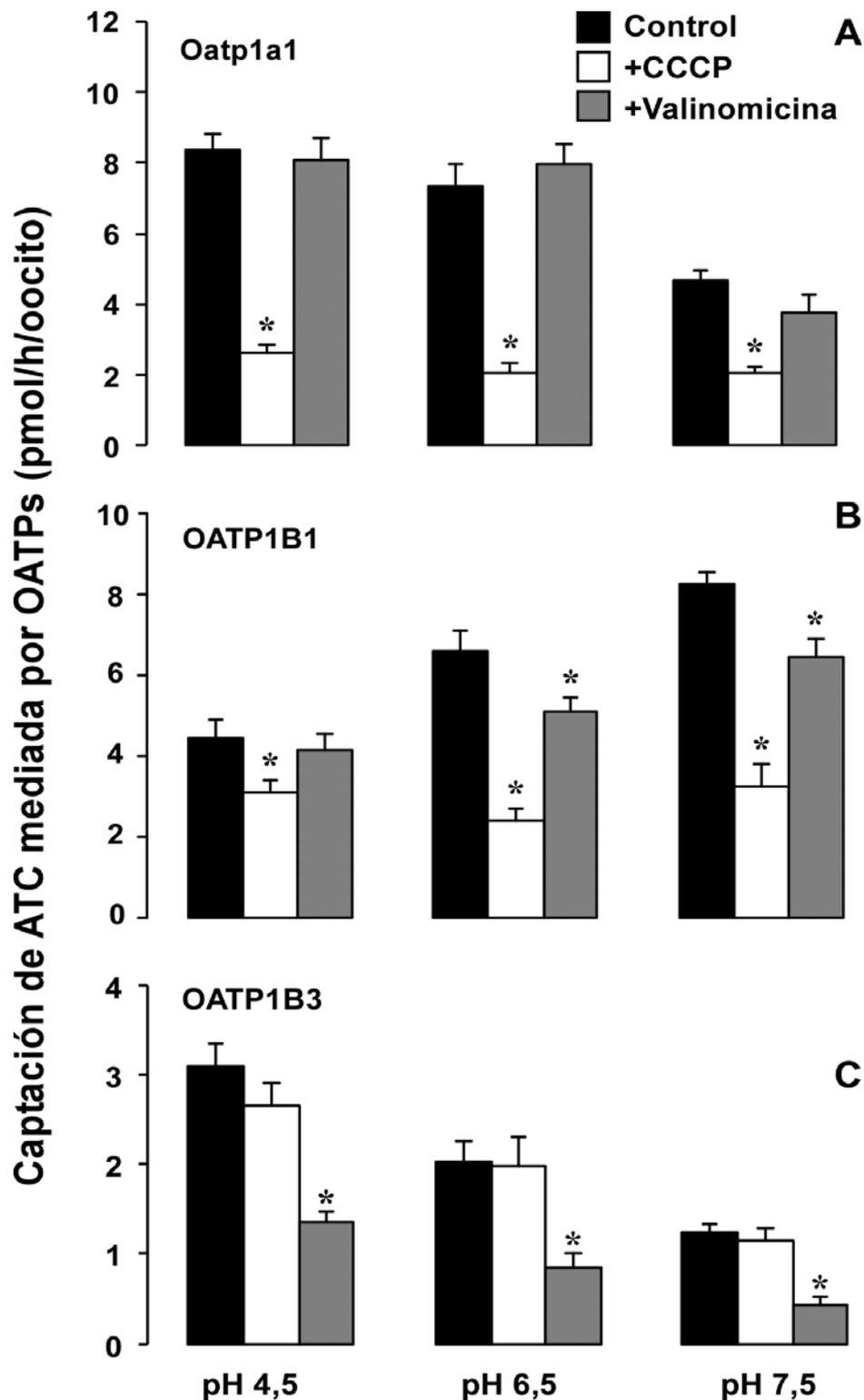


Figura 15. Captación de ácido taucólico (ATC) por oocitos que expresaban Oatp1a1 (A), OATP1B1 (B) u OATP1B3 (C). Los oocitos se incubaron en medio de captación con 10 μ M de ATC, solo (control) o en presencia de 50 μ M de CCCP ó 10 μ M de valinomicina a 25°C durante 1 h. La captación neta se determinó restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación en oocitos que expresaban OATPs. Los valores de captación neta representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto, utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de ATC por el control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

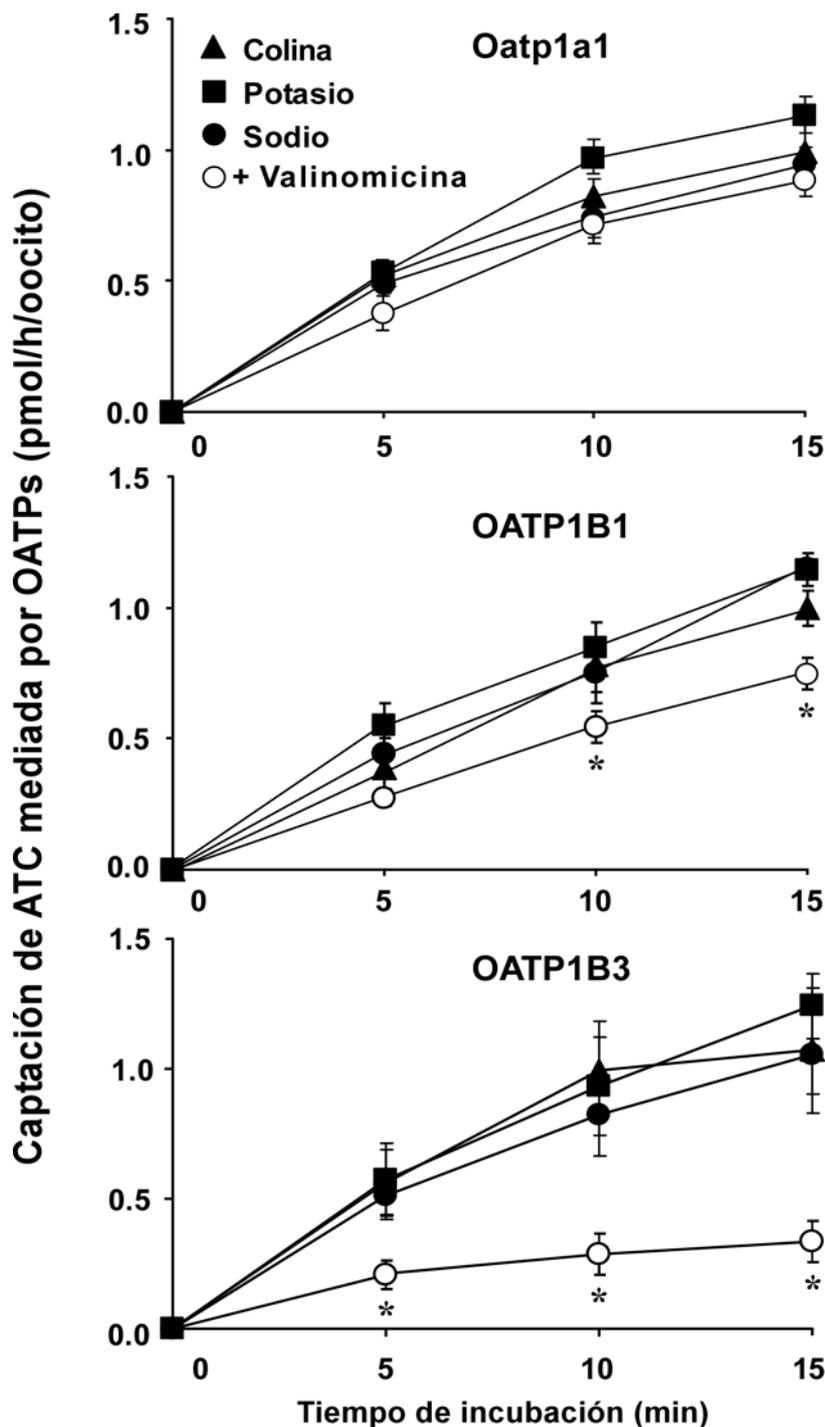


Figura 16. Captación de ácido taurocólico (ATC) por oocitos que expresaban Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3. Los oocitos se incubaron en diferentes medios de captación: medio de colina, de sodio (cloruro de sodio en lugar de colina) con o sin (control) valinomicina 10 μ M o medio de potasio (cloruro de potasio en lugar de colina). Se determinó la captación tras la incubación a 25°C de los oocitos durante 5, 10 y 15 minutos en cada uno de estos medios que contenían además 10 μ M ATC. Para determinar la captación neta se restó la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación mediada por Oatp/OATPs. Los valores de captación neta representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de ATC por el grupo control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Debido a que un periodo de incubación de una hora podría afectar no sólo al gradiente de protones sino también al pH intracelular (pHi) se llevaron a cabo experimentos con tiempos de incubación más cortos (5, 10 y 15 minutos). En estos estudios obtuvimos resultados similares a los anteriores. La valinomicina no tuvo efecto sobre Oatp1a1 (figura 16A), indujo una inhibición moderada sobre OATP1B1 (figura 16B) y produjo una marcada inhibición sobre la captación de ATC mediada por OATP1B3 (figura 16C). Además la sustitución de colina por sodio o potasio en el medio de incubación no tuvo un efecto significativo sobre la captación de ATC mediada por Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3.

4.2.4. Estudios de electrofisiología en oocitos de *Xenopus laevis*

Mientras que se ha propuesto que el Oatp1a1 funcionaría como un transportador electroneutro (Li et al., 1998a; Satlin et al., 1997), no se ha demostrado aún la existencia de un mecanismo de transporte electroneutro o electrogénico en la captación mediada por OATP1B1 u OATP1B3. El hecho de que éstos fueran sensibles a la valinomicina, aunque indirectamente, apuntaba a que estos transportadores podrían ser electrogénicos. Para confirmar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos de electrofisiología utilizando el método de fijación de voltaje en oocitos mediante dos electrodos. En estos estudios se utilizó el transportador NTCP como control positivo de transportador electrogénico (Weinman, 1997), mientras que los oocitos no inyectados sirvieron como blancos (figura 17).

Los oocitos que expresaban NTCP se perfundieron con una solución de sodio y se registró de forma continua la corriente generada (línea de base). La presencia de 100 μM ATC en el medio de perfusión indujo una entrada neta de carga positiva de, aproximadamente, ~ 75 nA, que se refleja como una bajada en el registro de corriente, ya que el sistema inyecta menos cargas positivas para mantener el $\Delta\psi$ constante a -50 mV. Este hecho coincide con el mecanismo de transporte aceptado para NTCP, en el que la captación de una molécula de AB (anión) se acompaña de la de dos iones sodio, con lo que el balance es una entrada neta de carga positiva. El oocito fue entonces lavado con la solución de sodio y se recuperó casi por completo la línea de base. Por el contrario, no se observó efecto alguno cuando los oocitos que expresaban Oatp1a1 se perfundieron con un medio que contenía 100 μM ATC (figura 17), lo que apoya el concepto de que Oatp1a1 es electroneutro.

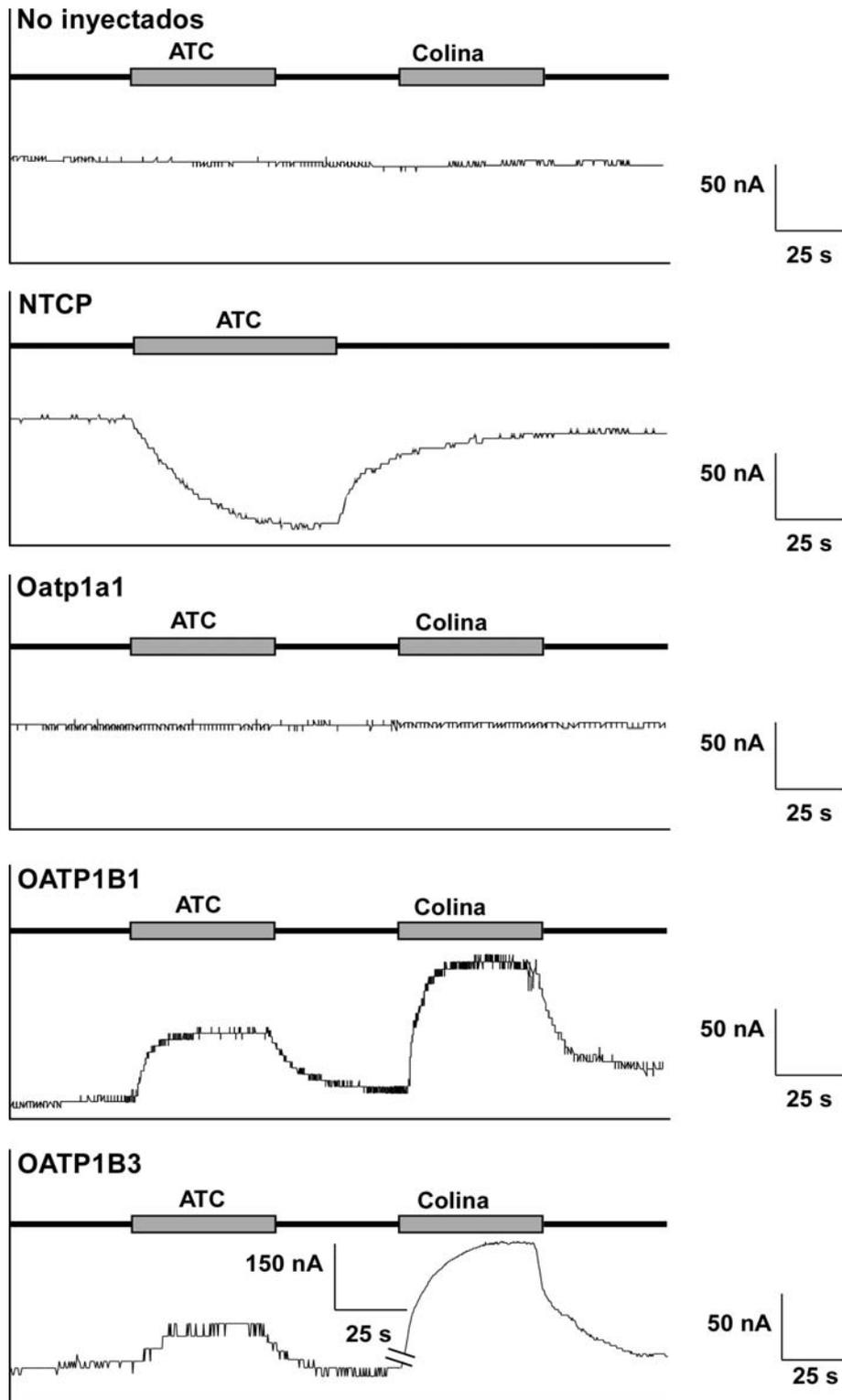


Figura 17. Experimentos de electrofisiología en oocitos. Los oocitos inyectados o no (control negativo) con ARNm de Oatp1a1, OATP1B1, OATP1B3 o NTCP humano (control positivo) se perfundieron con un medio con Na^+ de pH 7,5 y se monitorizó la corriente generada de manera continua (línea de base), tras la adición de $100 \mu\text{M}$ de ácido taurocólico (ATC). Los oocitos se lavaron con un medio con sodio y posteriormente ese medio se sustituyó por otro con colina de pH 7,5. Los experimentos se repitieron con 12 oocitos procedentes de tres ranas diferentes.

Tanto en los oocitos que expresaban OATP1B1 como en los que expresaban OATP1B3, la presencia de 100 μ M ATC indujo una entrada neta de carga negativa, que se refleja como una subida en el registro de corriente, de diferente magnitud, 65 nA para OATP1B1 y 25 nA para OATP1B3 (figura 17). Esto sugiere que la captación de ATC mediada por ambos transportadores se acompaña de una entrada de aniones (o eflujo de cationes). La explicación más sencilla para estos resultados es que la entrada de una corriente negativa es debida al transporte del sustrato aniónico a través de la proteína, por lo que ambos transportadores se comportarían como transportadores electrogénicos que facilitan la entrada de aniones orgánicos. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que funcionen como intercambiadores con una estequiometría diferente de 1:1.

Por otra parte, la sustitución del sodio por colina en el medio de perfusión no tuvo efecto alguno sobre los oocitos no inyectados o que expresaban Oatp1a1 (figura 17). Sin embargo, esta maniobra se reflejó como un pico en el registro de corriente tanto para OATP1B1 como para OATP1B3, siendo la magnitud de la subida mayor en el caso de este último. Estos resultados sugieren que en presencia de sodio, pero no de ATC, existe una salida de sodio a través del transportador, que se elimina cuando este catión se sustituye por colina en el medio de perfusión.

4.2.5. Captación de un derivado fluorescente de ácidos biliares (CGamF) en células CHO transfectadas determinada mediante citometría de flujo

El siguiente paso fue confirmar algunos datos obtenidos con el modelo experimental de oocitos utilizando células transfectadas con los diferentes OATPs. Elegimos como sustrato un AB fluorescente sintetizado en nuestro laboratorio, CGamF, cuya captación celular se puede determinar mediante citometría de flujo. En primer lugar pusimos a punto las condiciones experimentales para detectar la fluorescencia de la CGamF. En la figura 18 se muestran histogramas de frecuencia representativos de la fluorescencia en el canal FL1 del citómetro en células CHO establemente transfectadas con Oatp1a1. La fluorescencia fue muy baja cuando las células no se incubaron con compuesto fluorescente alguno (figura 18A). Algunas células se cargaron con FITC para tener un valor de referencia de fluorescencia máxima (figura 18B). Cuando el sustrato utilizado fue CGamF se obtuvo una señal intermedia (figura 18C).

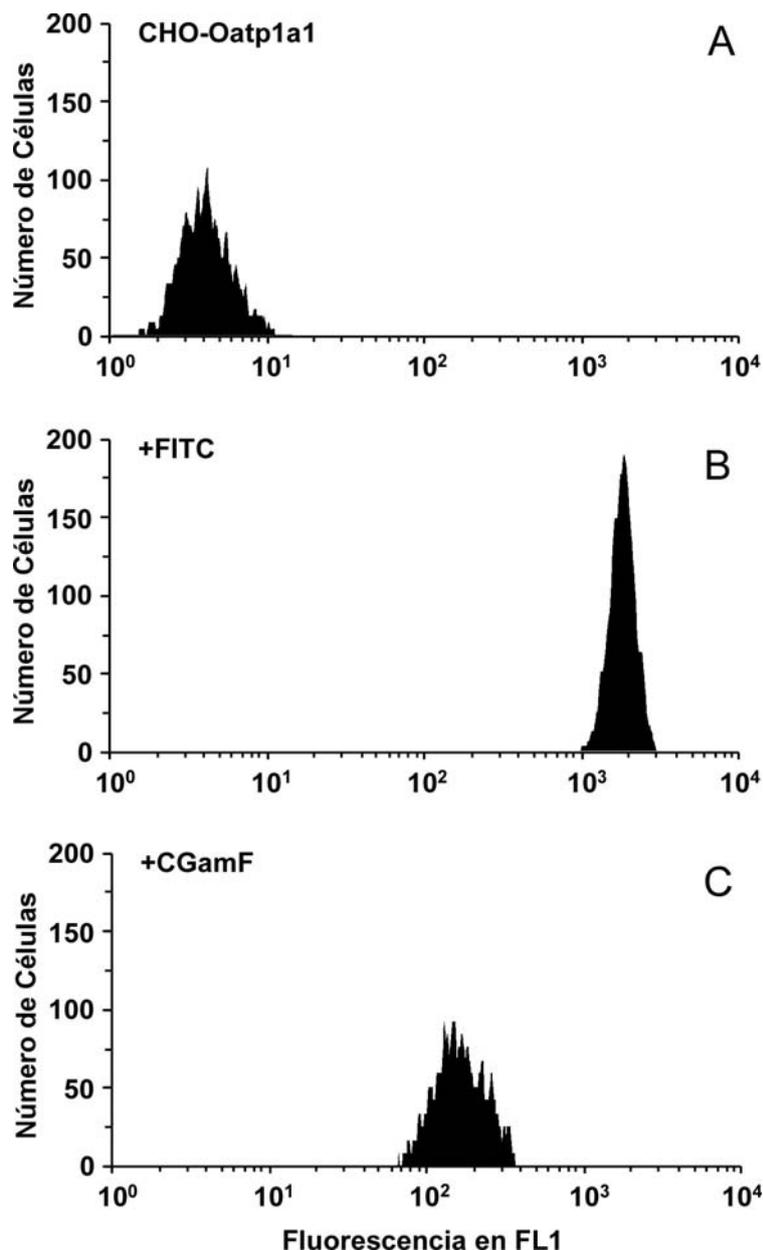


Figura 18. Histogramas de frecuencia representativos de la fluorescencia en FL1. Las células CHO establemente transfectadas con Oatp1a1 se incubaron en medio de captación solo (A) o suplementado con 10 μ M de FITC (B) o CGamF (C) durante 15 min a 37°C.

En la figura 19 se representa la evolución temporal de la captación de CGamF por células CHO que expresaban los diferentes OATPs. Las células transfectadas captaron mayor cantidad del AB fluorescente que las células silvestres durante todo el periodo experimental (figura 19). La diferencia fue estadísticamente significativa a partir de los 10 min de incubación. La captación de CGamF por OATP1B3 fue mucho mayor que por OATP1B1 y Oatp1a1. Para ilustrar esta observación, las células se incubaron en presencia del sustrato fluorescente y se tomaron fotos en el microscopio de fluorescencia (figura 19).

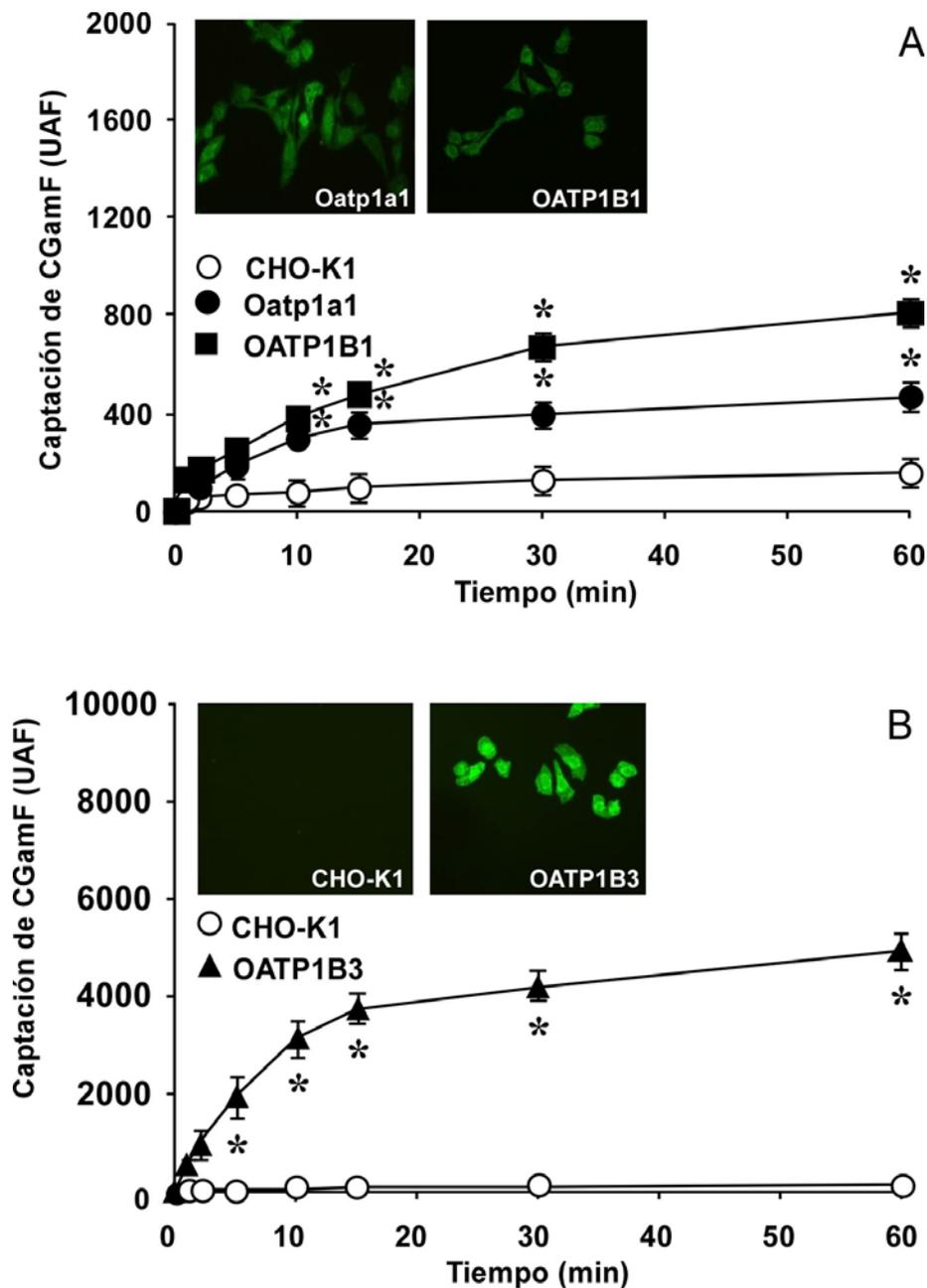


Figura 19. Captación en función del tiempo de coliglicamido fluoresceína (CGamF) por células CHO silvestres (A) o establemente transfectadas con Oatp1a1 (A), OATP1B1 (A) u OATP1B3 (B). Las células se incubaron en medio de captación que contenía 1 μ M CGamF (para OATP1B3) ó 5 μ M (para Oatp1a1 y OATP1B1) durante 15 min a 37°C. Los valores de captación representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto de tres cultivos diferentes. Las fotos de fluorescencia muestran células representativas de cada grupo. $p < 0,05$ comparado con la captación por las células silvestres por el test de t de Student para valores apareados.

Basándonos en los resultados de estos experimentos y en estudios previos de captación de ABs en células CHO (Marin et al., 2003), elegimos un tiempo de incubación de 15 minutos para llevar a cabo los siguientes estudios.

Debido a que el pH afecta al espectro de fluorescencia de CGamF (datos no mostrados), no pudimos estudiar el efecto de un amplio rango de pH sobre la captación mediada por Oatp/OATPs. Sin embargo, fue posible manipular de forma moderada el pHi y determinar el efecto sobre la captación de CGamF.

Se puso a punto un método para determinar el pHi por citometría de flujo, utilizando la sonda SNARF-4F. Esta molécula en su forma esterificada no es fluorescente, pero difunde libremente hacia el interior celular, donde es hidrolizada por esterasas, generando una molécula que emite más fluorescencia a medida que el pH se vuelve más básico. Esta propiedad nos permitió determinar cambios en el pHi. Se llevaron a cabo experimentos para elegir una concentración de SNARF-4F éster óptima para determinar variaciones en el pHi (figura 20).

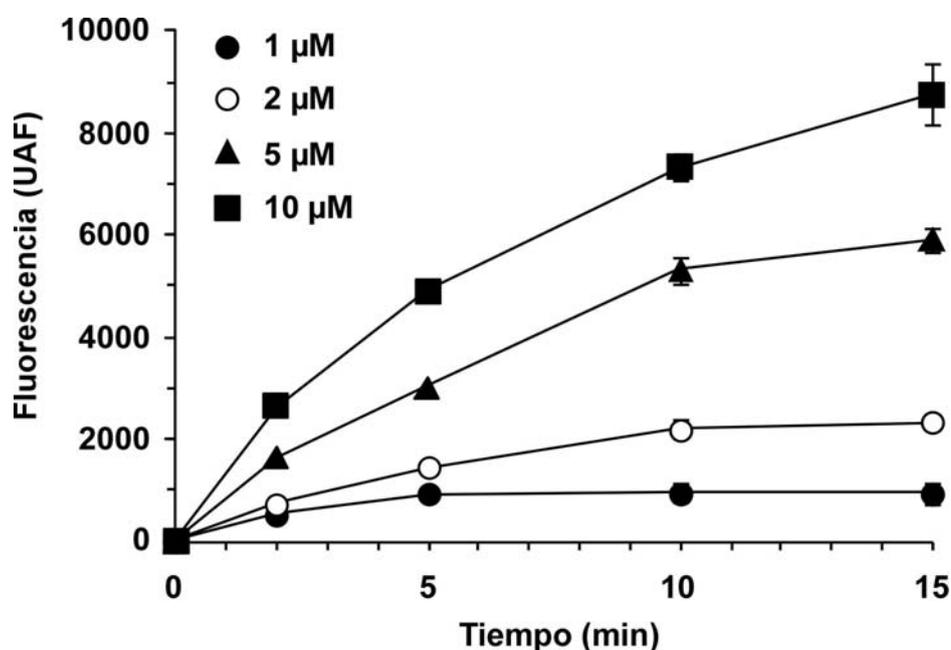


Figura 20. Captación en función del tiempo de SNARF-4F éster por células CHO que expresaban Oatp1a1. Las células se incubaron a 37°C en medio de captación que contenía 1, 2, 5 ó 10 µM de SNARF-4F éster. Los valores de captación determinada en el canal FL4 del citómetro representan la fluorescencia media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, de tres cultivos diferentes.

Cuando se utilizaron concentraciones de 1 y 2 µM de SNARF-4F la fluorescencia se estabilizó a partir de 10 min de incubación. Como la captación de CGamF se iba a determinar tras un tiempo de incubación de 15 minutos, estas concentraciones de SNARF-4F éster eran válidas para determinar variaciones en el pHi. Elegimos una concentración de 2 µM para posteriores experimentos, porque nos daba un margen mayor para determinar variaciones en el pHi.

Por otra parte, se puso a punto un método para determinar cambios del potencial de membrana ($\Delta\psi$) por citometría de flujo, utilizando la sonda fluorescente DiIC₁(5). Este derivado de cianina es una molécula catiónica fluorescente que difunde libremente a través de la membrana plasmática de la célula en función del potencial de membrana. Mediante la determinación de la acumulación de DiIC₁(5) en el canal FL4 del citómetro se estudiaron los cambios que tienen lugar en el $\Delta\psi$ de las células CHO.

Llevamos a cabo un estudio de la captación de varias concentraciones de DiIC₁(5) a diferentes tiempos de incubación, con objeto de determinar la concentración óptima del compuesto para medir cambios en el potencial de membrana. Tal y como se aprecia en la figura 21, una concentración de 2 nM de DiIC₁(5) dio, a los 15 minutos de incubación, una señal cuantitativamente importante y, al igual que en el caso de SNARF-4F, estable.

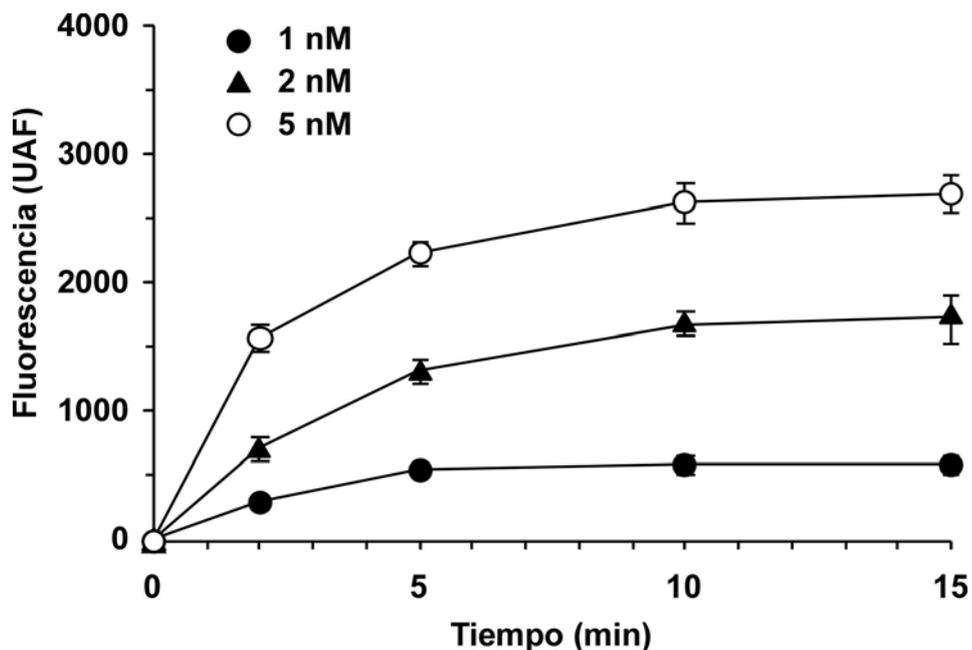


Figura 21. Captación en función del tiempo de DiIC₁(5) por células CHO establemente transfectadas con Oatp1a1. Las células se incubaron en medio de captación que contenía 1, 2 ó 5 nM de DiIC₁(5). Los valores de captación representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, de tres cultivos diferentes.

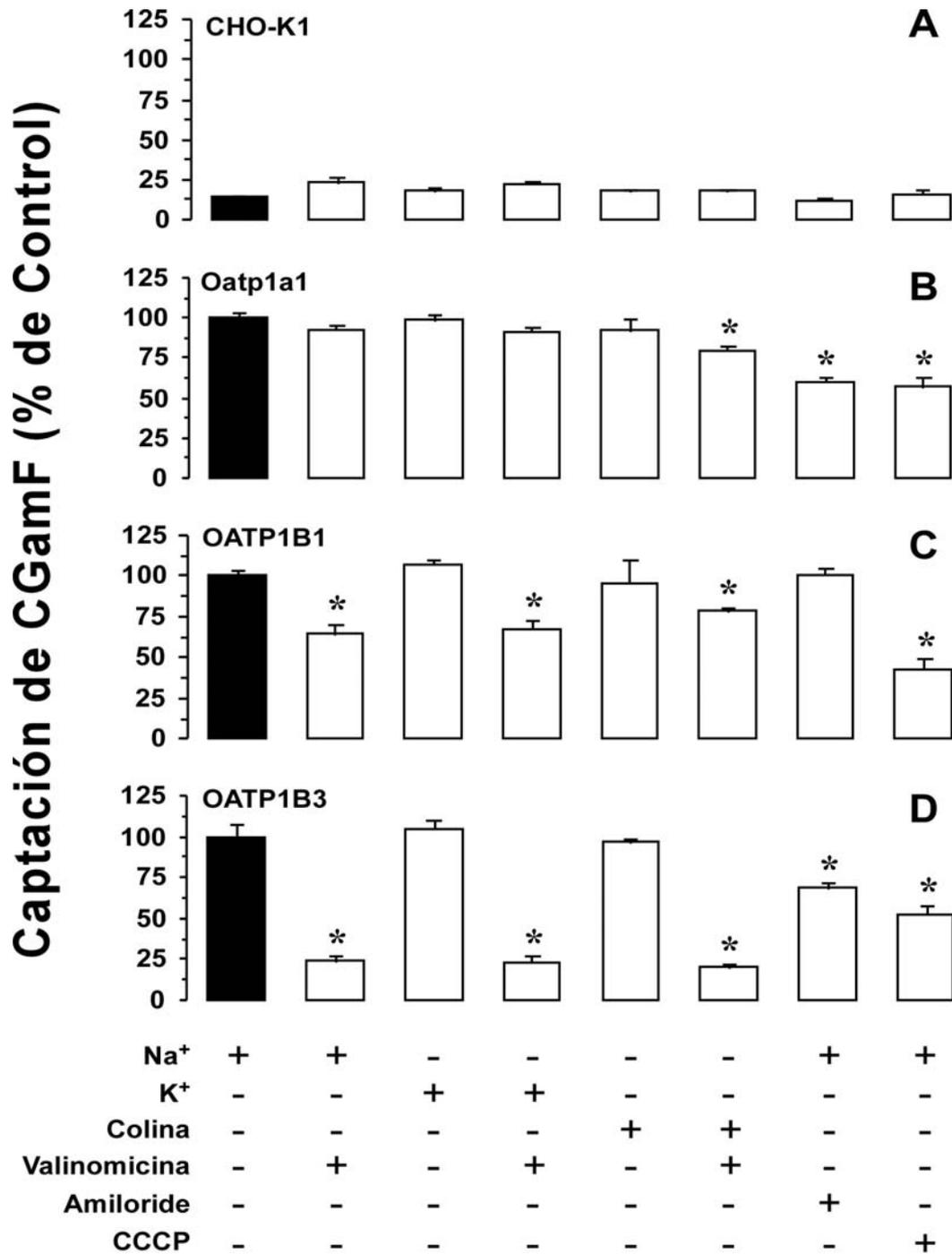


Figura 22. Captación de colilglicilamido fluoresceína (CGamF) por células CHO silvestres (CHO-K1) o establemente transfectadas con Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3. Las células se incubaron en diferentes medios de captación: medio con sodio solo (control) o suplementado con 10 μ M valinomicina, 1 mM amiloride, ó 50 μ M CCCP; medio de potasio (cloruro de potasio en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina; medio de colina (cloruro de colina en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina. La captación se determinó tras la incubación de las células, a 37°C durante 15 min, en cada uno de estos medios suplementados además con CGamF 1 μ M para OATP1B3 ó 5 μ M para Oatp1a1 y OATP1B1. Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia en las células cuando se incubaron en medio de sodio solo y representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, procedentes de 3 cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con el grupo control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

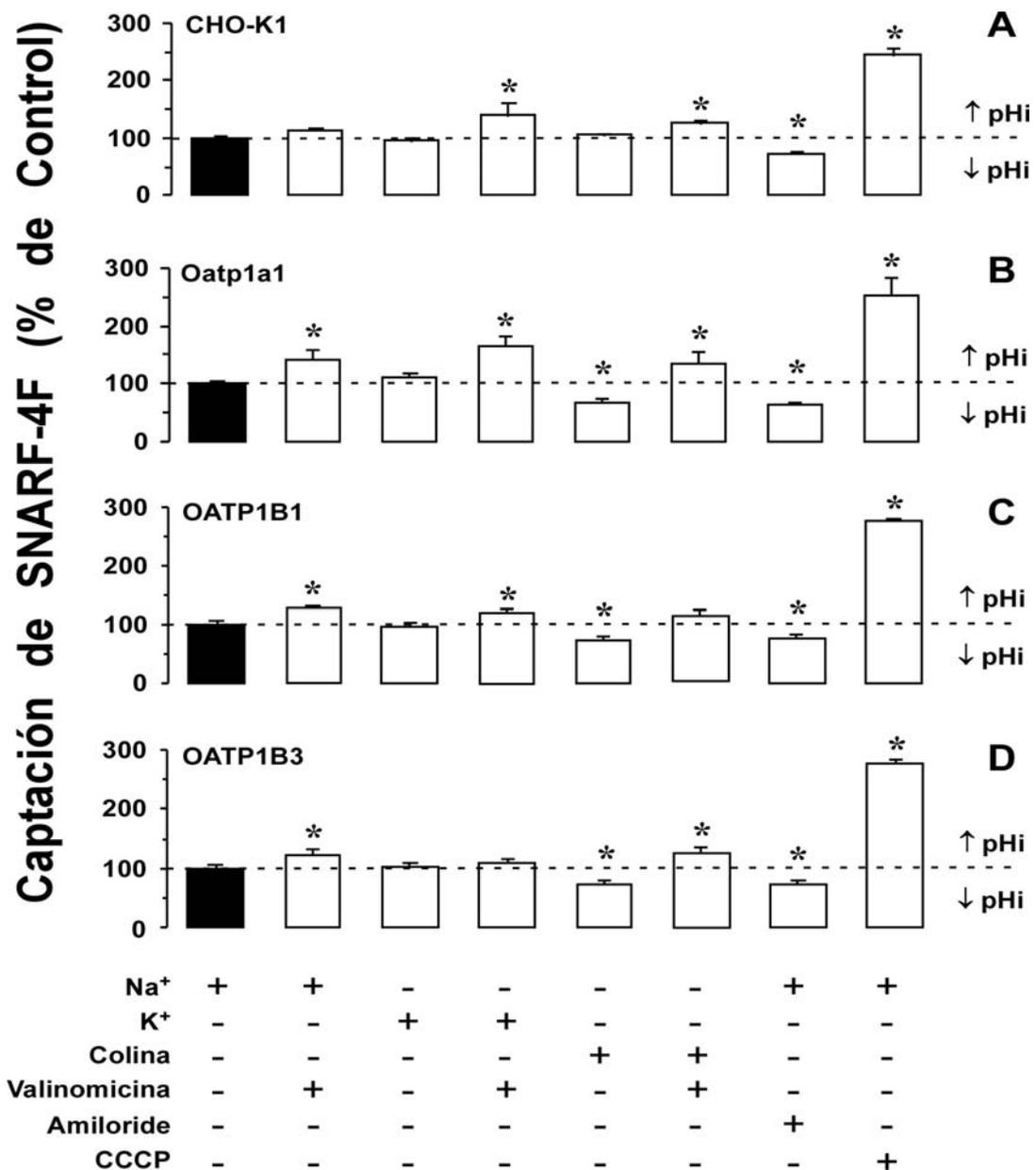


Figura 23. Captación de SNARF-4F por células CHO silvestres (CHO-K1) o establemente transfectadas con Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3. Las células se incubaron en diferentes medios de captación: medio con sodio solo (control) o suplementado con 10 μ M valinomicina, 1 mM amiloride, ó 50 μ M CCCP; medio de potasio (cloruro de potasio en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina; medio de colina (cloruro de colina en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina. La captación se determinó tras la incubación de las células, a 37°C durante 15 min, en cada uno de estos medios suplementados además con 2 μ M de SNARF-4F éster. Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia acumulada en las células cuando se incubaron en medio de sodio solo y representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, procedentes de 3 cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de SNARF-4F por el grupo control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

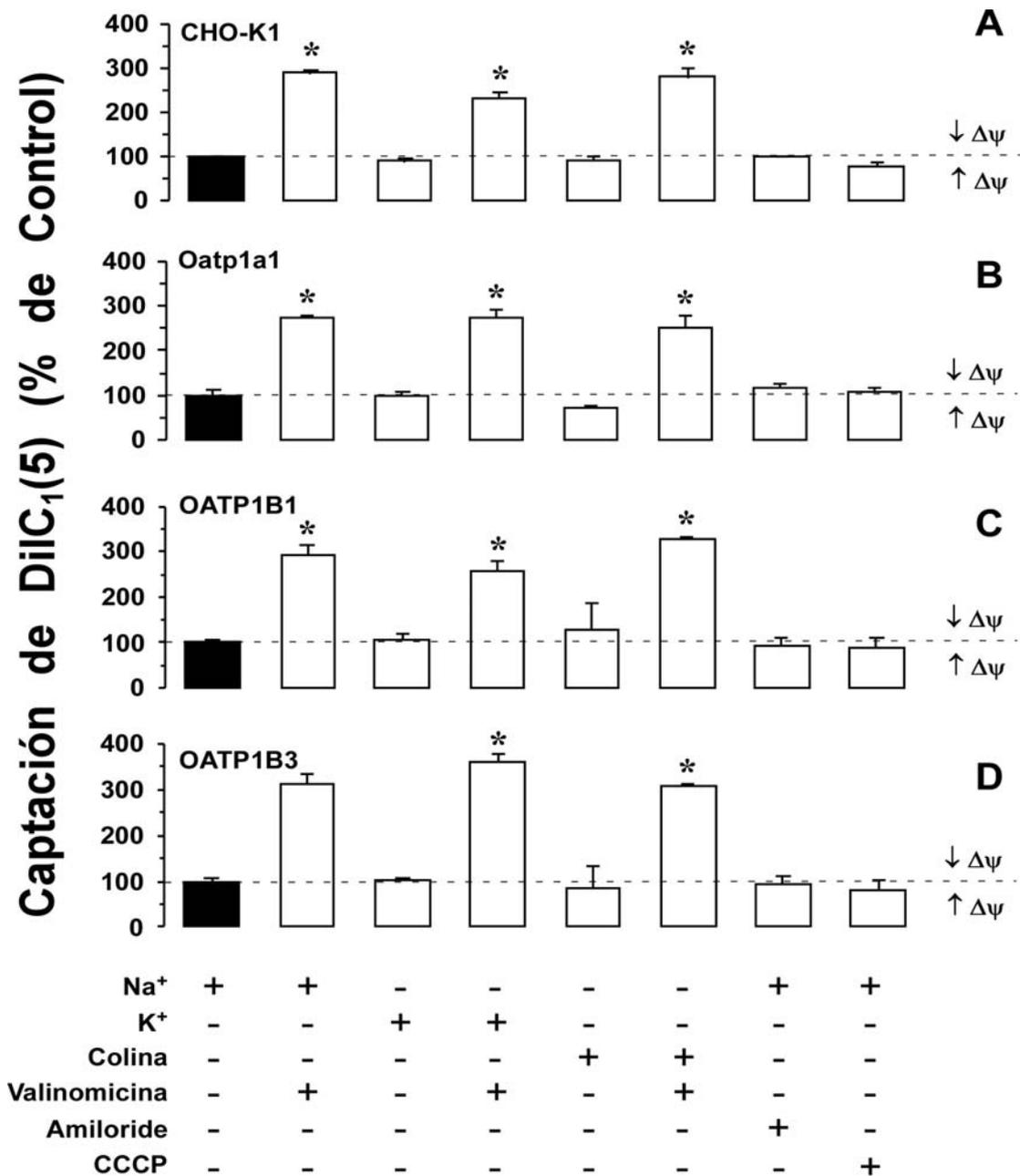


Figura 24. Captación de DiIC₁(5) por células CHO silvestres (CHO-K1) o establemente transfectadas con Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3. Las células se incubaron en diferentes medios de captación: medio con sodio solo (control) o suplementado con 10 μ M valinomicina, 1 mM amiloride, ó 50 μ M CCCP; medio de potasio (cloruro de potasio en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina; medio de colina (cloruro de colina en lugar de sodio) solo o con 10 μ M valinomicina. La captación se determinó tras la incubación de las células, a 37°C durante 15 min, en cada uno de estos medios suplementados además con 2 nM de DiIC₁(5). Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia acumulada en las células cuando se incubaron en medio de sodio solo y representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, procedentes de 3 cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de DiIC₁(5) por el grupo control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Como se ha comentado previamente en los experimentos en los que utilizamos sustratos radioactivos en oocitos, la sustitución de colina por cloruro de sodio o potasio en el medio de incubación no ejerció ningún efecto sobre la captación de CGamF por células CHO que expresaban Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3 (figura 22). La presencia del protonóforo CCCP inhibió significativamente la captación de CGamF mediada por las células que expresaban Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3 (figura 22), y produjo una alcalinización intracelular (figura 23) sin cambios en el $\Delta\psi$ (figura 24).

Se usó amiloride para bloquear el intercambiador Na^+/H^+ e inducir así una acidificación intracelular, lo que se refleja en la figura 23 como un descenso en la señal de fluorescencia de SNARF-4F. Este compuesto no ejerció, sin embargo, efecto alguno sobre el $\Delta\psi$ (figura 24). La adición de amiloride al medio de incubación produjo una disminución en la captación de CGamF por las células que expresaban Oatp1a1 u OATP1B3, pero no tuvo ningún efecto sobre la captación mediada por OATP1B1 (figura 22).

La presencia de valinomicina causó un marcado incremento de la fluorescencia de DiIC₁(5), lo que, considerando la naturaleza catiónica de esta sonda, se interpretó como una hiperpolarización de la membrana plasmática (figura 24). Esta maniobra no produjo ningún efecto sobre el transporte de CGamF por Oatp1a1 (figura 22) pero inhibió el mediado por OATP1B1 (moderadamente) y por OATP1B3 (marcadamente) (figura 22).

Con respecto a la relevancia fisiológica de estos resultados, hay que decir que otros transportadores de aniones orgánicos, como el transportador de folato, PCFT (gen *SLC46A1*), que media la absorción intestinal de folato y el transporte de éste en las células, también depende de mecanismos electrogénicos y es altamente sensible al pHe, siendo la captación mayor a valores de pH comprendidos entre 4,5-5,5, mientras que a partir de un pH de 7,0 la captación es muy pobre (Unal et al., 2009). Esta propiedad se ha tenido en cuenta a la hora de vectorizar análogos antifolato, como el perimetrexed, dentro del entorno ácido de tumores sólidos (Zhao and Goldman, 2007).

Ya que OATP1B1 y OATP1B3 son capaces de transportar algunos fármacos citostáticos, como el irinotecán y el metotrexato, respectivamente (Abe et al., 2001;

Nozawa et al., 2005) se puede especular con que la activación/inhibición de estos transportadores a pH ácido puede influir en la captación de estos fármacos por las células tumorales.

4.2.6. Efecto del bicarbonato sobre el transporte mediado por OATPs/OATPs en oocitos de rana *Xenopus laevis*

Para dilucidar si el bicarbonato se encuentra o no involucrado en el transporte mediado por los tres transportadores estudiados, se añadió este compuesto al medio de incubación, con lo que el pH tuvo que ser reajustado a su valor original de 7,5. La presencia de bicarbonato inhibió la captación de ATC mediada por Oatp1a1 y OATP1B1 (tabla 5), efecto que se repitió, aunque de manera no significativa en la captación mediada por OATP1B3. Sin embargo, la sustitución de bicarbonato por acetato en el medio de incubación, no afectó la captación por ninguna de las isoformas estudiadas (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del bicarbonato sobre la captación neta de ácido taurocólico (ATC) mediada por oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban Oatp1a1, OATP1B1 u OATP1B3.

	Oatp1a1	OATP1B1	OATP1B3
Control	100 ± 8	100 ± 18	100 ± 16
Bicarbonato	46 ± 4 ^a	45 ± 8 ^a	84 ± 8
Acetato	96 ± 3	92 ± 10	103 ± 9

Los oocitos se incubaron en medio de captación que contenía 10 µM de ATC, solo (control) o en presencia de 20 mM de bicarbonato o acetato durante 1 h a 25°C. La captación neta se determinó restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación en oocitos que expresaban OATPs. Los valores se expresan como porcentaje de la captación de ATC por los oocitos control y representan la media ± EEM de al menos 24 determinaciones por punto, utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. ^a, p<0,05 comparado con la captación del grupo control por el test de *t* de Student para valores apareados.

Los resultados de esta parte de nuestro estudio sugieren que OATP1B1 y OATP1B3 son transportadores electrogénicos cuya actividad puede verse marcadamente afectada por el pH local. Esto puede determinar la eficacia en la captación de fármacos en tejidos sanos (por ejemplo, tracto gastrointestinal, pulmón y riñón) y patológicos (regiones próximas a tumores o focos de inflamación) donde el pH se desplaza de sus valores normales, es decir entre 7,2 y 7,4, hacia valores más ácidos (Grinstein et al., 1991; Kraus and Wolf, 1996).

4.3. IMPLICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES SINUSOIDALES DE ÁCIDOS BILIARES EN LA COLESTASIS INDUCIDA POR DERIVADOS DE PROGESTERONA

La colestasis hepatocelular es una patología de etiología muy diversa pero que, en todos los casos, consiste en una disminución en la generación del flujo biliar. Por lo tanto, sustancias que normalmente son eliminadas por los hepatocitos a la bilis se acumulan en el hígado y, por regurgitación hepática, posteriormente también en la sangre. Como ya se comentó en el apartado de Introducción de esta Tesis Doctoral, las colestasis se clasifican en intra o extrahepáticas. Esta división es la universalmente aceptada en base a normas de estandarización de la nomenclatura, criterios diagnósticos y pronósticos para las enfermedades del hígado. Una de las posibles causas de colestasis es la gestación, donde tiene lugar una alteración en la homeostasis de los ABs, que puede ir acompañada en un 10-40% de los casos, por un cuadro de hipercolanemia asintomática de la gestación o AHP del inglés “asymptomatic hypercholanemia of pregnancy” (Castano et al., 2006; Pascual et al., 2002). Aproximadamente un 25% de las mujeres con AHP desarrollaron después colestasis intrahepática gestacional o ICP del inglés “intrahepatic cholestasis of pregnancy”, una alteración hepática que cursa con prurito, niveles séricos elevados de ABs y aumento de los valores normales de transaminasas (Glantz et al., 2004). Se ha propuesto que existe un riesgo elevado de parto prematuro y asfixia fetal cuando durante la gestación aparecen niveles maternos de colanemia por encima de 40 $\mu\text{mol/l}$ (Glantz et al., 2004).

La ICP presenta una etiología compleja en la que están implicados factores genéticos y endocrinos. Diversos estudios han mostrado que mujeres portadoras de ciertas mutaciones en algunos de los genes que codifican para transportadores y receptores nucleares de ABs presentan un mayor riesgo de desarrollar ICP (Dixon et al., 2009; Mullenbach et al., 2005).

Datos clínicos y experimentales demuestran que los metabolitos colestáticos derivados de estrógenos y progesterona pueden influir en el metabolismo de los ABs y en su transporte. En el caso de los derivados de estrógenos, tanto el etinilestradiol como el 17 β GE, pueden afectar al flujo biliar (Yamamoto et al., 2006), reduciendo la expresión de transportadores de ABs a nivel de ARNm (Yamamoto et al., 2006). Además, el 17 β GE puede alterar la funcionalidad del principal

transportador canalicular de ABs, Bsep, ya que puede inducir su internalización en ratas (Crocenzi et al., 2003) y trans-inhibir el eflujo de ABs mediado por Bsep de rata en experimentos llevados a cabo por nuestro grupo experimental en oocitos de rana *Xenopus laevis* (Vallejo et al., 2006).

En cuanto a la progesterona y sus derivados, se sabe que los niveles séricos de estos compuestos se incrementan significativamente a medida que transcurre el embarazo (Kancheva et al., 2007) y aumentan aún más los metabolitos sulfatados de progesterona (Sjovall, 1970). En el suero y la orina de mujeres con ICP los valores de estos metabolitos son marcadamente más altos que en mujeres gestantes sin esta patología, mientras que los valores de progesterona permanecen inalterados (Meng et al., 1997). Así, algunos metabolitos sulfatados de progesterona reducen el flujo biliar en hígado perfundido de rata y trans-inhiben el eflujo de ABs mediado por Bsep de rata en oocitos de rana *Xenopus laevis* (Vallejo et al., 2006), mientras que las formas no sulfatadas no tienen ningún efecto significativo (Vallejo et al., 2006). Según datos clínicos y experimentales, los metabolitos de progesterona podrían estar implicados en la patogénesis de la AHP y de la ICP.

Nos planteamos, por tanto, estudiar el efecto de los metabolitos sulfatados de progesterona sobre la captación de ABs utilizando el modelo de hepatocitos humanos en cultivo y profundizar en el mecanismo por el cual estos compuestos interfieren en la captación mediada por NTCP en el modelo de oocitos.

Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo que dirige la Dra. Catherine Williamson en el Imperial College de Londres. Fruto de esta colaboración se ha publicado un artículo en la revista *Journal of Biological Chemistry* (Abu-Hayyeh et al.). Los resultados de los apartados 4.3.1 y 4.3.2 han sido obtenidos por el grupo de Londres, mientras que los experimentos del apartado 4.3.3 y 4.3.4 han sido obtenidos por nosotros en Salamanca.

4.3.1. Caracterización funcional de la captación de ácidos biliares en el modelo de hepatocitos aislados en cultivo

Un inconveniente de utilizar hepatocitos humanos en cultivo es que rápidamente pierden su diferenciación y se produce una marcada caída en la expresión de

transportadores de captación (Jigorel et al., 2005). Por ello, antes de llevar a cabo cualquier experimento se determinaron los niveles de expresión génica de los transportadores sinusoidales de captación de ABs, es decir, NTCP, OATP1B1 y OATP1B3 en hepatocitos cultivados durante 24 horas (tiempo al que se llevaron a cabo todos los experimentos) y se compararon con los valores determinados en tejido hepático. En general, los niveles de expresión de los distintos transportadores de captación son, para hepatocitos en cultivo, homogéneos, aunque menores que los determinados para las biopsias de tejido hepático (figura 26), lo que implica un cierto grado de pérdida de diferenciación en el fenotipo de los hepatocitos durante el proceso de aislamiento y cultivo primario.

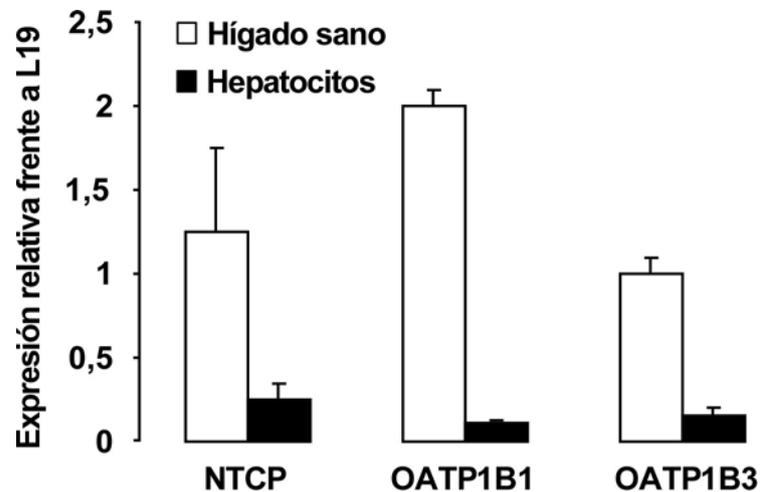


Figura 26. Niveles de expresión relativa de los transportadores de ácidos biliares NTCP, OATP1B1 y OATP1B3 en hepatocitos humanos en cultivo frente a tejido hepático sano determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Las muestras de hígado sano procedían de biopsias de regiones no tumorales. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de estas biopsias por tratamiento con colagenasa y se cultivaron durante 24 horas. Como normalizador se utilizó el gen L19. Los valores representan la media \pm EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado.

No obstante, dada la gran variabilidad interindividual en la expresión de genes propios de la función hepática, como discutiremos con más detalle en el apartado 4.4 de esta memoria de Tesis Doctoral, y en concreto en lo que se refiere a los transportadores sinusoidales de ABs que ya había sido descrita (Kim et al., 1999), observamos que varias muestras de tejido hepático adulto presentaban niveles de expresión de estos transportadores iguales o incluso inferiores a los que se determinaron en hepatocitos en cultivo (datos no mostrados). Aunque, los niveles medios de expresión de los principales transportadores hepáticos de ABs en hepatocitos en cultivo eran menores que el promedio de los tejidos hepáticos

analizados, los valores de Ct obtenidos para los hepatocitos en cultivo indicaban una expresión relativamente alta, lo que permitía llevar a cabo los estudios de transporte mediado por estas proteínas.

Así pues, a continuación se caracterizó la capacidad de los hepatocitos en cultivo de captar ATC en función del tiempo de incubación y de la temperatura. La captación de ATC cuando los hepatocitos se incubaron en presencia del sustrato a 4°C fue casi inapreciable comparada con la captación de ATC a 37°C para cualquiera de los tiempos estudiados (figura 27). La elevada sensibilidad a la temperatura es un argumento clásico a favor de que la incorporación del sustrato a la célula se produce por un sistema mediado por una proteína transportadora, ya que un proceso de difusión simple es mucho menos sensible a esta diferencia de temperatura.

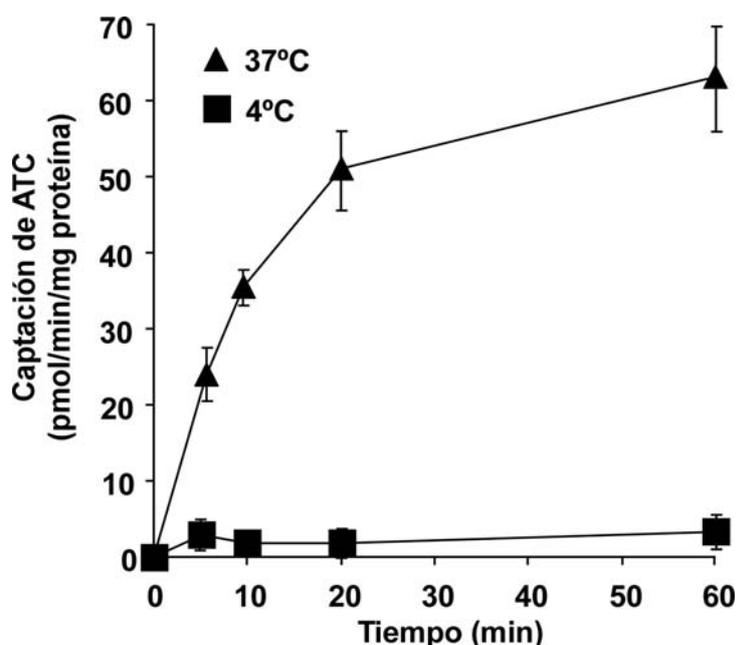


Figura 27. Captación de ácido taurocólico (ATC) por hepatocitos humanos en cultivo en función del tiempo. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de biopsias de tejido hepático sano por tratamiento con colagenasa y se cultivaron durante 24 horas. Estas células se incubaron en presencia de 0,2 μ M ATC en función del tiempo a una temperatura de 4°C ó 37°C. Los valores representan la media \pm EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado.

Para dilucidar la participación relativa en la captación de ATC de los transportadores dependientes (NTCP) e independientes (OATP1B1 y OATP1B3) de un gradiente de sodio, los hepatocitos humanos en cultivo se incubaron a diferentes tiempos en un medio de captación que contenía cloruro sódico o cloruro de colina.

Además, el medio contenía $0,2 \mu\text{M}$ de ATC, como sustrato. La captación tanto dependiente, como independiente de sodio, aumentó con el tiempo y comenzó a perder la linealidad después de 10 y 5 minutos respectivamente. El tiempo de 5 minutos fue el que se usó para los siguientes estudios, ya que era el primero que presentaba una relación señal frente a ruido aceptable y reunía las características requeridas para llevar a cabo estudios cinéticos en condiciones de velocidad inicial. La captación dependiente de sodio fue la responsable del 89% de la captación total a todos los tiempos estudiados (figura 28), lo que coincide con estudios previos en los que se llevaron a cabo experimentos similares en el modelo experimental de hepatocitos humanos en cultivo (Sandker et al., 1994).

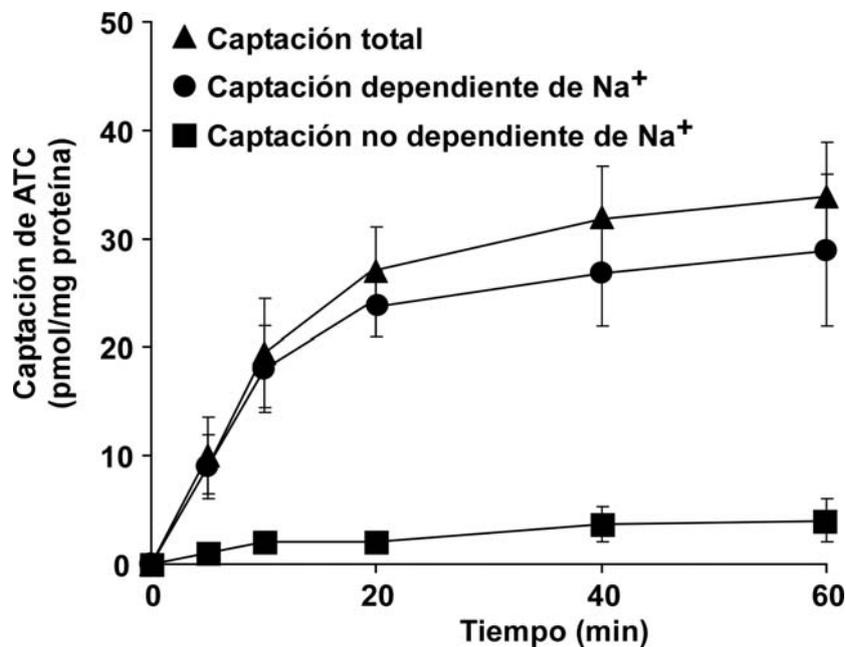


Figura 28. Captación dependiente y no dependiente de sodio de ácido taurocólico (ATC) por hepatocitos humanos en cultivo en función del tiempo. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de biopsias de tejido hepático sano por tratamiento con colagenasa y se cultivaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la captación de $0,2 \mu\text{M}$ ATC a diferentes tiempos en un medio con o sin sodio. La captación Na^+ -dependiente se calculó a partir de la diferencia entre la captación total y la captación no dependiente de sodio. Los valores representan la media \pm EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado.

Seguidamente se llevaron a cabo experimentos en los que los hepatocitos se incubaron con $0,2 \mu\text{M}$ de ATC en presencia de concentraciones crecientes de ATC no marcado. De los resultados de este estudio (figura 29) se desprende que el proceso de captación total es saturable y se ajusta a una ecuación de Michaelis-Menten. Cuando se utilizó el método de dobles recíprocos para calcular las constantes cinéticas encontramos que la constante de afinidad de Michaelis-

Menten, K_M , dio un valor de $14,6 \mu\text{M}$, mientras que la velocidad máxima de transporte, V_{max} , fue de $190 \text{ pmol/min/mg proteína}$. El valor de K_M que encontramos en los hepatocitos en cultivo fue similar al que habíamos determinado en este mismo estudio para la captación mediada por NTCP en el modelo de oocitos de rana ($K_M 10,1 \mu\text{M}$, tabla 7) y al descrito previamente en trabajos de otros grupos (Ho et al., 2004; Kullak-Ublick et al., 2000). En base a estos resultados, para los siguientes estudios de inhibición, se eligió una concentración de $1 \mu\text{M}$ de ATC, ya que esta concentración se encontraba muy por debajo del valor de K_M (figura 29).

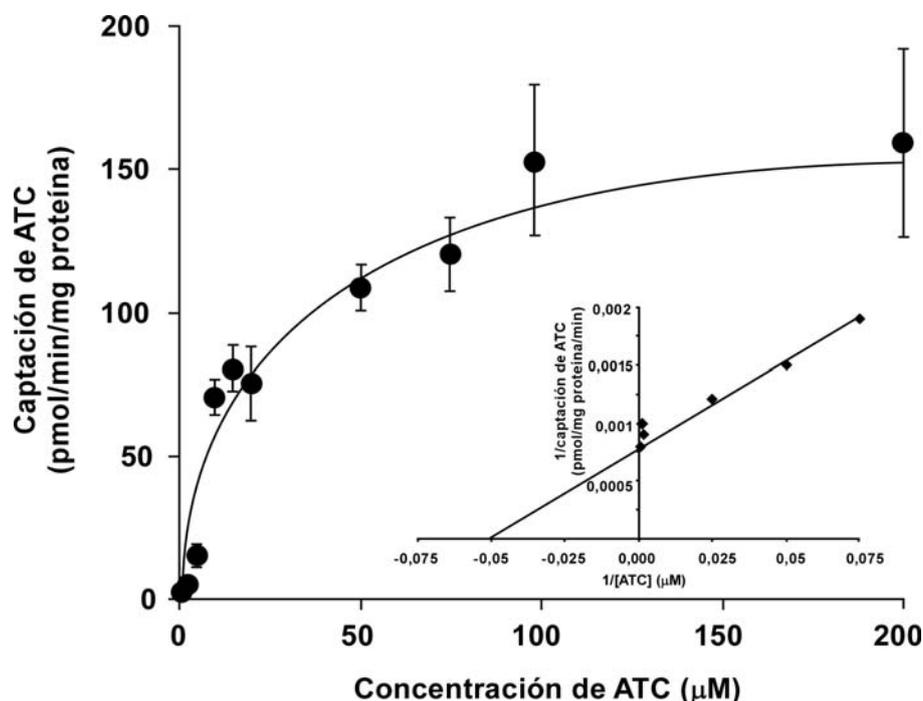


Figura 29. Cinética de captación de ácido taurocólico ($0,2 \mu\text{M } [^3\text{H}]\text{-ATC}$) por hepatocitos humanos en cultivo. Las células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ATC no marcado. En el recuadro se muestra una gráfica de doble recíproco en la que se representa la captación de ATC en condiciones de velocidad inicial frente a la concentración de ATC en el rango $1\text{-}200 \mu\text{M}$. Los valores representan la media \pm EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado.

4.3.2. Efecto de los metabolitos sulfatados de progesterona sobre la captación de ácidos biliares en hepatocitos en cultivo

Para determinar el papel de los metabolitos sulfatados de progesterona sobre la captación de ATC se llevaron a cabo experimentos en los que los hepatocitos en cultivo se incubaron en presencia del sustrato y los compuestos alopregnenolona-sulfato (PM4-S) y epialopregnenolona-sulfato (PM5-S) a una concentración de 50 μ M. En estas condiciones observamos una marcada inhibición (-98% y -97,5%, respectivamente) de la captación de ATC (figura 30). Debido a que tanto el PM4-S como el PM5-S presentan una capacidad de inhibición muy similar se eligió el compuesto PM5-S para llevar a cabo los siguientes estudios. Con el fin de profundizar en el efecto de PM5-S sobre la captación de ABs, los hepatocitos se incubaron en presencia de 1 μ M ATC y concentraciones crecientes de PM5-S. Esta maniobra causó una reducción dependiente de la concentración de la captación de ATC (figura 31). El valor de IC_{50} , calculado a partir de la figura 31, fue de 9,3 μ M para el PM5-S.

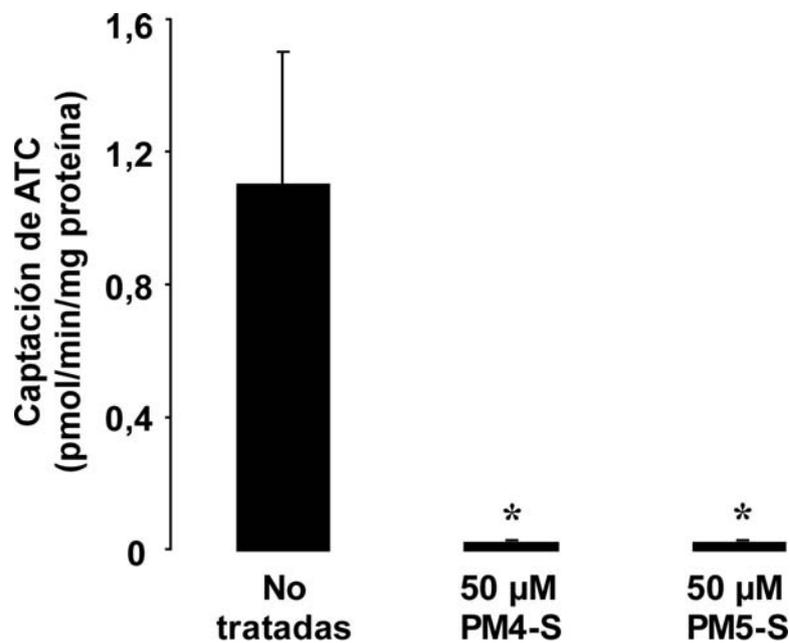


Figura 30. Efecto del PM4-S y PM5-S sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) por hepatocitos humanos en cultivo. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de biopsias de tejido hepático sano por tratamiento con colagenasa y se cultivaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los hepatocitos se incubaron durante 5 minutos con 0,2 μ M ATC en presencia o no de 50 μ M PM4-S/PM5-S. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 9 determinaciones por punto, procedentes de 3 cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación en ausencia de inhibidor por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

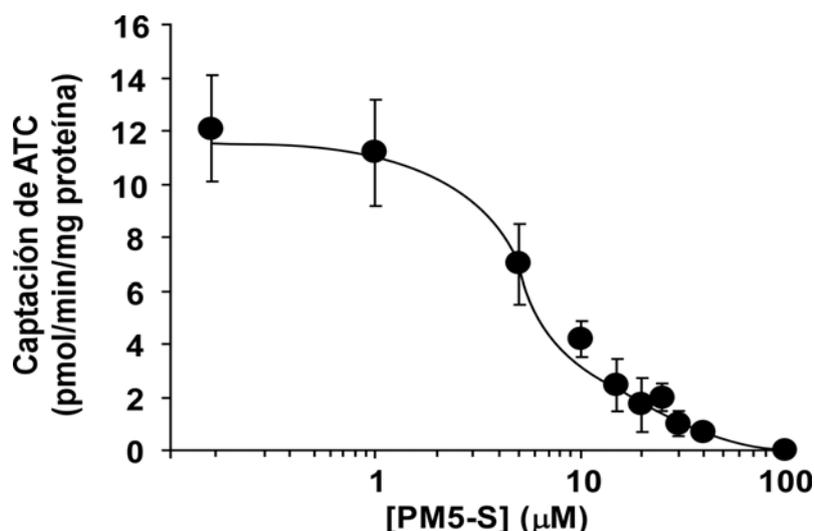


Figura 31. Inhibición de la captación de ácido taurocólico (ATC) por PM5-S en hepatocitos humanos en cultivo. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de biopsias de tejido hepático sano por tratamiento con colagenasa y se cultivaron durante 24 horas. Se determinó la captación de 1 µM ATC por los hepatocitos tras 5 minutos de incubación en presencia de concentraciones crecientes de PM5-S. Los valores representan la media ± EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado.

Como se aprecia en la figura 28, la captación por la fracción sodio-dependiente es la responsable mayoritaria de la incorporación de ABs al hepatocito. Para estudiar el efecto de PM5-S sobre la captación dependiente o independiente de sodio de ATC, los hepatocitos en cultivo se incubaron en medio de captación con cloruro de sodio o de colina. La presencia de 50 µM de PM5-S en el medio de incubación, un valor aproximadamente 5 veces superior a su IC₅₀, redujo marcadamente la captación de ATC. La inhibición afectó tanto a la fracción dependiente (-98%) como a la independiente (-92%) de sodio (tabla 6).

Tabla 6. Efecto del PM5-S sobre la captación dependiente y no dependiente de sodio de ácido taurocólico (ATC) por hepatocitos humanos en cultivo.

Componente de la captación de ABs y tratamiento	Captación (pmol/mg proteína)
Total sin tratamiento	67,3 ± 21,5
Total + 50 µM PM5-S	1,3 ± 0,7 ^a
Na ⁺ -dependiente sin tratamiento	64,2 ± 21,8
Na ⁺ -dependiente + 50 µM PM5-S	1,3 ± 0,7 ^a
Na ⁺ -independiente sin tratamiento	3,1 ± 0,8
Na ⁺ -independiente + 50 µM PM5-S	0,3 ± 0,2 ^a

Los hepatocitos se incubaron con 1 µM ATC durante 20 minutos en presencia o no de 50 µM de PM5-S en medio de sodio o de colina. Los valores representan la media ± EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado. ^a, p<0,05 comparado con la captación de ATC en ausencia de inhibidor por el test de *t* de Student para valores apareados.

Para dilucidar el mecanismo de inhibición de PM5-S, los hepatocitos en cultivo se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ATC (1-200 μM) manteniendo constante la concentración del inhibidor, que en este caso fue PM5-S a 5 ó 25 μM .

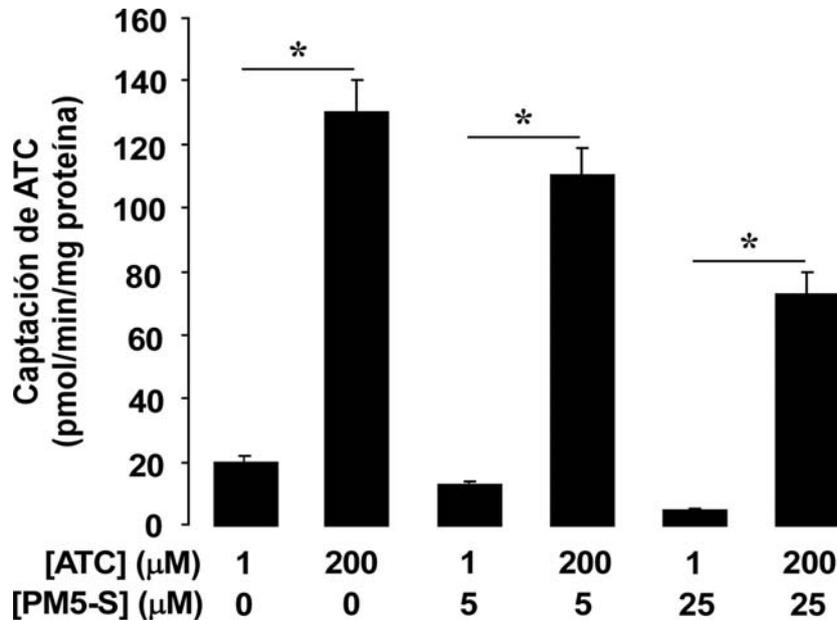


Figura 32. Estudio del efecto del PM5-S sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) en hepatocitos humanos en cultivo para determinar el mecanismo de inhibición de PM5-S sobre la captación de ATC. Los hepatocitos se incubaron durante 5 minutos con concentraciones de 1 ó 200 μM ATC en presencia o no de 5 ó 25 μM de PM5-S. Los valores representan la media \pm EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado. *, $p < 0,05$ respecto a la captación de ATC 1 μM por el test de *t* de Student para valores apareados.

Como se aprecia en la figura 32, la captación del sustrato era mayor a medida que se incrementaba la relación ATC/PM5-S en el medio de incubación, por lo que la inhibición podría ser competitiva. Por ello nos planteamos si el PM5-S, además de inhibir la captación de ATC, podría ser captado por los hepatocitos en cultivo. Para investigar esta cuestión, las células se incubaron durante 10 minutos en presencia de concentraciones crecientes de PM5-S a una temperatura de 4°C ó 37°C. La acumulación intracelular del compuesto se determinó en el laboratorio del Dr. Hanns-Ulrich Marschall en Estocolmo, Suecia, utilizando la técnica de GC-MS. La incubación de los hepatocitos en presencia de 1, 10, 25 ó 50 μM de PM5-S dio como resultado una captación dependiente de temperatura de 0, 0,8, 0,78 y 0,62 nmol de PM5-S (figura 33). Estos niveles representan una acumulación de PM5-S a nivel intracelular del 32%, 12% y 5% de los medios con 10, 25 y 50 μM de PM5-S, respectivamente, ya que tras la incubación con 1 μM de PM5-S no se apreciaron

niveles detectables de este compuesto a nivel intracelular. Este experimento demuestra que los hepatocitos son capaces de captar PM5-S de forma dependiente de la concentración por un proceso mediado en gran parte por transportadores de membrana (figura 33).

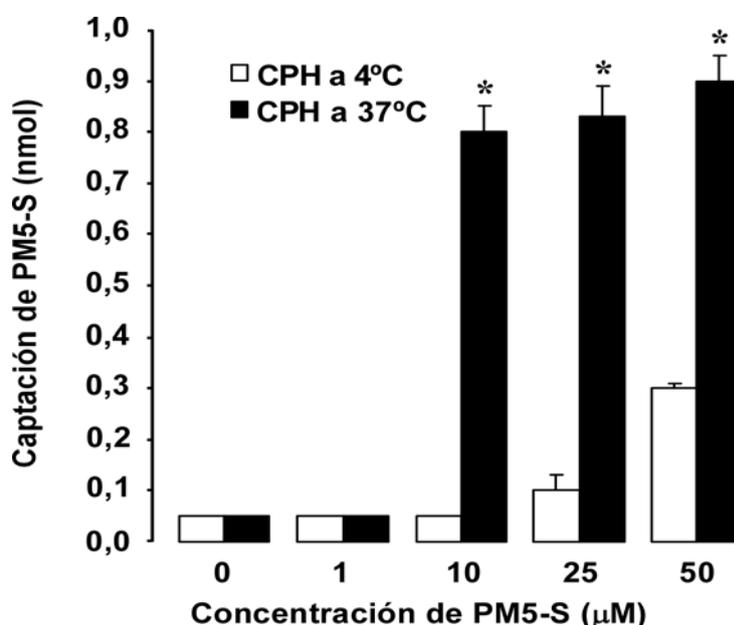


Figura 33. Niveles intracelulares de PM5-S en hepatocitos humanos en cultivo (CPH) tras la incubación durante 10 minutos a 4°C ó 37°C con concentraciones crecientes de PM5-S (0-50 μM). Se utilizó la técnica de GC-MS para cuantificar los niveles intracelulares de PM5-S. Los valores representan la media ± EEM de 3 cultivos diferentes determinados por triplicado. *, $p < 0,05$ frente a los hepatocitos incubados a 4°C por el test de t de Student para valores apareados.

4.3.3. Estudio del efecto inhibitor de la progesterona y sus metabolitos sobre la captación de ATC en oocitos de *Xenopus laevis*

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron oocitos inyectados con el ARNm de NTCP. En primer lugar se estudió la captación de 10 μM ATC mediada por NTCP en función del tiempo. La captación resultó ser lineal hasta los 10 minutos, por lo que se eligió este tiempo para futuros experimentos que exigían condiciones de velocidad inicial (figura 34). Por otra parte se determinó el efecto de PM4-S y PM5-S a 30 μM, así como de sus formas no sulfatadas (PM4 y PM5) y la progesterona sobre la captación de ATC mediada por NTCP en oocitos incubados en presencia de estos compuestos durante 1 h. Ninguno de estos compuestos afectó a la captación inespecífica de ATC por oocitos no inyectados. En los oocitos que expresaban NTCP, tanto la progesterona como sus derivados no sulfatados PM4 y PM5 no afectaron a la captación de ATC mediada por NTCP (figura 35).

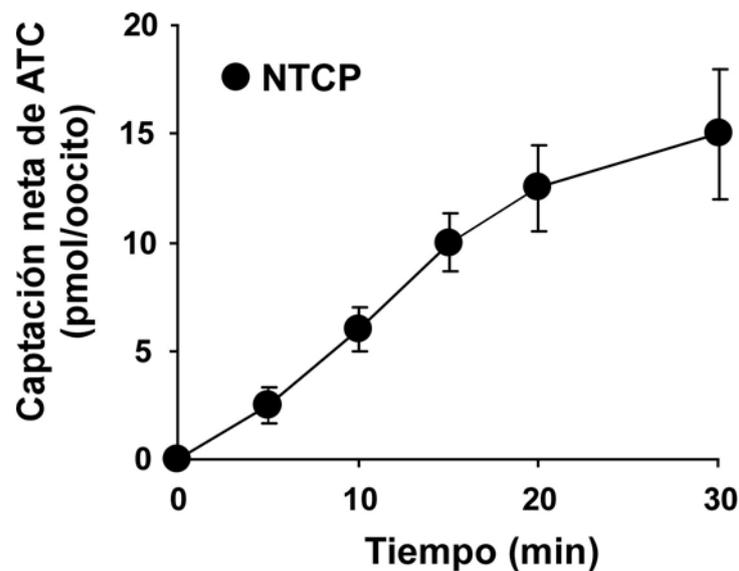


Figura 34. Captación de ácido taurocólico (10 μ M ATC) a 25°C por oocitos que expresaban NTCP en función del tiempo. La captación específica se determinó restando la captación por los oocitos no inyectados a la captación por los oocitos que expresaban NTCP. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes.

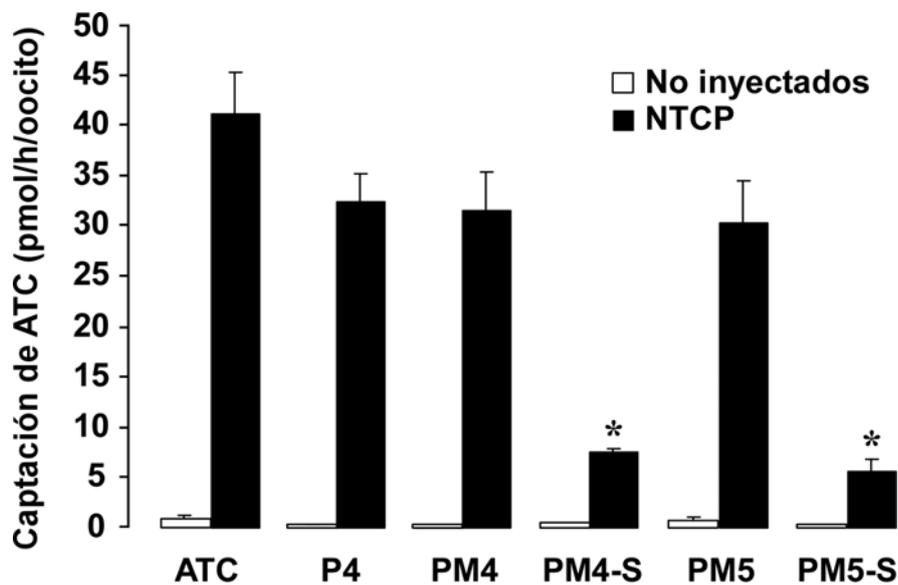


Figura 35. Efecto de la progesterona y sus metabolitos sulfatados o no sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) por NTCP. Se determinó la captación de 10 μ M ATC en oocitos inyectados o no con NTCP tras la incubación durante 1 hora a 25°C en medio de captación solo o en presencia de progesterona (P4) y sus metabolitos sulfatados (PM4-S, PM5-S) o no (PM4, PM5) a una concentración final de 30 μ M en todos los casos. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de ATC en ausencia de inhibidor por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Así pues, sólo los compuestos sulfatados, PM4S y PM5-S (figura 35), redujeron la captación de ATC -80% y -85%, respectivamente. Estudios previos habían confirmado, sin embargo, que también la progesterona era capaz de inhibir la captación de ATC mediada por NTCP (Kim et al., 1999; Zimmerli et al., 1989). Una posible explicación para la discrepancia en cuanto a los resultados obtenidos es la relación entre la concentración de ATC y progesterona (10 μ M ATC frente a 50 μ M de progesterona en nuestros experimentos), que fue considerablemente mayor en otros estudios, 1 μ M ATC frente a 200 μ M progesterona (Zimmerli et al., 1989) y 5 μ M ATC frente a 100 μ M progesterona (Kim et al., 1999).

A continuación, se determinó la captación de ATC en presencia de concentraciones crecientes de PM4-S y PM5-S en el rango de 0-60 μ M. En este experimento se observó un efecto inhibitorio dependiente de concentración sobre la captación de ATC por NTCP, apreciándose además que la magnitud de la inhibición fue similar para ambos compuestos sulfatados. Ninguna de las concentraciones ensayadas ejerció efecto alguno sobre la captación inespecífica de ATC (figura 36). La inhibición mediada por PM4-S/PM5-S sobre el transporte de ATC alcanzó un valor máximo a una concentración de 30 μ M, por lo que esta fue la concentración elegida para los siguientes experimentos.

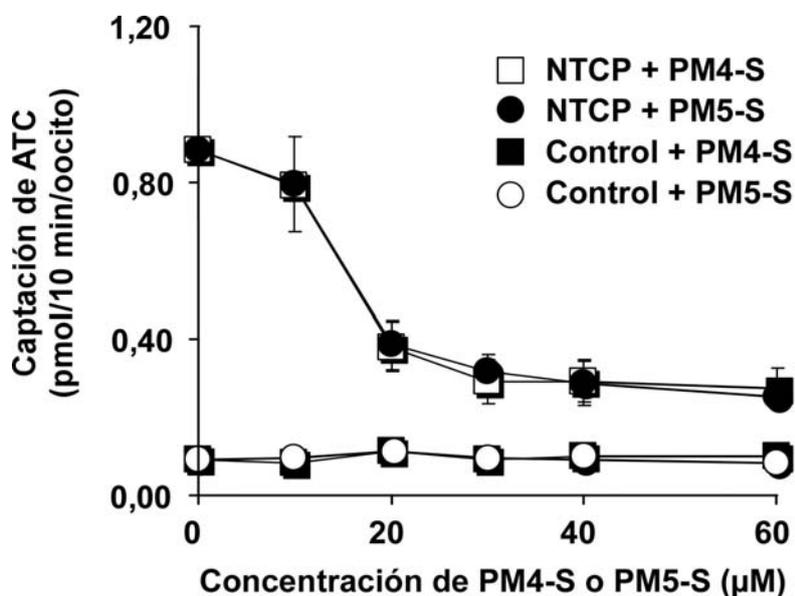


Figura 36. Efecto del PM4-S y PM5-S sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) por NTCP. Se determinó la captación de 10 μ M ATC en oocitos inyectados con NTCP o no inyectados (Control) tras la incubación durante 10 minutos a 25°C en medio de captación solo o en presencia de concentraciones crecientes de PM4-S o PM5-S. Los valores se expresan como la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes.

Para estudiar el modo de inhibición, se determinó la captación de ATC a diferentes concentraciones de sustrato usando una concentración fija de inhibidor, que fue de 30 μM tanto para PM4-S como para PM5-S. La gráfica de dobles recíprocos que se obtuvo al representar la concentración de ATC frente a la captación del mismo (figura 37A) indica que el efecto inhibitorio inducido tanto por PM4-S como por PM5-S es principalmente competitivo, ya que ambos inhibidores ejercen sólo un efecto moderado sobre la velocidad máxima del transporte (V_{max} , recíproco del valor de corte con el eje Y), pero un marcado efecto sobre la constante de afinidad (K_M , valor absoluto del recíproco del corte con el eje X). Esto se tradujo en un marcado descenso en la eficiencia del transporte (E_T) definida como el cociente entre la V_{max} y la K_M (tabla 7).

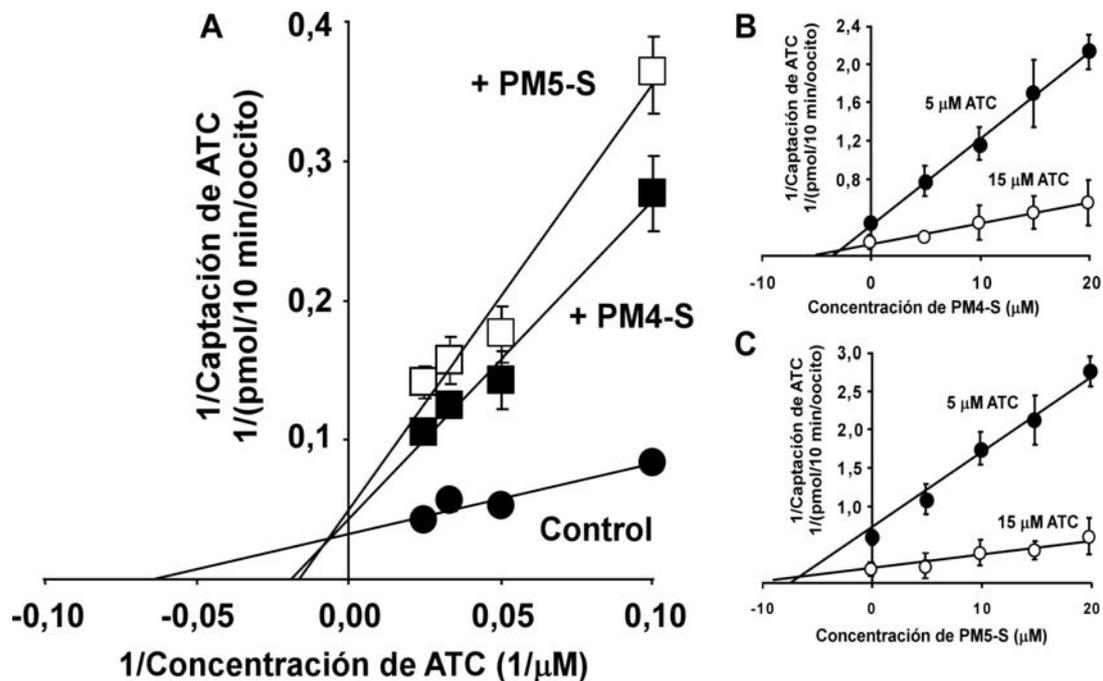


Figura 37. Estudio del efecto de PM4-S y PM5-S sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) mediada por NTCP para determinar el mecanismo de inhibición de dichos compuestos. (A) Representación gráfica de doble recíproco para la captación específica de ATC por oocitos que expresan NTCP. Los oocitos se incubaron durante 10 minutos a 25°C en presencia de concentraciones crecientes de ATC no marcado sin inhibidor (control) o con 30 μM de PM4-S o PM5-S. La captación específica se determinó restando la captación por los oocitos no inyectados a la captación por los oocitos que expresaban NTCP. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes. (B y C) Representación gráfica de Dixon para la captación específica de 5 ó 15 μM de ATC durante 10 min a 25°C por oocitos que expresan NTCP en presencia de concentraciones crecientes de PM4-S o PM5-S. La captación específica se determinó restando la captación por los oocitos no inyectados a la captación por los oocitos que expresaban NTCP. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 24 determinaciones por punto utilizando oocitos provenientes de tres ranas diferentes.

La constante de inhibición (K_i) para PM4-S/PM5-S se determinó midiendo la captación de ATC (v) a concentraciones fijas de sustrato de 5 ó 15 μM en oocitos que expresaban NTCP incubados en presencia de concentraciones crecientes de PM4-S/PM5-S. A partir de los resultados obtenidos, fue posible hacer un análisis de Dixon al representar los valores de $1/v$ frente a la concentración de PM4-S (figura 37B) o PM5-S (figura 37C). Los resultados de las representaciones de Dixon son coherentes con la existencia de un fuerte componente competitivo en la inhibición de la captación de ATC mediada por PM4-S/PM5-S. Las constantes de inhibición fueron similares para ambos compuestos y del mismo orden que la K_M determinada para la captación de ATC en ausencia de inhibidor (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de los metabolitos sulfatados de progesterona PM4-S y PM5-S sobre la captación de ácido taurocólico (ATC) por oocitos que expresan NTCP.

Inhibidor	V_{\max} (pmol/10 min/oocito)	%	K_M (μM)	%	Eficacia (V_{\max}/K_M)	%	K_i (μM)
	13,2 \pm 7,5	100	10,1 \pm 2,1	100	1,11 \pm 0,45	100	
PM4-S	10,7 \pm 5,4	82	38,6 \pm 8,9 ^a	383	0,25 \pm 0,09 ^a	23	7,7 \pm 1,1
PM5-S	10,9 \pm 4,4	82	40,1 \pm 5,4 ^a	397	0,25 \pm 0,08 ^a	23	6,4 \pm 1,6

Los valores se calcularon a partir de la representación gráfica del doble recíproco y de las cinéticas de Dixon. La captación neta de ATC se determinó restando la captación inespecífica por los oocitos no inyectados a la captación mediada por aquellos que expresaban NTCP. Los valores representan la media \pm EEM de 15 oocitos individuales por punto obtenidos de 3 ranas diferentes. ^a, $p < 0,05$ comparado con la captación de ATC en ausencia de inhibidor por el test de t de Student.

Por otra parte, el análisis por GC-MS del lisado celular procedente de hepatocitos en cultivo incubados en presencia de PM5-S indicaba que los transportadores de captación eran capaces de introducir PM5-S mediante un mecanismo dependiente de la temperatura (figura 33). Para investigar este aspecto en profundidad, se incubaron oocitos que expresaban o no NTCP en presencia de 30 μM de PM4-S/PM5-S durante 1 hora y se determinó el contenido intracelular de ambos compuestos en nuestro laboratorio en la Universidad de Salamanca mediante la técnica de HPLC-MS-MS. Los oocitos que expresaban NTCP mostraron una mayor acumulación de PM4S (800%) y PM5-S (640%) que los no inyectados (figura 38).

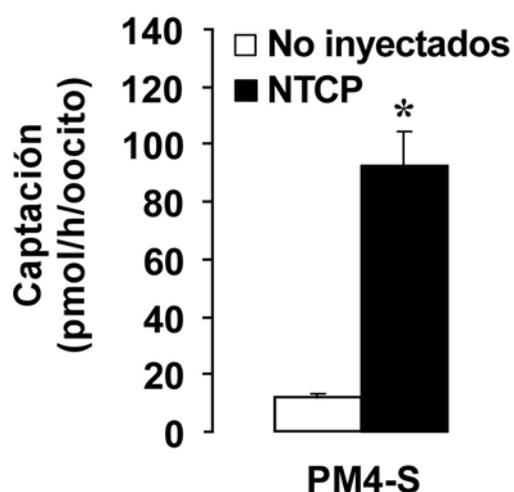


Figura 38. Captación de 30 μM de PM4-S/PM5-S por oocitos no inyectados o que expresaban NTCP, durante 1 h a 25°C. Las medidas se llevaron a cabo por HPLC-MS-MS. La determinación del contenido de PM4-S y PM5-S se corrigió por la recuperación de ácido taurolitocólico-3-sulfato usado como estándar interno y que fue añadido a la solución de lisis/extracción. Los valores son la media \pm EEM de 15 oocitos individuales por punto obtenidos de 3 ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con la captación de los oocitos no inyectados por el test de t de Student para valores apareados.

4.3.4. Determinación de las concentraciones séricas de PM4-S y PM5-S durante la gestación

De nuevo en nuestro laboratorio, se utilizó la técnica de HPLC-MS-MS para determinar la concentración sérica de PM4-S y PM5-S en mujeres gestantes (30-38 semanas) o no gestantes (control). Se determinó la concentración total de los dos compuestos, ya que ambos, al ser epímeros, presentan la misma masa molecular y son, por tanto, indistinguibles por esta técnica. Las concentraciones séricas de PM4-S y PM5-S fueron de 0,08 μM para las mujeres no gestantes y 6,2 μM para las mujeres gestantes (figura 39). Esto equivale a un aumento de unas 80 veces en la concentración de PM4-S y PM5-S durante una gestación normal, lo que concuerda con estudios previos que demostraron una elevación en los niveles de estos metabolitos durante la gestación (Kancheva et al., 2007).

Hay que tener en cuenta que el valor de IC_{50} para el PM5-S fue de 9,2 μM en los hepatocitos en cultivo y que en el modelo de oocitos que expresaban NTCP se obtuvieron valores de K_i de 7,7 μM y 6,4 μM para los compuestos PM4-S y PM5-S, respectivamente. Los valores de IC_{50} y de K_i para PM4-S y PM5-S son solo ligeramente superiores a los niveles totales de estos compuestos observados en el

suero de mujeres gestantes sanas durante el tercer trimestre de la gestación (6,2 μM ; figura 39), pero están en el rango o son inferiores a los niveles séricos de derivados sulfatados de progesterona, descritos para estos compuestos, en mujeres con AHP (Pascual et al., 2002) o ICP (Sjovall and Sjovall, 1970).

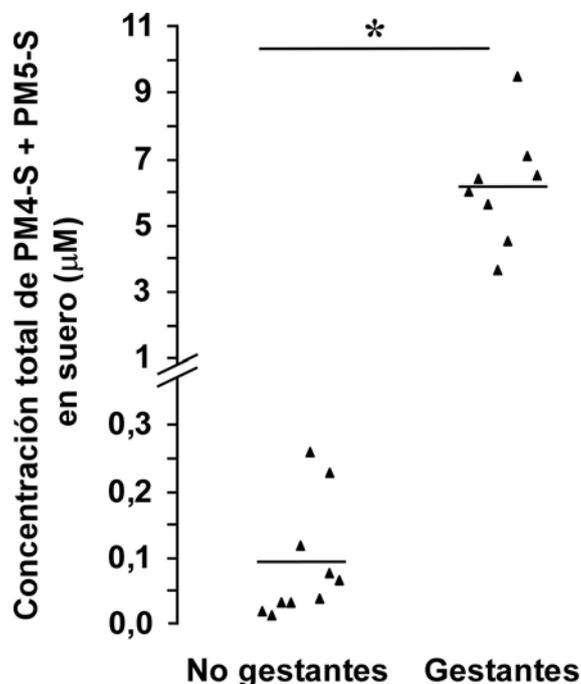


Figura 39. Concentraciones séricas de PM4-S y PM5-S en mujeres gestantes (30-38 semanas) y no gestantes en ayunas. Las medidas se realizaron por HPLC-MS-MS. Las líneas negras en la nube de puntos representan la media de un mínimo de 8 muestras. *, $p < 0,05$ comparado con los niveles determinados en mujeres no gestantes por el test de t de Student.

Estos resultados sugieren la existencia de una relación causa-efecto entre la AHP que se observa en algunas mujeres embarazadas que, por lo demás, presentan parámetros bioquímicos normales para las pruebas hepáticas (Castano et al., 2006; Pascual et al., 2002) y cuyos niveles de ABs retornan a valores normales al terminar la gestación.

Por otra parte, los niveles séricos de los metabolitos sulfatados de progesterona están aún más aumentados en las gestaciones que se complican con ICP (Meng et al., 1997; Sjovall and Sjovall, 1970) y pueden, por tanto, estar involucrados en la hipercolanemia que aparece en estos casos. Los valores totales de PM4-S y PM5-S que se alcanzan durante la ICP se encuentran aproximadamente en el mismo rango que las utilizadas en este estudio (30-50 μM) (Sjovall, 1970). Así pues, es probable

que las altas concentraciones de estos compuestos contribuyan a la hipercolanemia de la ICP. Puesto que la ICP se considera una enfermedad multifactorial, la elevación de los niveles de los metabolitos sulfatados de progesterona podría ser un factor que agrave el fenotipo de la ICP en mujeres susceptibles.

No se sabe aún por qué los niveles de los derivados sulfatados de la progesterona se encuentran elevados en mujeres con ICP y está todavía por descubrir si se trata de una causa o de una consecuencia de esta patología. Sin embargo, es importante el hecho de que el incremento en los niveles de estos metabolitos precede a la aparición de pruebas anormales de funcionalidad hepática en dos pacientes con ICP (Sjovall and Sjovall, 1970). Además, recordemos que en mujeres con AHP coexisten hipercolanemia y elevados niveles séricos de metabolitos sulfatados de progesterona sin otra sintomatología de alteración hepática (Castano et al., 2006; Pascual et al., 2002).

Respecto a las repercusiones fetales de esta circunstancia, hay que recordar que las complicaciones fetales de la ICP aparecen más frecuentemente en los casos donde el valor de concentración de ABs en suero es superior a 40 μM . Así, un incremento en los niveles de los metabolitos sulfatados de progesterona en ICP puede incrementar el riesgo para el feto debido al agravamiento de la hipercolanemia.

En resumen, los resultados muestran que el tratamiento de los hepatocitos en cultivo y de los oocitos que expresan NTCP con metabolitos sulfatados de progesterona a concentraciones que se alcanzan de forma fisiológica durante la gestación, inhiben significativamente y de forma competitiva, la captación de ABs por la principal vía responsable de su transporte, NTCP. La fracción sodio-independiente para la captación de ABs, aunque a un nivel menor, parece estar también afectada. Estos resultados en conjunto, arrojan luz sobre el mecanismo por el que los niveles elevados de los metabolitos de progesterona pueden contribuir a la patogénesis de la hipercolanemia durante la gestación normal y la ICP.

4.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER HEPÁTICO

Como se ha ido comentando a lo largo de esta Tesis Doctoral, uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día la lucha contra el cáncer, incluido el cáncer hepático, es la aparición de resistencia al tratamiento por parte del tumor. En ocasiones, el tumor desarrolla resistencia a lo largo del proceso terapéutico pero en muchas otras ocasiones, el paciente no responde al tratamiento aplicado desde un principio. Esto es debido a que generalmente se aplican tratamientos estándar por el hecho de que no se tienen suficientes herramientas ni conocimiento para poder llevar a cabo la elección del tratamiento de forma individualizada para cada paciente. Para superar este problema es necesario identificar los mecanismos que determinan la pérdida de respuesta a cada tipo de fármacos y poder realizar, antes de iniciar el tratamiento, un perfil genético de cada tumor en lo que se refiere a estos mecanismos. En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación, los genes implicados en los mecanismos de quimiorresistencia de tumores hepáticos y gastrointestinales se han clasificado en cinco grupos diferentes denominados MOC de las siglas inglesas para “mechanism of chemoresistance” (Marin et al., 2009). La identificación de los niveles de expresión de los genes implicados en cada uno de estos MOCs puede utilizarse para desarrollar test para predecir la falta de respuesta a la quimioterapia antitumoral. Esto es importante para prevenir el fracaso de los tratamientos con agentes antitumorales que, aparte de presentar efectos adversos, pueden inducir una selección de las células tumorales más quimiorresistentes.

Algunos de los genes incluidos en los MOCs han sido anteriormente utilizados como marcadores tumorales clásicos con aplicación en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento antitumoral. Su determinación incluye técnicas de análisis enzimáticas y de la presencia de proteínas en suero y en tejidos. Sin embargo, el uso de proteínas en clínica con los fines que proponemos aquí se enfrentaría a varios retos importantes, como por ejemplo que se requieren cantidades relativamente grandes de tejido de la biopsia. Además, estos marcadores se detectan generalmente por inmunohistoquímica, para lo cual son necesarias varias secciones del tejido para la identificación de los marcadores y la comparación de los niveles de expresión respecto al tejido sano. Por otra parte, este método sólo proporciona datos semi-cuantitativos. Para superar los

inconvenientes relacionados con la utilización de proteínas como marcadores tumorales, una de las alternativas más prometedoras es la determinación de la expresión génica, lo que generalmente implica el uso de microarrays y RT-PCR cuantitativa para su identificación y validación, respectivamente (Loboda et al., 2009). El carácter cuantitativo de la determinación de la expresión génica permite establecer un valor límite para el marcador. Por otra parte, la evaluación de marcadores biológicos en base a su expresión génica, por lo general, exige una menor cantidad de tejido de la biopsia.

Para la evaluación de perfiles génicos, los microarrays de RNA presentan los inconvenientes de ser muy caros y de difícil interpretación, mientras que el uso de RT-PCR cuantitativa a tiempo real permite un estudio más pormenorizado, con una interpretación más sencilla de los resultados. Por el contrario, presenta la desventaja de ser un método menos automatizable.

Por todo ello, el objetivo en este apartado fue desarrollar una herramienta más económica y automatizable que la técnica de PCR cuantitativa convencional, cuya información, aunque más limitada que la obtenida mediante el uso de microarrays, fuese interpretable de forma rápida para su uso en clínica.

Con este fin decidimos utilizar tarjetas microfluídicas o TLDA, que constituyen una versión modificada de la RT-PCR a tiempo real en las que los pocillos contienen los componentes específicos para llevar a cabo las reacciones. Este sistema tiene como ventajas el permitir el diseño de la placa a medida en función de las necesidades que requiera el estudio, además de ser un método sensible, fiable, más económico y muy rápido.

4.4.1. Selección de los genes objeto de estudio

Después de hacer una exhaustiva búsqueda bibliográfica elegimos 135 genes como posibles candidatos para predecir la aparición de resistencia en tumores hepáticos. El criterio de selección de los mismos se basó en su relevancia previamente descrita en la preexistencia o aparición durante el tratamiento de resistencia a la quimioterapia antitumoral en HCC según estudios preliminares. El análisis individual en líneas celulares derivadas de HCC de la presencia o no de niveles detectables de estos 135 genes mediante SYBR green I nos permitió elegir 95 de ellos para el

diseño final de las TLDAs. Utilizando esta técnica se determinaron los niveles de ARNm de los genes de estudio en muestras pareadas de hígado sano y HCC que procedían de pacientes que no habían sido tratados previamente y de los que se tomaron las muestras con fines diagnósticos. También se analizó la expresión génica en líneas celulares de origen hepático, comúnmente usadas como modelos “in vitro” y el efecto de la exposición de éstas a concentraciones de cisplatino equivalentes al valor de IC₅₀, determinado para cada línea celular en estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, durante 72 horas.

4.4.2. Estudio de la implicación del transportoma en la resistencia a la quimioterapia antitumoral en carcinoma hepatocelular

Como se comentó en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, el papel de muchos miembros de las familias de transportadores SLC y ABC en la resistencia a fármacos ha ido adquiriendo un interés creciente a lo largo de los últimos años. Como consecuencia Huang y colaboradores definieron por primera vez en 2004 el concepto de transportoma o conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos cuyo perfil de expresión pueda predecir la respuesta a un tratamiento antitumoral (Huang et al., 2004).

De esta forma, en lo que en nuestro estudio denominamos MOC-I se estudiaron los genes responsables de una reducción de la concentración de fármaco dentro de las células tumorales, lo que puede ser debido a una disminución de la captación del fármaco (MOC-Ia) o a una activación del eflujo del mismo (MOC-Ib).

MOC-Ia

Los genes que se estudiaron en este grupo pertenecen a la superfamilia SLC, compuesta por más de 300 transportadores, que median la captación de sustratos muy diversos, desde iones inorgánicos a moléculas orgánicas catiónicas, aniónicas o neutras. Estas proteínas son capaces de transportar, además, fármacos citostáticos por similitud estructural con otros sustratos (Huang and Sadee, 2006).

En primer lugar decidimos estudiar los niveles de expresión de los genes de cada grupo en tejido hepático sano, lo que nos permitió conocer el peso relativo que pueden tener los cambios de expresión de un determinado gen. En la tabla 8 se

muestran los valores de expresión en tejido sano como ΔCt de cada gen referido a los dos genes normalizadores (GAPDH y beta-actina). Hay que tener en cuenta que valores más altos indican niveles de expresión menores. Así, tal y como se aprecia en la tabla 8, muchos miembros de esta familia se encontraron altamente expresados en hígado humano (verde oscuro). Concretamente, los mayores niveles de expresión se encontraron para el NTCP, los transportadores de aniones orgánicos OATPs y cationes orgánicos (OCT1), algunas isoformas de transportadores de nucleósidos como CNT1 y ENT1 y el transportador de cobre CTR1. En la tabla 8 también se muestra la expresión relativa de los genes de este grupo frente a tejido hepático sano, donde cada valor se acompaña del color correspondiente según la escala de la parte derecha de la misma. Además de presentar los datos individuales en esta tabla, los datos de expresión media para cada gen en los diferentes tumores y tejidos sanos analizados se muestran en la figura 40. De esta manera se pudo apreciar la heterogeneidad de las firmas genéticas entre los diferentes tumores a la vez que la existencia de algunas tendencias características de la familia de tumores. Para llevar a cabo el cálculo del promedio de niveles de expresión sin que una sobreexpresión excesiva en un tumor distorsionase el resultado fue necesario realizar una ponderación según los siguientes criterios: A un aumento o disminución en la expresión de 10 veces en el tejido tumoral con respecto al tejido sano le otorgamos un valor de 3 ó -3 respectivamente. A un incremento o disminución en la expresión de entre 3 y 10 veces se le asignó un valor de 2 ó -2, según el caso, mientras que a cambios pequeños de entre 1,5 y 3 veces de aumento o entre 0,5 y 0,8 veces de disminución en la expresión se les asignó un valor de 1 ó -1, respectivamente. Los cambios menores de estas magnitudes se consideraron despreciables y, en consecuencia a la ausencia de cambios del tejido tumoral frente al tejido sano se le dio el valor de 0.

De esta manera se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 40 para el MOC-Ia, donde se aprecia una caída general de la expresión de los sistemas de captación en el tejido tumoral salvo en ciertos transportadores de cationes orgánicos y de transportadores pasivos de nucleósidos. Sólo se encontró un ligero aumento de CNT2. Uno de los transportadores para los que se encontró una mayor caída en los niveles de ARNm fue NTCP, cuya expresión es dependiente del estado de diferenciación de los hepatocitos (Kullak-Ublick et al., 1996). Con respecto a la familia de genes *SLCO*, se encontró una disminución generalizada de la expresión

de todas las isoformas estudiadas. La mayor caída se registró para los genes que codifican los transportadores OATP1B3 y OATP4A1. La expresión de OATP4A1 se había estudiado previamente en cáncer de mama donde resultó ser menor que en tejido sano adyacente (Wlcek et al., 2008). Nuestros datos muestran una tendencia similar en HCC. Los niveles de expresión de dos transportadores muy importantes en la captación de fármacos por las células hepáticas: OATP1B1 y OATP1B3, también estaban disminuidos. Esta observación coincide con los resultados de otros estudios que han descrito una reducción en la expresión de OATP1B1 (Kinoshita and Miyata, 2002) y OATP1B3 (Vavricka et al., 2004) en HCC. Sin embargo, esto no es una regla general para todos los casos de HCC como se observa en la tabla 8, lo que demuestra la heterogeneidad en la biología de estos tumores y la necesidad de llevar a cabo el análisis de la firma genética de forma individualizada.

La familia *SLC22* incluye transportadores de cationes orgánicos (OCTs), aniones orgánicos (OATs) y transportadores de cationes/iones dipolares orgánicos (OCTNs) (Koepsell and Endou, 2004). La expresión de los transportadores pertenecientes a la familia *SLC22*, salvo OCT1, fue baja a nivel hepático, por lo que apenas se dispone de información en cuanto a su expresión en HCC (Anzai et al., 2006). Por ello, el ligero aumento en la expresión de los genes que codifican los transportadores OCT2, OCTN1 y OCTN2 probablemente no tiene gran trascendencia ni para la biología del tumor ni para su comportamiento frente a la terapia farmacológica. Por el contrario, la caída en la expresión de OCT1 puede ser un factor limitante en la respuesta a fármacos catiónicos, ya que este transportador está bien expresado en tejido hepático (tabla 8) y constituye un importante sistema de captación para este tipo de fármacos (Briz et al., 2002). Esta caída de expresión de OCT1 no ha sido descrita por otros autores, que, sin embargo, han encontrado una disminución drástica de los niveles de este transportador en diferentes líneas celulares (Lecureur et al., 1998).

Las familias *SLC28* y *SLC29* incluyen los transportadores concentrativos (CNTs) y equilibrativos (ENTs) de nucleósidos. De los miembros estudiados en esta familia, los que presentaron niveles más abundantes de ARNm en hígado fueron CNT1 y ENT1, mientras que CNT2, CNT3 y ENT2 se encontraron a niveles muy bajos, prácticamente indetectables (tabla 8). Por tanto, probablemente ni la disminución del nivel de expresión de CNT3, ni el ligero aumento de los niveles de ARNm que codifican los transportadores CNT2 y ENT2 tienen gran relevancia farmacológica.

Sin embargo, en el caso de CNT1, que sí se encontraba expresado en tejido hepático normal, se apreció una caída de sus niveles en HCC. Este hecho ha sido ya observado por otros autores (Zollner et al., 2005) que, además, han demostrado que la menor expresión de CNT1 en HCC se correlaciona con una menor captación de fármacos citostáticos con naturaleza de análogos nucleosídicos, como la gemcitabina.

Finalmente, la expresión del transportador de cobre CTR1 fue muy abundante a nivel de ARNm en hígado. Su expresión apenas se modificó en HCC, aunque hay que recordar que las muestras se obtuvieron con fines diagnósticos y, por lo tanto, estos pacientes en el momento de la toma de muestra no habían sido tratados con ningún agente antitumoral. Lo que quiere decir que no podemos descartar que la exposición a fármacos que son sustrato de este transportador, como los derivados de cisplatino, puedan inducir cambios en la expresión de CTR1. De hecho, en estudios "in vitro" con células en cultivo llevados a cabo en nuestro grupo de investigación se ha descrito un descenso en los niveles de CTR1 por exposición a cisplatino, lo que supondría una reducción en la entrada de estos fármacos (Monte et al., 2005).

Puesto que las líneas celulares son una herramienta común en estudios "in vitro" de distintos aspectos de la biología y farmacología de los tejidos de los que proceden se llevaron a cabo dos tipos de estudios. Por una parte se compararon los niveles de expresión de los genes de estudio en líneas celulares frente a los encontrados en tejido hepático sano y tumoral, con objeto de dilucidar a cual de los dos se parecía más su firma genética para cada MOC. Por otra parte, las células se sometieron a la presión de la incubación con cisplatino a una dosis aproximadamente igual a la IC_{50} , para poner de manifiesto la respuesta de las células supervivientes en lo que respecta a cada MOC. En cuanto a las células estudiadas, cabe destacar que la expresión de los genes de este grupo disminuyó claramente en las tres líneas celulares estudiadas si comparamos su expresión frente a tejido hepático sano (tabla 9). Esto podría interpretarse como una similitud con lo que hemos descrito anteriormente que ocurre en el tejido tumoral. Sin embargo, los niveles de la mayoría de los genes estudiados siguieron siendo muy bajos incluso cuando se calculó su expresión frente a HCC. Esto es debido a que la expresión de los genes de este MOC en las líneas celulares estudiadas es inferior incluso a la determinada en HCC.

Estos resultados son de gran importancia a la hora de elegir una u otra línea celular como modelo en estudios de farmacología antitumoral. Así, podemos decir que en lo que respecta al MOC-la ninguna de las líneas estudiadas constituye un buen modelo para estudios de transportadores de las familias *SLC10A* ni *SLCO*. No obstante, los resultados obtenidos para OCTN1 y OCTN2, transportadores de nucleósidos y CTR1 sugieren que estas líneas podrían ser útiles para el estudio de alguno de estos transportadores de forma menos generalizada (tabla 9).

Finalmente, en los estudios complementarios en los que las células se exponían a cisplatino, como fármaco de referencia, pudimos determinar cambios en la expresión génica inducidos por la presencia de dicho fármaco antitumoral. Los datos de estos experimentos se recogen en la tabla 10, donde se muestra la expresión génica de las células tratadas relativa a las células no tratadas. Para los genes de captación podemos apreciar como la exposición al cisplatino produjo un aumento generalizado, aunque ligero, de la expresión de los genes de este MOC. Este aumento fue más acusado para las líneas Alexander y HepG2 que para las células SK-Hep1. Cabe destacar la marcada elevación de la expresión de NTCP y de todos los transportadores OATPs de forma específica en las células Alexander. Se sabe que la exposición prolongada de distintas líneas celulares al cisplatino reduce la expresión del transportador de cobre CTR1, lo que sugiere que este agente citostático es capaz de regular la expresión del transportador que media, principalmente, su entrada en las células (Holzer et al., 2004; Monte et al., 2005).

En nuestros estudios, sin embargo, la incubación de las líneas celulares, Alexander, SK-Hep1 y HepG2 con cisplatino apenas tuvo efecto sobre la expresión de CTR1. Mientras en células SK-Hep1 se observó un ligero descenso de expresión, en células Alexander y HepG2 encontramos un ligero ascenso (tabla 10).

Una reducción en la expresión de estas proteínas resultaría en la mayoría de los casos en una menor acumulación del compuesto antitumoral en HCC (Zollner et al., 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los transportadores de captación también pueden estar involucrados en la resistencia antitumoral mediante mecanismos indirectos. Así, el incremento en la expresión de algunos transportadores de nutrientes en determinados tumores, iría en contra del efecto pro-apoptótico de determinados antimetabolitos antineoplásicos (Huang and Sadee, 2006). Tal es el caso del transportador *SLC7A5* que, aunque no transporta

fármacos citostáticos (razón por la cual no fue incluido en este estudio), participa en la captación de aminoácidos y aparece altamente expresado en tumores malignos (Lin et al., 2004) para cubrir, probablemente, la gran demanda energética de estas células con altas tasas de proliferación celular.

MOC-Ib

En este MOC se incluyeron genes que codifican las bombas de la familia ABC que participan en el eflujo de una gran variedad de sustancias y determinan una reducción del contenido intracelular de fármacos citostáticos (Chan et al., 2004b). También se estudiaron en este grupo otros genes que, aunque no pertenecen a la familia ABC, codifican proteínas exportadoras que pueden estar implicadas en la resistencia antitumoral, como son las proteínas de Menkes y de Wilson, que se han asociado a la exportación de cisplatino (Furukawa et al., 2008) y la proteína de resistencia al cáncer de pulmón LRP, que puede actuar como un sistema de secuestro intracelular (Slovak et al., 1995).

Como se aprecia en la tabla 11, todos los genes estudiados presentaron, al menos, un cierto nivel de expresión en hígado, aunque destacaron por ser más abundantes a nivel de ARNm los transportadores ABCA6, MRP2 y MRP3. Cuando se analizó la expresión de estos genes individuo por individuo (tabla 11) vimos que existía una gran variabilidad. Así, mientras en algunos tumores se apreciaba, al contrario de lo que cabría esperar, una caída generalizada de la expresión de las bombas de eflujo, otros presentaban un perfil de expresión génica completamente diferente mostrando una sobreexpresión de prácticamente todos los transportadores estudiados. Estas diferencias interindividuales pueden ser determinantes para la respuesta a la quimioterapia pues afecta de forma sustancial a la acumulación intracelular de fármacos, lo que probablemente es diferente en cada tumor. Esto apoya lo que ya se comentó en el apartado anterior sobre la justificación del interés de realizar este tipo de estudio de determinación de la huella genética para cada tumor.

En la figura 41 se muestra la media ponderada de los resultados obtenidos en todos los pacientes. Se observó que la expresión de los genes de este grupo no estaba aumentada en HCC, salvo en los casos de aquellos genes que codifican los transportadores MRP4 y MRP5. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, además de presentar unos niveles de expresión bajos en hígado sano, MRP4 y MRP5 no tienen una vinculación clara con la aparición de resistencia a la quimioterapia, aunque se sabe que su expresión aumenta cuando la línea celular Huh-7, derivada de HCC, se expone de forma prolongada a cisplatino (Wakamatsu et al., 2007).

Dentro de la subfamilia ABCC, las proteínas MRP2, MRP3 y MRP6 fueron, por este orden, los transportadores con mayor expresión a nivel de ARNm en el hígado (tabla 11). En el caso de MRP2 y MRP3, su expresión no aumentó, pero se mantuvo muy elevada en HCC, lo que sugiere que podrían jugar un papel importante en la refractariedad del HCC a la quimioterapia, ya que ambos transportadores comparten muchos sustratos y algunos de ellos son compuestos citostáticos (Nies and Keppler, 2007; Zollner et al., 2005). Otros estudios también han confirmado la presencia de MRP3 en HCC aunque con una elevada variabilidad interindividual, donde los niveles de MRP3 tienden más a disminuir que a aumentar (Zollner et al., 2005). Por el contrario, la expresión de MRP6, disminuyó en, prácticamente, todos los pacientes estudiados (tabla 11). Sin embargo, hay que considerar que este transportador parece tener un papel secundario en la aparición de resistencia (Belinsky et al., 2002) Otros miembros de esta familia, MRP1 y MRP7, aunque poco abundantes en hígado a nivel de ARNm (tabla 11), también mantuvieron su expresión en HCC a unos niveles muy similares a los encontrados en hígado sano. En el caso de MRP1, nuestra observación está de acuerdo con estudios previos en los se encontró que la expresión de dicho transportador apenas se modificaba en HCC (Bonin et al., 2002). Como ya se mencionó en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, ambos transportadores son capaces “in vitro” de conferir resistencia al tratamiento con diversos agentes citostáticos (Hopper-Borge et al., 2004).

La expresión de los transportadores de la subfamilia ABCA, involucrada en el transporte de lípidos y colesterol, disminuyó en tejido tumoral (figura 41), especialmente en el caso del transportador ABCA8, aunque se desconoce el papel que esta familia puede desempeñar en la aparición de resistencia a la quimioterapia antitumoral.

La proteína MDR1 ha sido objeto de numerosos estudios por ser el prototipo de proteína de resistencia a múltiples fármacos. La pobre respuesta del HCC a la quimioterapia se ha asociado a una alta expresión del gen *ABCB1* que codifica para esta proteína (Cho et al., 2000). Sin embargo, cuando se usó verapamilo como inhibidor de MDR1 en combinación con doxorubicina para el tratamiento de HCC, no se registró ninguna mejora en la respuesta (Lai et al., 1990). Los estudios que se han realizado sobre MDR1 no se centran únicamente en la determinación de sus niveles en hígado, ya sea a nivel de ARNm o de proteína, sino también en la

descripción de polimorfismos en *ABCB1* que pueden afectar a la capacidad transportadora de MDR1 (Hoffmeyer et al., 2000). Así, la identificación de polimorfismos en *ABCB1* se considera un marcador de predicción y/o detección de la recurrencia de HCC después del trasplante hepático (Wu et al., 2007). En las determinaciones que se han llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, los niveles de expresión del gen que codifica esta proteína apenas se modificaron en HCC (figura 41).

LRP es un caso particular, ya que, ni pertenece a la familia ABC, ni se trata de un transportador, sino de un componente proteico de pequeñas organelas, las nanopartículas "vaults", presentes en la célula con capacidad de secuestrar y quizás transportar distintas sustancias y conferir resistencia a la quimioterapia (Steiner et al., 2006). Nuestros resultados indican que su expresión en hígado fue relativamente baja (tabla 11) y apenas se modificó en HCC (figura 41).

Aunque tampoco pertenecen a la familia ABC, se han incluido en este grupo otros genes que podrían estar involucrados en la resistencia a la quimioterapia que aparece en HCC, como es el caso de los transportadores de cobre *ATP7A* y *ATP7B*, que codifican las proteínas de Menkes y Wilson, respectivamente. Como era de esperar, la expresión en hígado de *ATP7B* fue mayor que la determinada para *ATP7A* (tabla 11), mientras que la expresión de ambos transportadores apenas se modificó en HCC con respecto a hígado sano (figura 41).

En cuanto a las líneas celulares estudiadas, el patrón de expresión relativa apenas se modificó según refiriésemos su expresión a tejido hepático sano o a tejido tumoral (tabla 12). Cabe destacar, como ya habíamos observado en los tumores, la caída generalizada en la expresión de las proteínas de la subfamilia ABCA. También observamos una disminución en la expresión de MDR1, cuyos niveles únicamente se conservaron en la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2. Sin embargo, la expresión de la mayoría de los miembros de la subfamilia ABCC se mantuvo en las líneas celulares estudiadas, con la excepción de MRP6 y MRP2. En el caso de esta última, de nuevo HepG2 fue la única línea celular donde su expresión se mantuvo a niveles similares a los encontrados en hígado sano (tabla 12). Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que las líneas celulares Alexander y SK-Hep1 pueden ser útiles para estudiar de forma individualizada algunas de los transportadores que mantienen su expresión, mientras que las

células HepG2 parecen ser las más adecuadas para llevar a cabo estudios con los transportadores del MOC-Ib.

La exposición a distintos fármacos citostáticos durante el tratamiento del HCC puede jugar un papel clave en la expresión de los transportadores estudiados en este apartado. En los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, en los que las células se exponían a cisplatino, como modelo de fármaco antitumoral, se observó un patrón de cambios muy diferente según la línea celular estudiada. De este modo, la expresión de los genes estudiados en este MOC en la línea celular SK-Hep1, apenas se modificó por tratamiento con cisplatino, mientras que para las células Alexander y HepG2 se apreció una ligera sobreexpresión de genes clave en la aparición de resistencia, como MDR1 en el caso de las células Alexander y LRP en las HepG2 (tabla 13). En cuanto a la expresión de las proteínas de Menkes y de Wilson hay que mencionar que, aunque en este estudio no se apreció efecto alguno por tratamiento con cisplatino, otros autores han demostrado que la exposición continuada a cisplatino puede inducir una sobreexpresión de *ATP7B* tanto en líneas celulares como en tumores (Ohbu et al., 2003). En estudios previos de nuestro grupo, también habíamos observado un aumento de expresión de las proteínas de Menkes y de Wilson tras exposición al cisplatino (Monte et al., 2005), si bien se trataba de líneas celulares de carcinoma de colon y la exposición era mucho más prolongada que la llevada a cabo en este trabajo.

4.4.3. Estudio de la implicación de otros mecanismos en la resistencia a la quimioterapia antitumoral en carcinoma hepatocelular

Como hemos visto en el apartado anterior, la concentración del fármaco que se alcanza dentro de la célula, determinada a su vez por el balance captación/eflujo, constituye un punto clave en la posible eficacia de la terapia antitumoral. Existen, sin embargo otros factores que condicionan la actividad de los distintos fármacos utilizados en el tratamiento del HCC:

- 1-. Inactivación del fármaco dentro de la célula tumoral o reducción en la tasa de activación de profármacos (MOC-II)
- 2-. Cambios en la expresión de moléculas diana (MOC-III)
- 3-. Factores que afectan a la reparación del ADN (MOC-IV)
- 4-. Desregulación de los mecanismos proapoptóticos/antiapoptóticos (MOC-V)

MOC-II

En el MOC-II se estudiaron los genes relacionados con la expresión de enzimas que determinan el metabolismo intracelular. Algunas de estas enzimas son claves en la detoxificación de fármacos, como las diferentes isoformas del citocromo P o de la glutatión S-transferasa (GST). Otras, sin embargo, participan en reacciones necesarias para que un profármaco pase de su forma inactiva a su estado farmacológicamente activo. Este es el caso, por ejemplo, de las subunidades 1 y 2 de la enzima uridina fosforilasa (UPP1 y UPP2), estudiadas en este grupo, que participan en la biotransformación de 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) en su forma activa, 5-fluorouracilo (5-FU).

Debido a que el hígado es el principal órgano implicado en la función detoxificante de xenobióticos y sustancias endógenas, la expresión de muchos de los genes de este grupo fue muy alta, tal y como se aprecia en la tabla 14 como valores de ΔCt muy bajos. En el tejido hepático sano los ARNm más abundantes fueron los de hCE1, CYP3A4 y GSTa1.

Al analizar la expresión de estos genes en tejido tumoral individuo por individuo vimos que, a diferencia de los resultados obtenidos para los MOCs Ia y Ib, descritos anteriormente, el patrón de expresión para los genes del MOC-II en los distintos tumores estudiados fue bastante homogéneo. Aún así, de los 11 tumores analizados, 2 de ellos presentaron un patrón de expresión diferente, lo que reafirma la justificación de llevar a cabo este tipo de estudios de forma individualizada. La expresión de todos los genes de este grupo disminuyó de forma generalizada en HCC (figura 42). Nos llamó especialmente la atención, por su papel en los procesos de detoxificación de fase I y por ser muy homogénea en todos los pacientes, la disminución que tuvo lugar en la expresión de los genes que codifican el citocromo P. Estos resultados confirman los datos parciales previamente obtenidos por otros grupos, que habían descrito un descenso de los niveles de expresión de CYP3A4 en HCC (Haas et al., 2009). Hay que tener en cuenta, no obstante, que la actividad de las enzimas del citocromo P, no sólo está determinada por sus niveles de expresión sino también por la existencia de polimorfismos que pueden influir considerablemente en la actividad enzimática y marcar grandes diferencias interindividuales (Smith et al., 1994). Este es el caso de las isoformas CYP1A1 y CYP1A2, de las que no existen estudios acerca de su expresión en HCC, aunque se sabe que existen variantes genéticas de las mismas que aumentan el riesgo de desarrollar este tipo de tumor (Li et al., 2009). Por otra parte, diversos estudios han confirmado la participación de las isoformas CYP1A2 y CYP3A4 en la biotransformación de aflatoxinas en agentes potencialmente tóxicos relacionados con la aparición de HCC (Mace et al., 1997).

La familia de las glutation S-transferasa (GST) engloba enzimas detoxificantes de fase II. Se clasifican en siete subfamilias que se diferencian en su secuencia y papel fisiológico. De todas ellas, la isoforma GSTa fue la más abundante a nivel hepático, tal y como se muestra en la tabla 14, con una expresión mucho mayor que la otra isoforma estudiada en este grupo, la GSTp. Sin embargo, varios estudios han sugerido que esta relación se invierte en HCC, ya que GSTp aumentaría su expresión, mientras que los niveles de GST1a serían menores en este tumor (Howie et al., 1990). Esta hipótesis es cierta, al menos en modelos experimentales de HCC (Monte et al., 2000). Sin embargo, en clínica humana esto no parece ser una regla general. Tal y como se aprecia en la figura 42, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión tanto de GST1a, como de GSTp disminuyeron en los HCC analizados. Se sabe que los niveles de GSTp son

mayores en tejido fetal que en tejido hepático adulto (Niu and Wang, 2005), por tanto, una sobreexpresión de este gen en neoplasias se interpreta como parte del proceso de pérdida de diferenciación de las células tumorales, lo que constituye la base de la utilización de GSTp como marcador tumoral. Sin embargo, aunque distintos trabajos han confirmado la utilidad de GSTp como marcador de tumores extrahepáticos (Moscow et al., 1989; Tsuchida and Sato, 1992), no se ha demostrado que la expresión de GSTp en HCC frente a tejido hepático sano aumente de forma consistente en clínica humana (Zhou et al., 1997).

La dihidropirimidina deshidrogenada (DHPDH) y las subunidades 1 y 2 de la enzima uridina fosforilasa (UP1 y UP2) están implicadas en el metabolismo de nucleótidos y desarrollan un papel clave en las reacciones de biotransformación de profármacos en su forma activa. Tal y como se muestra en la figura 42, su expresión disminuyó en HCC. Esta observación es de gran importancia en lo que se refiere a la pérdida de sensibilidad a la quimioterapia, ya que la concentración de fármaco activo sería menor cuando la expresión de los genes que codifican estas enzimas se encuentra disminuida, tal y como han demostrado diversos trabajos previos en los que se estudió la sensibilidad a 5-FU (Ishitsuka et al., 1980; Peters et al., 1986).

En cuanto a las líneas celulares estudiadas, no se observaron diferencias en el patrón de expresión relativa según refiriésemos su expresión a tejido hepático sano o tumoral (tabla 15). La expresión de la mayoría de los genes estudiados en este grupo fue muy baja en todas las líneas celulares estudiadas, aunque especialmente en el caso de las células HepG2. Esto indica que, aunque su utilización está muy extendida, estas células no parecen ser apropiadas para llevar a cabo estudios en los que estén involucradas las enzimas de este grupo. En el caso de las células SK-Hep1 y Alexander se apreció un aumento en los niveles de GSTp, cuya magnitud fue más importante en el caso de las células Alexander, y un mantenimiento, e incluso en determinados casos aumento, en los niveles de timidina fosforilasa (TP) y uridina fosforilasa (UP1), implicadas en la activación de profármacos.

Por último, el tratamiento con cisplatino indujo, en el caso de este MOC, importantes cambios en la expresión génica, tal y como se muestra en la tabla 16. Se observó, como era de esperar, una sobreexpresión de los genes que codifican el citocromo P en respuesta al tratamiento con un agente tóxico como el cisplatino en todas las líneas celulares estudiadas. La respuesta de estas enzimas al tratamiento

con distintos agentes farmacológicos, no sólo citostáticos, como el paracetamol, es ampliamente conocida (Kim et al., 2009). Fueron llamativos los resultados obtenidos para las células HepG2, ya que, para esta línea celular, el tratamiento con cisplatino indujo un aumento en la expresión de, prácticamente, todos los genes estudiados.

MOC-III

Pertencen a este MOC los genes que codifican dianas moleculares de fármacos citostáticos. Esta familia de genes es la más heterogénea de las cinco en las que hemos clasificado a los genes implicados en mecanismos de quimiorresistencia, ya que los fármacos citostáticos pueden actuar sobre dianas celulares muy diversas que incluyen receptores de membrana o intracelulares, enzimas, estructuras intracelulares relacionadas con la replicación del ADN y la división celular, componentes de las membranas celulares y otros.

La expresión de estos genes en tejido hepático sano, según se muestra en la tabla 17, fue alta en el caso de los genes que codifican la dihidrofolatoreductasa (DHFR), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA), topoisomerasa I (TOPO-I) y timidilato sintasa (TS), mientras que para el resto de miembros de este MOC, la expresión en hígado sano fue moderada.

Al analizar los datos de expresión en tejido tumoral (tabla 17), vimos que la expresión de la mayoría de los genes estudiados presentó una marcada variabilidad interindividual, salvo en los casos de TOPO-II y PDGFRA, para los que se observó en prácticamente todos los tumores estudiados, un aumento y una disminución, respectivamente. En la figura 43, donde se muestra la media ponderada de todos los resultados obtenidos, se confirmó el aumento de expresión estadísticamente significativo del gen que codifica la TOPO-II. Esta enzima, actúa sobre el ADN, modificando su estado conformacional, relajando su estructura y facilitando así su replicación. Su papel clave en los procesos de proliferación celular hace de la TOPO-II una diana molecular de fármacos citostáticos como la daunorrubicina y la doxorubicina. El aumento en la expresión de TOPO-II puede compensar el efecto de estos fármacos y contribuir a la falta de sensibilidad a estos compuestos. En la serie de muestras de HCC analizadas en este estudio, la sobreexpresión de TOPO-II destacó no sólo por la magnitud del fenómeno sino también, como ya hemos comentado, por lo repetitivo del hallazgo. Estos resultados coinciden con estudios previos de otros autores en los que la sobreexpresión de este gen en HCC se asocia a una mayor agresividad del tumor (Watanuki et al., 2002). Con respecto a TOPO-I, su expresión apenas se modificó, e incluso, disminuyó ligeramente en HCC. La expresión y funcionalidad de ambos tipos enzimáticos parece estar coordinada, ya que se sabe que cuando una de ellas disminuye, la expresión de la

otra aumenta como mecanismo de compensación. Además otros autores han demostrado que el pretratamiento con inhibidores de TOPO-I, como el irinotecán y derivados, incrementa la sensibilidad de TOPO-II a doxorubicina (Kim et al., 1992).

Otro hecho destacable en este MOC fue la caída en la expresión de los genes que codifican para los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA) y del factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGFR) (figura 43). Diversos estudios han confirmado su implicación en la aparición y desarrollo del HCC (Marijon et al., 2009; Oseini and Roberts, 2009), ya que ambos receptores juegan un papel importante en la angiogénesis y en el mantenimiento de un entorno favorable para el crecimiento tumoral. Esto justifica el que estos receptores constituyan las dianas de las terapias vectorizadas basadas en inhibidores de tirosina-kinasas, como el imatinib y el sorafenib. Al contrario que los resultados obtenidos en este trabajo, otros autores han encontrado una sobreexpresión de PDGFRA a nivel de ARNm en un 70% de los pacientes estudiados (Stock et al., 2007), lo que probablemente se deba a la existencia de la variabilidad interindividual en la expresión de estos genes. De hecho, esta heterogeneidad se observó incluso dentro de la serie incluida en este estudio, como se aprecia en la tabla 17, para VEGFR, que estaba aumentado en algún paciente. Sin embargo, la tendencia a la bajada de expresión de PDGFRA fue más consistente.

Finalmente, la expresión del receptor de estrógenos tipo 2 (ESR2), que fue baja en hígado sano, disminuyó aún más en HCC. Esta observación confirma los resultados descritos por otros autores que llevaron a cabo estudios a nivel de proteína mediante western blot (Ohnishi et al., 1986).

Por otra parte, en las líneas celulares estudiadas, los niveles de expresión correspondientes a los genes que conforman este MOC fueron muy bajos, salvo en los casos de ESR2 y TOPO-II (tabla 18). El patrón de expresión encontrado en estas células apenas se modificó según los niveles se refiriesen a hígado sano o tejido tumoral, con la excepción del gen que codifica la enzima TOPO-II. En este caso en particular, la expresión se asemejó más al tejido tumoral que al sano, debido a que el aumento, comentado anteriormente, de los niveles de ARNm de este gen en tumores fue similar a la sobreexpresión de TOPO-II observada en las líneas celulares de origen hepático, lo que está de acuerdo con lo descrito, en este sentido, por otros autores (Wong et al., 2009). Un hallazgo interesante fue la

elevada expresión del gen ESR2 en las líneas celulares Alexander y HepG2, pero no en las SK-Hep1. La magnitud del aumento fue marcadamente superior en el caso de las células HepG2, donde la expresión llegó a ser más de 1000 y 20000 veces mayor que la encontrada en tejido hepático sano y tumoral, respectivamente. Los resultados de expresión en células obtenidos hasta el momento indican que las dos líneas celulares derivadas de HCC parecen un buen modelo de tejido tumoral para el estudio de algunos genes incluidos en este MOC, como TOPO-I (Alexander y SK-Hep1), DHFR (Alexander) y PDGFRA (Alexander).

Finalmente, cuando las células se expusieron a cisplatino como fármaco citostático de referencia, apenas se observaron cambios en la expresión de los genes estudiados en este MOC (tabla 19). Sólo las células Alexander dieron un patrón de respuesta moderada con incrementos de expresión en 5 de los 8 genes de este MOC. Se observó un ligero aumento en la expresión de KIT y VEGFR en el caso de las células Alexander y de los genes DHFR y TOPO-I en las células HepG2. En las SK-Hep1, el cisplatino indujo una disminución en la expresión de prácticamente todos los genes, salvo de ESR2 que aumentó más de 26 veces su expresión con respecto a las células no tratadas. No existen estudios que apoyen la conexión entre la exposición al cisplatino y el aumento en la expresión del receptor de estrógenos, aunque sí que se ha demostrado que el tratamiento de forma prolongada con tamoxifeno, otro fármaco citostático, induce una clara sobreexpresión de ESR2 en estudios "in vitro" (Speirs et al., 1999)

MOC-IV

En este grupo se estudiaron los genes que codifican factores que afectan a la reparación del ADN y que se han vinculado con la resistencia a la quimioterapia mediada por fármacos genotóxicos. Como ya se comentó en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, los compuestos que inducen daño en el ADN, y que presentan un efecto más pronunciado durante los procesos de replicación del material genético constituyen una de las alternativas terapéuticas en el tratamiento del cáncer. La resistencia a este tipo de fármacos parece estar mediada por un incremento en la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales (Lage and Popek, 1993).

En nuestro estudio, la UDG (uracilo ADN glicosilasa), enzima implicada en la prevención de mutaciones mediante la eliminación de uracilo, se encontró muy expresada en hígado sano (tabla 20). Sin embargo, el resto de genes que incluimos en el MOC-IV estaban sólo moderadamente expresados en tejido hepático sano (tabla 20). Los cambios en la expresión de los genes de este grupo en tejido tumoral fueron poco relevantes, tal y como se muestra en la tabla 20, con un predominio de los colores que indican aumentos o caídas mínimas de la expresión.

En la figura 44, donde se representa la media ponderada de los cambios de expresión para todos los tumores, se apreció un ligero aumento en la expresión de los genes que codifican DUT y MSH2. La primera es una enzima que participa en la corrección de los errores de incorporación de dUMP en el ADN, mientras que MSH2 es un miembro de la familia de genes de reparación de errores de emparejamiento. La sobreexpresión de ambos genes en HCC ya se había descrito y se propone que dicho aumento de expresión se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad (Takatori et al., 2009; Wani et al., 2001). Por otra parte, la expresión media de ERCC1 y de GADD45 disminuyó en HCC (figura 44). Este hallazgo no coincide con los resultados de otros estudios en los que se determinó que la expresión de ambos genes estaba aumentada a nivel de ARNm en HCC (Fautrel et al., 2005; Gramantieri et al., 2005). La heterogeneidad de la firma genética de cada tumor es probablemente la causa de esta aparente discrepancia, porque, de hecho en nuestra serie hay tumores en los que la expresión de estos genes estaba aumentada.

El perfil de expresión de los genes de este grupo en las líneas celulares estudiadas fue diferente de unas a otras. En las células SK-Hep1 encontramos el patrón de expresión más parecido tanto al tejido sano como al HCC, mientras que en las células Alexander había una tendencia a la sobreexpresión en la mayoría de los genes. Las HepG2 mostraron un patrón mixto con incrementos y descensos de expresión (tabla 21). Una característica común a los tres tipos de células fue el descenso de expresión de UDG. En base a estos resultados podemos proponer que las células SK-Hep1 constituyen un buen modelo para el estudio de la mayoría de estos genes “in vitro”.

Diversos trabajos previos han mostrado que el tratamiento prolongado con cisplatino puede inducir la expresión de muchos de los genes de este grupo (Delmastro et al., 1997; Ding et al., 2009; Fink et al., 1998; Melton et al., 1998). Sin embargo, en los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, la exposición a cisplatino apenas indujo cambios en la expresión génica en las líneas celulares Alexander y SK-Hep1. La discrepancia en cuanto a los resultados obtenidos por tratamiento con cisplatino pueden deberse a que, tanto la dosis como el tiempo de exposición al agente antitumoral fueron menores en nuestros estudios que en los anteriormente citados. Sin embargo, las células HepG2 fueron muy sensibles a la exposición a este fármaco, que provocó un aumento generalizado de la expresión de los genes que conforman este grupo (tabla 22).

MOC-V

En este MOC se incluyeron los genes que determinan el balance entre supervivencia y apoptosis. Hay que tener en cuenta que determinados fármacos antitumorales, como el cisplatino, la citarabina, el etopósido y la doxorubicina, entre otros, actúan, en parte, induciendo la apoptosis en las células tumorales (Ormerod et al., 1996). Por tanto, cambios en los mecanismos que controlan la supervivencia y la entrada de la célula en apoptosis se traducen, generalmente, en un incremento de la resistencia a estos fármacos (Bunz, 2001; Segal-Bendirdjian and Jacquemin-Sablon, 1995).

Tal y como se muestra en la tabla 23, los niveles de expresión de los miembros de este grupo en tejido hepático sano fueron muy variables. Concretamente, los mayores niveles se encontraron para los genes que codifican para la metadherina (MTDH), la isoforma larga del factor anti-apoptotico (Bcl-X), la serina-treonina cinasa (AKT1) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El resto de los genes estudiados en este MOC presentaron valores de expresión moderados, salvo los genes que codifican las proteínas livina alfa y survivina, que fueron los menos abundantes en hígado sano.

En la figura 45 se representan los valores de la media de expresión ponderada de todos los tumores incluidos en esta serie. Se observó una ligera sobreexpresión de MTDH, lo que está de acuerdo con trabajos previos que han demostrado que este oncogén se encuentra, generalmente, más expresado en HCC, lo que constituye un signo de mal pronóstico, ya que altos niveles de MTDH se asocian con una mayor capacidad invasiva del tumor (Yoo et al., 2009).

Por otra parte, la expresión de survivina, un miembro de la familia de inhibidores de apoptosis, aumentó de forma estadísticamente significativa en HCC (figura 45). La sobreexpresión de este gen llamó la atención, no sólo por la magnitud del cambio, sino por lo repetitivo del hallazgo, ya que, como se muestra en la tabla 23, los niveles de survivina se incrementaron en, prácticamente, todos los tumores analizados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en los que ya se demostró una clara sobreexpresión de este gen en HCC (Peroukides et al.). De hecho, el aumento en los niveles de survivina se correlaciona con una mayor capacidad proliferativa del tumor (Augello et al., 2009).

La familia de inhibidores de apoptosis, cuyos miembros se caracterizan por tener en común un dominio de repetición IAP de baculovirus (LaCasse et al., 2008), no siguió un patrón de cambios homogéneo, ya que algunos genes pertenecientes a este grupo se sobreexpresaron, como el caso ya comentado de survivina y, aunque en menor medida, XIAP, mientras que otros mostraron unos niveles de ARNm menores en HCC que en tejido hepático sano, como IAP-1, IAP-2, NAIP y livina-alfa (figura 45). Aunque no pertenece a esta familia, el gen Smac se encuentra estrechamente relacionado con ella, ya que codifica para una proteína mitocondrial que, cuando es liberada al citosol, bloquea la acción de estos inhibidores de apoptosis. Nuestros resultados indicaron que la expresión media de Smac apenas se modificó en HCC respecto a tejido hepático sano, lo que no coincide con estudios previos que encontraron que los niveles de este gen estaban reducidos en tumor (Bao et al., 2006). Como en situaciones similares ya discutidas con anterioridad, esta discrepancia en los resultados puede deberse a la variabilidad interindividual en lo que se refiere a la expresión de este gen. De hecho, en algunos de los tumores analizados en este trabajo se vio que la expresión de Smac sí se encontraba disminuida.

Como ya se comentó en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, p53 constituye un factor clave en la inducción de apoptosis en respuesta a la radioterapia y a la quimioterapia. Esta proteína supresora de tumores controla la expresión del gen que codifica p21, el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A), capaz de bloquear el ciclo celular en respuesta a daños en el ADN (Vogelstein et al., 2000). En la figura 45, se muestra como la expresión de ambos genes, es decir, p53 y CDKN1A, se encontró disminuida en HCC. Este hallazgo no concuerda con otros trabajos, en los que los niveles de p53 en HCC aparecían aumentados (Fautrel et al., 2005). En la actualidad, se cree que los niveles de p53 no se correlacionan con el nivel de actividad. Por el contrario, en muchos casos la presencia de mutaciones inactivantes desencadena la sobreexpresión de p53, sin que ello suponga que se recupere la función. De hecho, se sabe que en un 50% de los tumores, de cualquier tipo y localización, aparecen mutaciones en p53 que se traducen en una inactivación de la proteína (Fan et al., 2007). Concretamente, la mutación R248Q, de frecuente aparición en HCC, se traduce en un incremento de la resistencia a doxorubicina y paclitaxel (Chan and Lung, 2004).

Por otra parte, Fas es una proteína de superficie con un dominio de muerte celular conservado que, por unión a su ligando (Fas-L o Apo-1), desencadena la vía extrínseca de la apoptosis. La expresión de Fas disminuyó de forma estadísticamente significativa en HCC, tal y como se aprecia en la figura 45. Una disminución en la expresión de Fas se asocia a un peor pronóstico, no sólo de HCC, sino también de otras patologías tumorales, ya que las células se hacen menos sensibles a la activación de la apoptosis por Fas-L (Osaki et al., 2001; van der Woude et al., 2003).

Del análisis de los resultados de la tabla 24 se deduce que la expresión de los genes de este grupo en distintas líneas celulares hepáticas muestra similitudes y diferencias puntuales con los niveles de expresión que habíamos encontrado en hígado sano y en tejido tumoral. Es destacable el caso de la survivina, cuya expresión resultó ser más parecida al tejido tumoral que al sano, debido a que el aumento, comentado previamente, de los niveles de ARNm de este gen en tumores fue similar a la sobreexpresión de survivina en las células estudiadas. También se observó que la expresión de otro miembro de la familia de inhibidores de apoptosis, livina-alfa, estaba considerablemente elevada en la línea celular Alexander. Esta característica no era compartida por las líneas celulares HepG2 o SK-Hep1, en las que se encontró para este gen un ligero aumento y una dramática caída de la expresión, respectivamente. Además, como ya se ha descrito previamente por otros autores (Fan et al., 2007), la expresión del gen que codifica la proteína anti-apoptótica Bcl-2 estaba aumentada en la línea celular HepG2. Sin embargo, la expresión de Bcl-2 en células Alexander y SK-Hep1 era menor que en tejido hepático sano o tumoral tabla 24.

Finalmente, aparte de los ya comentados aumentos de expresión para genes puntuales, los niveles de otros muchos genes de este grupo se encontraron disminuidos en las líneas celulares estudiadas. Tal era el caso de c-FLIP, Fas, NAIP, NF- κ B y RPL6, cuya expresión en las células Alexander, SK-Hep1 y HepG2 era muy baja. Por todo ello, si se quiere utilizar a estas líneas celulares como modelos de estudio del balance entre supervivencia y apoptosis hay que tener en cuenta que su utilidad está condicionada por el papel de los genes, que de forma individualizada, se expresen o no en cada tipo celular.

El tratamiento de las células con cisplatino, indujo, como era esperable, bastantes cambios en la expresión de los genes que determinan el balance entre la apoptosis y la supervivencia celular (tabla 25). Los cambios de expresión génica por exposición al cisplatino fueron más acusados en las células HepG2 que resultaron ser, para éste y otros MOCs descritos anteriormente, las más sensibles al tratamiento con este agente antitumoral. La expresión del gen que codifica la proteína anti-apoptótica Bcl-2 disminuyó claramente en las células tratadas con cisplatino, efecto que fue más acusado en las células HepG2. Por otra parte, la expresión del receptor de Fas, implicado en la activación de la apoptosis, aumentó claramente en las células tratadas con cisplatino, al igual que el gen p21, que codifica la proteína CDKN1A (tabla 25). Los resultados relativos a los cambios de expresión génica inducidos por el cisplatino están de acuerdo con la idea de que el tratamiento con este fármaco hace que las células respondan al efecto tóxico inducido por el agente antitumoral desencadenando mecanismos de activación de la apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Konstantakou et al., 2009; Qin and Ng, 2001; Tam et al., 2009).

CONCLUSIÓN PRIMERA:

Los niveles de expresión de los transportadores de aniones orgánicos OATP1B1 y OATP1B3 en hígado humano sano son muy elevados, siendo el ARNm de OATP1B1 cinco veces más abundante que el de OATP1B3, lo que apoya el concepto de que ambas proteínas, aunque con probable predominancia de OATP1B1, juegan un papel importante en la captación de compuestos orgánicos a través de la membrana basolateral del hepatocito.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

Utilizando dos modelos diferentes de expresión heteróloga de OATP1B3, como son la inyección en oocitos de rana *Xenopus laevis* del ARNm correspondiente a esta proteína y la utilización de células CHO establemente transfectadas con OATP1B3, se ha demostrado la capacidad de este transportador de mediar, tanto la captación, como la exportación, de ácidos biliares mayoritarios y sus derivados como la colilglicilamido fluoresceína.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La expresión de las isoformas OATP1B1 y OATP1B3 no se ve marcadamente disminuida en diversas enfermedades hepáticas que cursan con un cierto grado de colestasis, por lo que, gracias a sus características de transportador reversible, estas proteínas pueden constituir una ruta de excreción alternativa de aniones orgánicos de vuelta a la sangre útil para proteger a los hepatocitos cuando el tráfico normal de sustancias a bilis se encuentra impedido.

CONCLUSIÓN CUARTA:

Los transportadores OATP1B1 y OATP1B3 son electrogénicos y su actividad puede verse marcadamente afectada por el pH local. Esto puede determinar la eficacia en la captación de fármacos en tejidos sanos (por ejemplo, tracto gastrointestinal, pulmón y riñón) y patológicos (regiones próximas a tumores o focos de inflamación) donde el pH extracelular se desplaza de sus valores normales, es decir entre 7,2 y 7,4, hacia valores más ácidos

CONCLUSIÓN QUINTA:

Los derivados sulfatados de progesterona a concentraciones que se alcanzan de forma fisiológica durante la gestación, pero que se encuentran elevados en la hipercolanemia asintomática de la embarazada y en la colestasis gravídica, causan

una inhibición de la captación de ácidos biliares por los hepatocitos que puede estar implicada en la etiopatogenia de estas alteraciones.

CONCLUSIÓN SEXTA:

El mecanismo fundamental de esta inhibición es un proceso competitivo del transportador NTCP, principal responsable de la captación de ácidos biliares pero que también es capaz de transportar metabolitos sulfatados de progesterona. La fracción de la captación de ácidos biliares mediada por OATPs también se vé inhibida, aunque a un nivel mucho menor, por los derivados sulfatados de progesterona.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA:

Utilizando Taqman Low Density Arrays o TLDA, basadas en la realización de PCR cuantitativa a tiempo real en tarjetas microfluídicas precargadas con los reactivos necesarios para la determinación específica del nivel de ARNm de un número elevado de genes, se ha puesto a punto y validado una herramienta fácil de utilizar y automatizable para la detección de cambios de expresión de genes implicados en los mecanismos de quimiorresistencia en tumores hepáticos, cuya utilidad se ha evaluado en un estudio piloto retrospectivo.

CONCLUSIÓN OCTAVA:

La utilización de las TLDA desarrolladas en esta Tesis Doctoral, en la caracterización de los patrones de expresión de genes de quimiorresistencia en líneas celulares utilizadas comúnmente en investigación por varios laboratorios y obtenidas a partir de carcinoma hepatocelular, como las células Alexander y SK-Hep1 o hepatoblastoma como las células HepG2, reveló una marcada falta de similitud con el tejido hepático sano y con el tejido hepático tumoral. De ello se desprende la utilidad de este análisis, antes de iniciar cualquier tipo de estudio in vitro, para seleccionar adecuadamente el tipo celular que se desea utilizar como modelo experimental, en función de la permanencia o desaparición de la expresión de genes implicados en la función o proteína objeto de la investigación.

CONCLUSIÓN NOVENA:

El análisis de la huella genética referida a sus características de resistencia a la quimioterapia de 11 hepatocarcinomas reveló ciertas tendencias comunes junto con una marcada variabilidad interindividual lo que, por una parte, indica el valor de

estos estudios en la búsqueda de nuevas dianas moleculares en la lucha contra el cáncer hepático y, por otra, justifica la necesidad de realizar estas determinaciones de forma individualizada para cada tumor si se quieren usar como elemento de decisión a la hora de descartar o elegir un determinado régimen quimioterapéutico.

BACKGROUND

As commented above, one of the main problems in the treatment of cancer, including liver cancer, is the lack of response to chemotherapy. Sometimes, tumours develop resistance during the pharmacological treatment, whereas in many other occasions, chemoresistance is present before the treatment. Thus, the failure of using standard treatments instead of more individually adjusted regimes is due in part to the poor knowledge on the mechanisms of chemoresistance as well as to the absence of appropriate efficient tools to predict this characteristic in each tumour. New efforts to overcome this problem, such as a correct identification of the mechanisms that determine the lack of response to each kind of antitumour drugs and the determination of the genetic profile for each tumour before initiating the treatment, are needed.

In a recent study carried out by our research group, the genes involved in the different mechanisms of chemoresistance (MOC) in liver and gastrointestinal tumours were identified and classified into five different groups (1). Measurement of the expression levels of the genes included in each type of MOC could be used to develop a novel test to predict the activity of MOCs. This might be useful to prevent the failure of the treatments based on anticancer agents, which, in addition of having important side effects, could favour the selection of the most resistant cells.

Some of the genes included in these MOCs have been previously used as classical tumour markers with usefulness in the diagnosis, prognosis and follow-up of the antitumour treatment. Its determination includes enzymatic analysis and other techniques to detect the presence of proteins in serum and tissues. However, the use of proteins in clinic with the aim proposed here would be confronted to several important challenges, such as the relatively high amount of tissue required for these determinations. Moreover, these markers are generally detected by immunohistochemistry, for which is necessary to analyse several sections of tissues to accurately identify and compare the expression levels in tumour and healthy tissue. In addition, this method only provides semi-quantitative results, and consequently, its use can present some difficulties when making clinical decisions.

In order to overcome the inconveniences derived from the use of proteins as tumour markers, one of the most promising alternatives is the use of gene expression

analyses, which generally involves the use of microarrays and quantitative RT-PCR for its identification and validation, respectively (2). The quantitative nature of gene expression determinations allow establishing standard values to be used as threshold in the expression levels of the tumour marker. Moreover, the evaluation of biological markers based on gene expression requires, in general, a low amount of tissue from each biopsy. Thus, advances in methods for mRNA amplification have made possible measuring gene expression in samples containing as few as 10 cells (3).

For the evaluation of gene profiles, microarrays present the drawback of being very expensive and difficult to interpret, whereas real-time quantitative RT-PCR permits to carry out a more detailed study than microarrays, with a simpler interpretation of the results. However, single RT-PCR has the disadvantage of being a low-throughput method.

Taking into account this background, the aim of this part of the Thesis was to develop a high-throughput method whose information, although more limited than that obtained by means of microarrays, was easy and fast to interpret for its use in clinic.

To do so, we decided to use micro fluidic cards or TLDA (‘‘Taqman Low Density Arrays’’), which constitute a modified version of real-time RT-PCR, where all the components required to carry out the reactions are contained in individualized 384 wells. This system enables the design of custom-made plates depending on the needs of the study, in addition to be a sensible, reliable, more cost-reducing and very fast method.

RESULTS AND DISCUSSION

After carrying out a bibliographic study in depth, we selected 135 genes as potential candidates to predict the appearance of resistance in liver tumours. Selection criteria were based on the previously described results in hepatocellular carcinoma (HCC). The preliminary individual analysis of the expression levels of these genes in few samples of HCC, by conventional PCR, permitted us to elucidate the presence or absence of detectable levels of these 135 genes (data not shown) and accordingly to select 95 of them for the final design of the TLDA. By using TLDA,

mRNA gene expression levels were assayed in matched-pair samples of liver cancer and surrounding healthy tissue. Gene expression levels were also determined in three different cell lines derived from HCC and hepatoblastoma, frequently used as “in vitro” models, which were treated or not with cisplatin at IC₅₀ concentrations for 72 hours.

The results of this study have been organized into MOCs and will be commented below.

MOC-I group includes genes responsible for the reduction in drug content within the cells, which, as we have commented above, could be due to a decrease in the uptake of the drug (MOC-Ia) or the activation of its efflux from the cell (MOC-Ib)

MOC-Ia

Genes included in this MOC belong to SLC superfamily, consisting of more than 300 members that mediate the uptake of a large variety of substrates, from inorganic ions to organic cations, anions or neutral compounds. Moreover, these carriers are able to transport antitumour drugs with structural similitude with endogenous substrates (4).

First of all, it is interesting to study the expression levels of the genes of each MOC in healthy liver tissue, which permits to know how important the changes in the expression level for a particular gene in tumour tissue are. Values of expression levels in healthy liver tissue are shown in Table 1 as Δ Ct versus house-keeping genes (GAPDH and beta-actin). It should be taken into account that higher Δ Ct values indicate lower expression levels. Thus, as shown in Table 1, many members of the MOC-Ia group were found highly expressed in healthy human liver (dark green cells). The highest expression levels were found for NTCP, organic anions transporters OATPs and organic cation (OCT1), some isoforms of nucleoside transporters, such as CNT1 and ENT1, and copper transporter CTR1. The relative expression of genes belonging to MOC-Ia in HCC versus healthy liver tissue is also shown in Table 1, where each value is given accompanied with the corresponding colour according to the scale of abundance shown at the right side of Table 1. In addition to the individual data presented in this Table, average expression values for each gene among all tumours and healthy tissues assayed are shown in Figure 1.

This way of result presentation permits to observe, not only the heterogeneity of the genetic signatures among different tumours, but also the existence of some trends toward up-regulation or down-regulation. To calculate the average of expression levels it was necessary to normalize the results, as otherwise an excessive over-expression in a particular tumour would markedly affect the final result. The arbitrary criteria used here were as follows: To a 10-fold increase or decrease in the expression in HCC versus healthy liver tissue, values of 3 or -3, respectively, were given. To an increase in the expression in HCC versus healthy liver tissue of 3 to 10-fold or a decrease between 0.1 and 0.5, values of 2 or -2 were assigned, respectively. For changes (increase or decrease) between 1.5 and 3-fold or 0.5 and 0.8, values of 1 or -1 were used, respectively. When changes were lower than 1.5 (up-regulation) or higher than 0.8 (down-regulation) relative expression was considered unchanged and value of 0 was assigned.

Following these criteria, average results of gene expression for MOC-Ia were obtained, as shown in Figure 1. For this group of genes involved in the uptake process, a general fall in the expression was observed except for the cases of several OCTs and equilibrative nucleoside transporters. A moderate over-expression was only observed for CNT2. One of the carriers for which a marked decrease in mRNA level was found was NTCP, whose expression is known to be dependent upon the degree of differentiation in parenchymal liver cells (5). Regarding the *SLCO* family, we found a generalized decrease on the expression of all the isoforms studied here. The most dramatic down-regulation was observed for genes encoding OATP1B3 and OATP4A1. OATP4A1 expression had been previously reported to be reduced in breast cancer as compared to that observed in healthy surrounding tissue (6). Our data provide evidences of a similar tendency in HCC. The levels of expression of two important carriers involved in the uptake of drugs by liver cells, OATP1B1 and OATP1B3, were also diminished. This observation agrees with results from previous studies that had described a reduction in the expression of OATP1B1 (7) and OATP1B3 (8) in HCC. However, this is not a general rule for all HCC cases as is clearly shown in Table 1. This and several other examples that will be described below support the concept of the existence of a marked heterogeneity in the biology of these tumours, which justifies the need to carry out the analysis of the genetic signature individually.

The *SLC22* family includes OCTs, organic anion transporters (OATs) and organic zwitterion/cation transporters (OCTNs) (9). As shown in Figure 1, transporters belonging to the *SLC22* family are, except OCT1, poorly expressed in healthy human liver. This is the reason why there is very little information about their expression in HCC (10). Thus, the light increase observed in the expression of genes encoding OCT2, OCTN1 and OCTN2 probably does not have great transcendence neither for the biology of the tumour nor for their behaviour when exposed to cytostatic drugs. In contrast, the fall in the expression of OCT1 could be a limiting factor in the response against certain drugs, since this carrier is highly expressed in healthy human tissues (Table 1) and is involved in the uptake of cationic agents (11). A decrease in OCT1 expression levels in HCC has not been previously reported, although levels of this transporter were found drastically reduced in different cell lines (12).

The *SLC28* and *SLC29* families include high-affinity concentrative nucleoside transporters (CNTs) and low-affinity equilibrative nucleoside transporters (ENTs). Among the members of these families, the most abundant isoforms in healthy human liver were CNT1 and ENT1, whereas expression levels of CNT2, CNT3 and ENT2 were very low (Table 1). Therefore, probably neither the decrease in the expression level of CNT3, nor the moderate increase in the expression of the genes encoding CNT2 and ENT2 have considerable pharmacological relevance. However, CNT1, which was expressed in normal liver, was down-regulated in HCC. This fact has been previously reported by other authors, who found that low expression levels of CNT1 correlates with a minor uptake of nucleoside derivatives, such as gemcitabine (13).

Finally, the copper transporter CTR1 is highly expressed in healthy human liver. The expression of this carrier remained unchanged in HCC, although it has to be taken into account that samples used in this study were obtained for diagnostic purposes and, therefore, patients had not yet received any antitumour drug. That means, that changes in CTR1 expression induced by treatment with certain drugs, such as cisplatin and its derivatives, cannot be ruled out. Thus, it has been previously reported that in cell lines cultured in the presence of cisplatin, a lower uptake of cisplatin was found, probably due in part to down-regulation of CTR1 (14).

Since cell lines are a popular tool used as “in vitro” model to study several aspects of the biology and pharmacology of tissues from where the cells are derived, we have carried out two types of studies with three cell lines of hepatic origin. On the one hand, gene expression levels were assayed in cell lines and compared to that observed in healthy liver tissue and tumour in order to elucidate which one presents more similarities with genetic signature for each MOC. Moreover, cells were put down under the pressure of cisplatin at a dose equal to the IC_{50} value in order to determine cell response in terms of gene expression changes.

Regarding the cell lines studied here, Alexander, SK-Hep1 and HepG2, it is pertinent to stand out than the expression of the genes of this group was clearly decreased when comparing their levels against both healthy and tumour tissues (Table 2). This could be interpreted as a similitude with what we have described previously that happens in the tumour tissues. However, the levels for most of the genes studied in this MOC, remained at very low values even when their relative expression versus HCC was calculated.

These results are of great importance in order to choose a particular cell line to be used as “in vitro” model of antitumour pharmacology. Thus, we can conclude that, regarding MOC-Ia none of the studied cell lines is a good model to carry out studies of transporters belonging to the *SLC10A* or *SLCO* families. Nevertheless, the results obtained for OCTN1 and OCTN2, nucleoside transporters and CTR1 suggest that these cells could be useful for the study of these carriers (Table 2).

Finally, in the complementary studies in which cell lines were incubated with cisplatin, as a reference antitumour drug, changes in gene expression induced by the presence of this drug were observed. Results of relative gene expression in treated versus non-treated cells are shown in Table 3. For genes involved in drug uptake processes, a general over-expression was observed. This was more marked in Alexander and HepG2 cells than in SK-Hep1. Interestingly, the expression of NTCP and that of all OATP members was markedly increased in Alexander cells.

It is well known that the chronic exposure of different cell lines to cisplatin reduces the expression of the human copper transporter CTR1, which suggests that this antitumour drug is able to regulate the expression of the carrier involved in its uptake by the cells (14,15). In our studies, however, the incubation of the cell lines

Alexander, SK-Hep1 and HepG2 with cisplatin had negligible effect on the expression of CTR1 (Table 3). Only a moderate down-regulation (in SK-Hep1 cells) or up-regulation (in Alexander and HepG2 cells) was observed.

In addition to what has been described above, uptake transporters may also be involved in drug resistance through indirect mechanisms. Thus, the up-regulation of certain transporters for nutrients may counterbalance the pro-apoptotic effect of antineoplastic antimetabolites (4). For instance, *SLC7A5*, which was not included in our study since it is not involved in the transport of antitumour drugs, is involved, however, in amino acid uptake and has been found markedly up-regulated in cells with high proliferation rates such as those of malignant tumours (16).

MOC-Ib

The genes included in this MOC encode several members of the superfamily of ABC proteins that behave as pumps involved in the efflux from the cells of a great variety of substances and, therefore, determine a reduction in the accumulation of several cytostatic drugs inside the cells (17). Although do not belong to the family of ABC transporters, genes encoding Menkes and Wilson proteins are also included in MOC-Ib, since these carriers could be also involved in the efflux of different antitumour agents, such as cisplatin (18). This is also the case for LRP, lung resistance related protein, which is not an ABC member but could participate in intracellular reduction of active drug by sequestration of the compound in subcellular compartments (19).

As shown in the Table 4, all genes of MOC-Ib presented a certain level of expression in healthy human liver, although ABCA6, MRP2 and MRP3, at mRNA level, were the most abundant in this organ. When their expression was studied in tumour samples, a great inter-individual variability was observed (Table 4). Thus, although in some tumours, in contrast to what was expected, a general fall in the expression was observed, others tumours showed a completely different expression profile, with an over-expression of practically all carriers studied. These inter-individual differences can be determining in the response of the patients to chemotherapy. This finding supports the interest of carrying out the determination of the genetic footprint for each tumour.

In Figure 2, the average of normalized results obtained for all the patients studied here is shown. It can be seen that the expression of genes of this group was not increased in HCC, with the exception of genes encoding MRP4 and MRP5. However, it is necessary to take into account that, in addition to present low levels of expression in healthy liver, MRP4 and MRP5 do not have an obvious role in the development of resistance to chemotherapy although, it has been reported that its expression in the Huh-7 cell line increase when the cells were chronically incubated with cisplatin (20).

Within the ABCC subfamily, MRP2, MRP3 and MRP6 were, in this order, the carriers with highest expression levels in healthy liver (Table 4). In the cases of MRP2 and MRP3, its expression did not increase but was maintained in HCC, which suggests that these proteins may play an important role in the resistance of HCC against chemotherapy as both carriers are able to transport different cytostatic compounds (13,21). Although with a high inter-individual variability, different studies have also confirmed the presence of MRP3 in HCC (13). On the contrary, the expression of MRP6 diminished in, practically, all patients studied here (Table 4). However, it is necessary to consider that this carrier seems to have a minor role in the development of resistance (22). Another members of the ABC family, MRP1 and MRP7, although poorly expressed in liver, maintained their expression in HCC up to a very similar values to that found in healthy human liver at mRNA level (Table 4). In the case of MRP1, our findings are in agreement with previous studies reporting no changes in the expression of this transporter in HCC (23). As it has been already commented in the Introduction section, both transporters, MRP1 and MRP7, are involved in the appearance of resistance when different cell lines were chronically treated with cytostatic agents (24).

Expression of different members of ABCA subfamily, which is involved in the transport of cholesterol and lipids, is decreased in HCC (Figure 2). This is specially marked in the case of ABCA8 transporter. However, the role of this family in the appearance of resistance to chemotherapy is not well known yet.

MDR1 protein has been the focus of many studies as it is known to be the prototype of protein inducing resistance to multiple drugs. The poor response of HCC against chemotherapy has been correlated with a high expression of the *ABCB1* gene encoding this protein (25). However, when verapamil was used as MDR1 inhibitor in

combination with doxorubicin in the treatment of HCC, no improvement in the response was obtained (26). Studies carried out on MDR1 do not only focus on the determination of its liver expression levels, but also on the description of polymorphisms in *ABCB1*, which could affect the transporting capability of MDR1 (27). Thus, it is considered that the identification of polymorphisms in *ABCB1* is a marker of prediction and/or detection of HCC recurrence after liver transplantation (28). In the determinations carried out in this Doctoral Thesis, the expression levels of the gene encoding for MDR1 were almost the same in HCC than in healthy liver tissue.

Lung resistance-related protein (LRP), so called because it was first found in a chemoresistant cell line derived from lung cancer (29), is not a plasma membrane transporter but can be considered among the mechanisms involved in drug resistance, since could reduce the amount of drugs in the cells by a mechanism of intracellular sequestration (30). Our results suggested that the expression of LRP was relatively low in healthy liver (Table 4) and remained unchanged in HCC (Figure 2).

Menkes and Wilson proteins, respectively, which are known to be involved in the copper homeostasis and may participate in the transport of cisplatin (31). As was expected, liver expression of *ATP7B* was higher than that observed for *ATP7A* in this organ (Table 4) while expression levels of both transporters remained unchanged in HCC (Figure 2).

Regarding cell lines, the pattern of expression was almost the same when relative expression was compared with healthy liver or tumour tissue (Table 5). It has to be pointed out that the expression of ABCA members in cell lines was, as had been observed also in tumours, markedly decreased. MDR1 levels were also diminished, being HepG2 the only cell line in which the expression was maintained. However, most members of the ABCC family preserved their expression, except MRP6 and MRP2. In the case of the latter, again HepG2 was the only cell line that presented similar MRP2 expression levels than that determined in healthy human liver (Table 5). The results obtained in these studies suggest that Alexander and SK-Hep1 cells could be useful to study certain genes that preserved their expression in these cells, whereas HepG2 cell line seemed to be the most suitable among cells studied here to carry out studies on transporters included in MOC-Ib.

The exposure of hepatic tumours to different cytostatic drugs could play a key role in the expression of the carriers studied in this MOC. When cells were incubated with cisplatin, as antitumour agent of reference, very different patterns of expression were obtained for the three lines studied here. Thus, the expression of important genes in the development of chemoresistance, such as MDR1 and LRP, was moderately raised in Alexander and HepG2 cells, respectively. However no important changes in SK-Hep1 were observed when exposing these cells to cisplatin (Table 6). Regarding the expression of Menkes and Wilson proteins, no effect was observed when cells were incubated with cisplatin, which is not in agreement with previous studies reporting up-regulation of Menkes protein in cell lines and tumours chronically exposed to cisplatin (32). In recent studies carried out by our research group, an up-regulation of the genes encoding Menkes and Wilson proteins was also observed when exposed to cisplatin (14), however these data were obtained in cell lines derived from colon cancer and exposure time was much longer than that used in the experiments carried out in this Thesis.

MOC-II

In this group, genes encoding enzymes involved in intracellular metabolism have been included. Some of these enzymes play a key role in drug detoxification, such as different isoforms of cytochrome P450 or glutathione S-transferase (GST). Other enzymes, however, take part in reactions required to convert pro-drugs in their active forms. This is the case of the sub-units 1 and 2 of the enzyme uridine phosphorylase (UPP1 and UPP2), which are involved in the biotransformation of 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) in its active form, 5-fluorouracil (5-FU).

Owing to the fact that the liver is the main organ involved in detoxification function, a high expression for most genes included in MOC-II was observed, as is deduced from very low Ct values shown in Table 7. The highest expression in healthy liver was found for CES1, CYP3A4 and GSTa1. When the pattern gene expression was individually examined in tumour samples, unlike the results obtained for MOC-Ia and MOC-Ib, described above, the results among tumours were quite homogeneous. However, 2 out of 11 examined tumours, presented a completely different gene expression profile, which reaffirms the justification to carry out this type studies on the individual bases. As shown in Figure 3, a general down-regulation affecting all genes belonging to MOC-II was found.

Due to its role in phase I detoxification process, it is important to highlight that the expression of genes encoding cytochrome P450 was decreased in all patients studied here. These results were partially confirmed by other studies that reported a down-regulation of CYP3A4 expression levels in HCC (33). It should be taken into account that the activity of the cytochrome P450 enzymes, is not only determined by its expression levels but also for the existence of polymorphisms that considerably influences the enzymatic activity and may leads to marked inter-individual differences (34). This is the case of CYP1A1 and CYP1A2 isoforms for which there is no previous study regarding their expression in HCC, although it has been reported that some genetic variants in genes encoding both enzymes may be involved in an increased risk to develop HCC (35). This may be related with the fact that that CYP1A2 and CYP3A4 are involved in the biotransformation of aflatoxins and other toxic agents related with the development of HCC (36).

Glutathione S-transferases are a family of enzymes involved in phase II detoxification. These enzymes are divided into seven subfamilies that differ in their sequence and physiological role. Among them, GSTa is the most abundant isoform in liver, as shown in the Table 7, with a higher expression than the other isoform studied in this group, GSTp. However, several studies have suggested that this proportion is inversed in HCC, since GSTp would increase its expression, while GST1a levels would be lower in this tumour (37). This hypothesis has been confirmed in experimental models of HCC (38). However, in human clinic this concept does not seem to be a general rule. As shown in Figure 3, our results revealed that both GST1a and GSTp expression levels were diminished in HCC. It is well known that GSTp levels are higher in foetal tissue than in adult human liver (39), therefore, an over-expression of this gene in neoplasia can be considered as part of the loss of differentiation process of tumour cells that constitutes the basis of the utilization of GSTp as tumour marker. However, although several studies have reported the usefulness of GSTp as marker of extra-hepatic tumours (40,41), it has not been proven that GSTp expression levels in HCC is consistently increased in human clinic (42).

Dihydropyrimidine dehydrogenase and subunits 1 and 2 of the enzyme uridine phosphorylase (UP1 and UP2) are involved in nucleotide metabolism and play a key role in biotransformation reactions of pro-drugs resulting in the formation of their

active forms. As shown in Figure 3, the expression levels of these enzymes were lower in HCC as compared to healthy liver. This observation is of great importance with regard to the loss of sensitivity to chemotherapy, since concentrations of active drug in tumour cells would be lower when the expression of genes encoding these enzymes was decreased, as has been shown in previous studies on the sensitivity to 5-FU (43,44).

Regarding the expression of genes of MOC-II in cell lines, no difference in the pattern of expression of cell lines was observed regardless values were referred to healthy liver or tumour tissue (Table 8).

Expression levels for most genes studied in MOC-II were very low in the three cell lines, although this was particularly in the case of HepG2 cells. This indicates that, although its utilization is very popular, this cell line does not seem to be appropriate to carry out studies involving enzymes of this group. For SK-Hep1 and Alexander cells an increase in the expression of GSTp was observed, which was quantitatively more important in the case of Alexander cells. In both cell lines, expression levels of thymidine phosphorylase (TP) and uridine phosphorylase 1 (UP1), involved in the activation of pro-drugs, were maintained.

Finally, the treatment with cisplatin induced important changes in gene expression, as shown in the Table 9. An over-expression of the genes encoding cytochrome P450 was observed in response to the treatment with a toxic agent such as cisplatin for all the studied cell lines. The induction of these enzymes in response to the treatment with several pharmacological agents, not only cytostatic drugs, such as paracetamol, is largely known (45). Interestingly, exposure to cisplatin induced, in the case of HepG2 cells, an over-expression the majority of genes studied here.

MOC-III

Genes encoding molecular targets for cytostatic drugs constitute this MOC, which is the most heterogeneous of the five in which genes involved in chemoresistance have been classified in this study. The reason is that antitumour drugs can interact with very different targets, such as membrane or intracellular receptors, enzymes, intracellular structures related with the replication of the DNA and the cell division, components of the cell membranes and others.

The expression of these genes in healthy liver tissue, as shown in Table 10, was either high, as was the case for dihydrofolate reductase (DHFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFRA), topoisomerase I (TOPO-I) and thymidylate synthetase (TS), or only moderate, as was the case for the rest of genes of this MOC.

When the expression in HCC samples was examined (Table 10), a great inter-individual variability was seen for most genes of this group except for TOPO-II and PDGRA, for which the expression in practically all tumours studied here was either increased or decreased, respectively. In Figure 3, where the average of normalized values for all tumours examined is shown, the statistically significant increased in the expression of the gene encoding TOPO-II was confirmed. This enzyme is able, by acting on the DNA, to modify its conformational structure, to relax the double helix and therefore permitting DNA replication. The key role of TOPO-II in cellular proliferation processes makes of it a molecular target for antitumour drugs, such as daunorubicin and doxorubicin. The increase in the expression of TOPO-II could compensate the effect of these drugs and contribute to the lack of sensitivity to these compounds. In the series of HCC samples analyzed in this study, the finding of over-expressed TOPO-II is remarkable not only due to the magnitude but also to the homogeneity of the event. These results correlate with previous studies by other authors in which over-expression of this gene has been associated with enhanced aggressiveness of the tumour (46). Regarding TOPO-I, its expression was almost unaffected, although a mild tendency to decrease in HCC was seen. The expression and functionality of both isoforms seems to be coordinated, thus, it is known that when one of them is diminished, the other isoform tends to increase in order to balance this deficiency. Moreover other authors have shown that pretreatment with inhibitors of TOPO-I, such as irinotecan, increases the sensitivity of TOPO-II to doxorubicin (47).

Another important finding observed in this MOC was the fall in the expression of genes encoding PDGFRA and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) (Figure 3). Their implication in the initiation and development of HCC have been already suggested by several studies (48,49), which is probably due to the fact that both receptors play a key role in angiogenesis and in the maintenance of a favorable environment for tumour growth. This justifies that both receptors constitute the target

of vectorized therapies based on tyrosine-kinases inhibitors, such as imatinib and sorafenib. In contrast to the results obtained in the present Doctoral Thesis, other authors have reported an over-expression of PDGFRA at mRNA level in a 70% of the studied patients (50), which is probably due to the inter-individual variability in the expression of these genes. In fact, a marked heterogeneity even within the series included in this study was observed (Table 10). The expression of VEGFR was enhanced in some of the patients studied here, whereas the trend towards down-regulation was a more common characteristic in the case of PDGFRA expression.

Finally, the expression of type-2 estrogen receptor (ESR2), which is poor in healthy liver, diminished to even lower levels in HCC. This finding confirmed previously studies which reported a decrease, at protein level, in the expression of ESR2 in HCC (51).

Regarding cell lines studied here, the expression levels of genes included in this MOC were very low, except for ESR2 and TOPO-II (Table 11). The pattern of expression found in these cells was very similar when relative expression was referred to healthy liver or tumour tissue, except for the gene encoding TOPO-II. In this particular case, the expression in cells was closer to that observed in tumour tissue than to that determined in healthy liver. The increase in mRNA levels of TOPO-II in HCC, commented above, was similar to the over-expression of TOPO-II observed in hepatic cell lines, which is consistent with that described in previous studies by other authors (52). An interesting finding was the enhanced expression of ESR2 in Alexander and HepG2, but not in SK-Hep1 cells. The magnitude of this increase was markedly higher in the case of HepG2 cells, where the expression became 1000 and 20000-fold higher than that found in healthy and tumour tissues, respectively. We can conclude that both cell lines derived from HCC seem a good model for tumour tissue to study some of the genes included in this MOC, such as TOPO-I (Alexander and SK-Hep1), DHFR (Alexander) and PDGFRA (Alexander).

Finally, when cells were exposed to cisplatin, expression of the genes included in this MOC remained almost unaltered (Table 12). Moderate changes were only seen in Alexander cells in which the expression of 5 out of 8 genes studied here was raised. A mild increase in the expression of KIT and VEGFR in Alexander cells and DHFR and TOPO-I in HepG2 was observed. In SK-Hep1 cells, cisplatin induced a

decrease in the expression of most genes of this MOC, except for ESR2 whose levels were 26-fold higher than those found in non-treated cells. There are no studies supporting a relationship between exposure to cisplatin and increase in the expression of estrogen receptors, although it has been shown that chronic treatment with other cytotoxic drug, such as tamoxifen, induces marked over-expression of ESR2 in “in vitro” studies (53).

MOC-IV

This group includes genes encoding factors involved in DNA repairing, which may result in enhanced resistance to genotoxic agents. As commented above, the compounds that induce DNA damage constitute one of the major therapeutic alternatives in the treatment of cancer. Resistance to this kind of drugs seems to be mediated by an increase in the ability of tumour cells to repair DNA (54).

In our study, uracil DNA glycosylase (UDG), an enzyme involved in preventing mutations by removing uracil, was highly expressed in healthy liver (Table 13). However, poor expression in healthy liver tissue was observed for the rest of genes of MOC-IV (Table 13). Changes in the expression of these genes in HCC were of low relevance, as shown in Table 13. A predominance of colours indicating minimal increases or reductions in gene expression can be seen in Table 13.

Figure 5 shows the average of normalized results obtained for all the patients studied here. A slight increase in the expression of genes encoding DUT and MSH2 was observed. The former is an enzyme that participates in correcting inappropriate incorporation of dUMP into DNA, whereas MSH2 is a member of the mismatch repair system. Over-expression of both genes in HCC has been previously reported and this fact is related with a worse prognosis regarding cancer development (55,56).

Moreover, average expression of ERCC1 and GADD45 was diminished in HCC. This finding does not correlate with previous studies in which expression levels of both genes were found enhanced in HCC (57,58). Variability in the gene expression profile of each tumour is probably the cause of this discrepancy, as in the series of tumours studied in the present work there were cases in which the expression of these genes was increased.

The expression profile of genes of MOC-IV was different among the three cell lines studied here. For SK-Hep1 cells, the pattern of expression was similar to that observed in healthy and tumour tissue, whereas in the case of Alexander cells, a slight tendency to over-expression for most genes was observed. HepG2 cells showed a mixed pattern with increases and falls in gene expression (Table 14). A common feature observed in the three cell lines was the down-regulation of UDG. Based on these results we could suggest that SK-Hep1 constitutes a good model to study “in vitro” most of the genes of this MOC.

Several previous studies have evidenced that chronic treatment with cisplatin could induce the expression of many of the genes of this group (59-62). However, in the studies carried out in this Doctoral Thesis, exposure to cisplatin did not affect gene expression in Alexander and SK-Hep1 cells. The discrepancy in the results obtained by treatment with cisplatin could be due to differences in the dose and time of treatment, as both parameters were lower in our studies than in those commented above. However, HepG2 cells were very sensitive to the treatment with cisplatin. This induced a marked and generalized increase in the expression of genes included in MOC-IV (Table 15).

MOC-V

In this MOC, genes that determine the balance between survival and apoptosis have been studied. It has to be taken into account that several antitumour drugs, such as cisplatin, citarabine, etoposide and doxorubicin act, in part, by inducing apoptosis in tumour cells (63). Therefore, changes in the mechanisms that control the survival and the activation of apoptosis generally result in an enhanced resistance to these drugs (64,65).

As shown in Table 16, expression levels of members of MOC-V in healthy liver tissue were very variable. Specifically, the highest levels were found for genes encoding metadherin (MTDH), the long isoform of anti-apoptotic factor (Bcl-X), serine/threonine kinase (AKT1) and epidermal growth factor receptor (EGFR). The rest of genes included in MOC-V showed mild expression values, except for the cases of livin alfa and survivin, which were poorly expressed in healthy liver tissue.

In Figure 6, where the average of normalized results obtained for all tumours studied here is shown, a slight over-expression of MTDH was observed. This is consistent

with previous studies that reported a generalized enhanced expression of this oncogene in HCC (66). Furthermore, this characteristic is considered as an indicator of bad prognosis, since raised expression values of MTDH correlates with a higher invasive capability of the tumour.

Moreover, a statistically significant increase in the expression of survivin, an inhibitor of apoptosis, was observed in HCC (Figure 6). Over-expression of this gene is remarkable not only due to the magnitude but also to the homogeneity of the event, since, as shown in Table 16, survivin expression was enhanced in most tumours studied. These results are in agreement with those obtained by other authors in which an enhanced expression of survivin in HCC was found (67). In fact, the increase in the expression level of this gene correlates with a higher proliferative capability of the tumour (68).

The inhibitors of apoptosis (IAPs) are a family of functionally- and structurally-related proteins. A common feature of all IAPs is the presence of a BIR (Baculovirus IAP Repeat, a ~70 amino acid domain) (69). The pattern of expression of this family in HCC was not homogeneous, since some members were up-regulated, such as survivin and, although to a lesser extent, XIAP, whereas others showed lower mRNA expression levels in HCC than in healthy liver, such as IAP-1, IAP-2, NAIP, and livin-alfa (Figure 6).

Although does not belong to this family, Smac is closely related to it, since the mitochondrial protein encoded by this gene, when released into the cytosol, is able to block the action of these inhibitors of apoptosis. Our results suggested that the average expression of Smac was almost unaffected in HCC. However, this finding has not been confirmed by other studies in which a down-regulation in the expression of Smac in HCC was found (70). Like in similar situations, commented above, this discrepancy could be due to the inter-individual variability in gene expression. In fact, Smac expression was found to be diminished even within the series included in this study.

As commented in the introduction section, p53 constitutes a key factor in the induction of apoptosis in response to radiotherapy and chemotherapy. This tumour suppressor protein controls the expression of gene encoding p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), able to block cell cycle in response to DNA damage

(71). In the Figure 6, down-regulation in the expression of p53 and CDKN1A, is shown. This finding is not in agreement with previous works in which p53 expression levels were reported to be raised in HCC (57). Currently, it is believed that p53 expression does not correlate with activity level of the protein. In fact, it is well known that in 50% of tumours, of any type and location, have one or several mutations in p53 gene resulting in the inactivation of the protein (72). Specifically, R248Q mutation, which is frequent in HCC, results in an enhanced resistance to doxorubicin and paclitaxel (73).

Moreover, Fas is a surface protein with a preserved domain of cell death which upon binding fas ligand (Fas-L or Apo-1) is able to initiate extrinsic apoptosis pathway. The expression of the gene encoding this receptor was statistically reduced in HCC, as shown in Figure 6. Owing to cells become less sensitive to the Fas-L, down-regulation of Fas has been related with a bad prognosis, not only of HCC, but also of other tumours (74,75).

The analysis of the results showed in Table 17 suggests that the expression of the genes of this group in different hepatic cell lines evidences particular similarities and differences with the expression profile found in healthy liver and tumour. It is remarkable the case of survivin, whose expression was closer to that observed in tumour tissue than to that determined in healthy liver. This finding is explained because the increase in mRNA levels of survivin in HCC, commented above, was similar to the over-expression of this gene observed in hepatic cell lines. Moreover, the expression of another member of the family of apoptosis inhibitors, livin-alfa, was markedly raised in Alexander cells. This feature was not shared with other cells studied, HepG2 and SK-Hep1, for which a slight increase and a marked fall, respectively, in the expression of this gene was observed.

Moreover, as has been previously reported by other authors (72), the expression of the gene encoding anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased in HepG2 cells. However, the expression of this gene in Alexander and SK-Hep cells was lower than in healthy or tumour tissue (Table 17).

Beside the increases in the expression observed for some particular genes, which have been already commented, the levels of many genes of this group were found to be diminished in the cells used in this study. This was the case of c-FLIP, Fas, NAIP, NF- κ B and RPL6, whose expression levels in Alexander, SK-Hep1 and

HepG2 cells was very low. Based on these results, when using these cells as a model to study the balance between survival and apoptosis, it has to be taken into account that their usefulness depends upon the role of the genes expressed in each cell type.

Finally, when liver cells were incubated with cisplatin, several changes in the expression of genes determining the balance between survival and apoptosis were observed (Table 18). These changes induced by cisplatin were marked in HepG2 cells, which were, for this and another previously described MOCs, the most sensitive cell line to the treatment with this antitumour agent.

Expression of the gene encoding anti-apoptotic protein Bcl-2 clearly diminished in the cells treated with cisplatin, being this effect more marked in the case of HepG2 cells. Moreover, expression of Fas receptor, involved in apoptosis activation, was markedly higher in the cells treated with cisplatin, as well as p21 gene, which encodes protein CDKN1A. These findings are in agreement with the hypothesis that cisplatin induces cells to react to the toxic effect of the drug by promoting mechanisms of apoptosis activation and cell proliferation inhibition (76-78).

REFERENCES

1. Marin, J. J., Romero, M. R., Martinez-Becerra, P., Herraiez, E., and Briz, O. (2009) *Curr Mol Med* **9**(9), 1108-1129
2. Loboda, A., Nebozhyn, M., Cheng, C., Vessey, R., Huang, P., Dai, H., and Watters, J. W. (2009) *Clin Pharmacol Ther* **86**(1), 92-96
3. Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2007) *Nat Protoc* **2**(3), 739-752
4. Huang, Y., and Sadee, W. (2006) *Cancer Lett* **239**(2), 168-182
5. Kullak-Ublick, G. A., Beuers, U., and Paumgartner, G. (1996) *Hepatology* **23**(5), 1053-1060
6. Wlcek, K., Svoboda, M., Thalhammer, T., Sellner, F., Krupitza, G., and Jaeger, W. (2008) *Cancer Biol Ther* **7**(9), 1450-1455
7. Kinoshita, M., and Miyata, M. (2002) *Hepatology* **36**(2), 433-438
8. Vavricka, S. R., Jung, D., Fried, M., Grutzner, U., Meier, P. J., and Kullak-Ublick, G. A. (2004) *J Hepatol* **40**(2), 212-218
9. Koepsell, H., and Endou, H. (2004) *Pflugers Arch* **447**(5), 666-676
10. Anzai, N., Kanai, Y., and Endou, H. (2006) *J Pharmacol Sci* **100**(5), 411-426
11. Briz, O., Serrano, M. A., Rebollo, N., Hagenbuch, B., Meier, P. J., Koepsell, H., and Marin, J. J. (2002) *Mol Pharmacol* **61**(4), 853-860
12. Lecureur, V., Guillouzo, A., and Fardel, O. (1998) *Cancer Lett* **126**(2), 227-233
13. Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K., Denk, H., and Trauner, M. (2005) *Liver Int* **25**(2), 367-379

14. Monte, M. J., Ballesteros, M. R., Briz, O., Perez, M. J., and Marin, J. J. (2005) *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1), 24-35
15. Holzer, A. K., Katano, K., Klomp, L. W., and Howell, S. B. (2004) *Clin Cancer Res* **10**(19), 6744-6749
16. Lin, J., Raoof, D. A., Thomas, D. G., Greenson, J. K., Giordano, T. J., Robinson, G. S., Bourner, M. J., Bauer, C. T., Orringer, M. B., and Beer, D. G. (2004) *Neoplasia* **6**(1), 74-84
17. Chan, L. M., Lowes, S., and Hirst, B. H. (2004) *Eur J Pharm Sci* **21**(1), 25-51
18. Furukawa, T., Komatsu, M., Ikeda, R., Tsujikawa, K., and Akiyama, S. (2008) *Curr Med Chem* **15**(30), 3268-3278
19. Slovak, M. L., Ho, J. P., Cole, S. P., Deeley, R. G., Greenberger, L., de Vries, E. G., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., and Scheper, R. J. (1995) *Cancer Res* **55**(19), 4214-4219
20. Wakamatsu, T., Nakahashi, Y., Hachimine, D., Seki, T., and Okazaki, K. (2007) *Int J Oncol* **31**(6), 1465-1472
21. Nies, A. T., and Keppler, D. (2007) *Pflugers Arch* **453**(5), 643-659
22. Belinsky, M. G., Chen, Z. S., Shchaveleva, I., Zeng, H., and Kruh, G. D. (2002) *Cancer Res* **62**(21), 6172-6177
23. Bonin, S., Pascolo, L., Croce, L. S., Stanta, G., and Tiribelli, C. (2002) *Mol Med* **8**(6), 318-325
24. Hopper-Borge, E., Chen, Z. S., Shchaveleva, I., Belinsky, M. G., and Kruh, G. D. (2004) *Cancer Res* **64**(14), 4927-4930
25. Cho, C. W., Liu, Y., Yan, X., Henthorn, T., and Ng, K. Y. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **279**(1), 124-130
26. Lai, E. C., Choi, T. K., Cheng, C. H., Mok, F. P., Fan, S. T., Tan, E. S., and Wong, J. (1990) *Cancer* **66**(8), 1685-1687
27. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., and Brinkmann, U. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7), 3473-3478
28. Wu, L., Xu, X., Shen, J., Xie, H., Yu, S., Liang, T., Wang, W., Shen, Y., Zhang, M., and Zheng, S. (2007) *J Surg Oncol* **96**(1), 62-68
29. Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J., Clevers, H. C., and Scheper, R. J. (1995) *Nat Med* **1**(6), 578-582
30. Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M., and Berger, W. (2006) *Curr Drug Targets* **7**(8), 923-934
31. Safaei, R. (2006) *Cancer Lett* **234**(1), 34-39
32. Ohbu, M., Ogawa, K., Konno, S., Kanzaki, A., Terada, K., Sugiyama, T., and Takebayashi, Y. (2003) *Cancer Lett* **189**(1), 33-38
33. Haas, S., Merkelbach-Bruse, S., Justenhoven, C., Brauch, H., and Fischer, H. P. (2009) *Pathol Res Pract* **205**(10), 716-725
34. Smith, C. A., Smith, G., and Wolf, C. R. (1994) *Eur J Cancer* **30A**(13), 1921-1935
35. Li, R., Shugart, Y. Y., Zhou, W., An, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhang, B., Lu, D., Wang, H., Qian, J., and Jin, L. (2009) *Eur J Cancer* **45**(7), 1239-1247
36. Mace, K., Aguilar, F., Wang, J. S., Vautravers, P., Gomez-Lechon, M., Gonzalez, F. J., Groopman, J., Harris, C. C., and Pfeifer, A. M. (1997) *Carcinogenesis* **18**(7), 1291-1297
37. Howie, A. F., Forrester, L. M., Glancey, M. J., Schlager, J. J., Powis, G., Beckett, G. J., Hayes, J. D., and Wolf, C. R. (1990) *Carcinogenesis* **11**(3), 451-458
38. Monte, M. J., Palomero, F., Sainz, G. R., Dominguez, M., Diez, M., Torano, A., and Marin, J. J. (2000) *Life Sci* **66**(12), 1085-1095
39. Niu, Z. S., and Wang, M. (2005) *World J Gastroenterol* **11**(28), 4404-4408

40. Tsuchida, S., and Sato, K. (1992) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**(4-5), 337-384
41. Moscow, J. A., Fairchild, C. R., Madden, M. J., Ransom, D. T., Wieand, H. S., O'Brien, E. E., Poplack, D. G., Cossman, J., Myers, C. E., and Cowan, K. H. (1989) *Cancer Res* **49**(6), 1422-1428
42. Zhou, T., Evans, A. A., London, W. T., Xia, X., Zou, H., Shen, F., and Clapper, M. L. (1997) *Cancer Res* **57**(13), 2749-2753
43. Peters, G. J., Laurensse, E., Leyva, A., Lankelma, J., and Pinedo, H. M. (1986) *Cancer Res* **46**(1), 20-28
44. Ishitsuka, H., Miwa, M., Takemoto, K., Fukuoka, K., Itoga, A., and Maruyama, H. B. (1980) *Gann* **71**(1), 112-123
45. Kim, S. J., Lee, M. Y., Kwon do, Y., Kim, S. Y., and Kim, Y. C. (2009) *J Pharmacol Sci* **111**(2), 175-181
46. Watanuki, A., Ohwada, S., Fukusato, T., Makita, F., Yamada, T., Kikuchi, A., and Morishita, Y. (2002) *Anticancer Res* **22**(2B), 1113-1119
47. Kim, R., Hirabayashi, N., Nishiyama, M., Jinushi, K., Toge, T., and Okada, K. (1992) *Int J Cancer* **50**(5), 760-766
48. Oseini, A. M., and Roberts, L. R. (2009) *Expert Opin Ther Targets* **13**(4), 443-454
49. Marijon, H., Faivre, S., and Raymond, E. (2009) *Bull Cancer* **96**(5), 553-561
50. Stock, P., Monga, D., Tan, X., Micsenyi, A., Loizos, N., and Monga, S. P. (2007) *Mol Cancer Ther* **6**(7), 1932-1941
51. Ohnishi, S., Murakami, T., Moriyama, T., Mitamura, K., and Imawari, M. (1986) *Hepatology* **6**(3), 440-443
52. Wong, N., Yeo, W., Wong, W. L., Wong, N. L., Chan, K. Y., Mo, F. K., Koh, J., Chan, S. L., Chan, A. T., Lai, P. B., Ching, A. K., Tong, J. H., Ng, H. K., Johnson, P. J., and To, K. F. (2009) *Int J Cancer* **124**(3), 644-652
53. Speirs, V., Malone, C., Walton, D. S., Kerin, M. J., and Atkin, S. L. (1999) *Cancer Res* **59**(21), 5421-5424
54. Lage, J. M., and Popek, E. J. (1993) *Semin Diagn Pathol* **10**(3), 267-274
55. Takatori, H., Yamashita, T., Honda, M., Nishino, R., Arai, K., Yamashita, T., Takamura, H., Ohta, T., Zen, Y., and Kaneko, S. (2009) *Liver Int*
56. Wani, Y., Notohara, K., Tsukayama, C., and Okada, S. (2001) *Acta Med Okayama* **55**(2), 65-71
57. Fautrel, A., Andrieux, L., Musso, O., Boudjema, K., Guillouzo, A., and Langouet, S. (2005) *J Hepatol* **43**(2), 288-293
58. Gramantieri, L., Chieco, P., Giovannini, C., Lacchini, M., Tere, D., Grazi, G. L., Venturi, A., and Bolondi, L. (2005) *Hum Pathol* **36**(11), 1154-1162
59. Delmastro, D. A., Li, J., Vaisman, A., Solle, M., and Chaney, S. G. (1997) *Cancer Chemother Pharmacol* **39**(3), 245-253
60. Ding, X., Mohd, A. B., Huang, Z., Baba, T., Bernardini, M. Q., Lyerly, H. K., Berchuck, A., Murphy, S. K., Buermeyer, A. B., and Devi, G. R. (2009) *Br J Cancer* **101**(2), 269-277
61. Fink, D., Aebi, S., and Howell, S. B. (1998) *Clin Cancer Res* **4**(1), 1-6
62. Melton, D. W., Ketchen, A. M., Nunez, F., Bonatti-Abbondandolo, S., Abbondandolo, A., Squires, S., and Johnson, R. T. (1998) *J Cell Sci* **111** (Pt 3), 395-404
63. Ormerod, M. G., O'Neill, C., Robertson, D., Kelland, L. R., and Harrap, K. R. (1996) *Cancer Chemother Pharmacol* **37**(5), 463-471
64. Segal-Bendirdjian, E., and Jacquemin-Sablon, A. (1995) *Exp Cell Res* **218**(1), 201-212
65. Bunz, F. (2001) *Curr Opin Pharmacol* **1**(4), 337-341

66. Yoo, B. K., Emdad, L., Su, Z. Z., Villanueva, A., Chiang, D. Y., Mukhopadhyay, N. D., Mills, A. S., Waxman, S., Fisher, R. A., Llovet, J. M., Fisher, P. B., and Sarkar, D. (2009) *J Clin Invest* **119**(3), 465-477
67. Peroukides, S., Bravou, V., Alexopoulos, A., Varakis, J., Kalofonos, H., and Papadaki, H. *Histol Histopathol* **25**(3), 299-307
68. Augello, C., Caruso, L., Maggioni, M., Donadon, M., Montorsi, M., Santambrogio, R., Torzilli, G., Vaira, V., Pellegrini, C., Roncalli, M., Coggi, G., and Bosari, S. (2009) *BMC Cancer* **9**, 125
69. LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., and Korneluk, R. G. (2008) *Oncogene* **27**(48), 6252-6275
70. Bao, S. T., Gui, S. Q., and Lin, M. S. (2006) *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**(4), 580-583
71. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000) *Nature* **408**(6810), 307-310
72. Fan, J., Li, R., Zhang, R., Liu, H. L., Zhang, N., Zhang, F. Q., and Dou, K. F. (2007) *World J Gastroenterol* **13**(45), 6053-6059
73. Chan, K. T., and Lung, M. L. (2004) *Cancer Chemother Pharmacol* **53**(6), 519-526
74. Osaki, M., Kase, S., Kodani, I., Watanabe, M., Adachi, H., and Ito, H. (2001) *Gastric Cancer* **4**(4), 198-205
75. van der Woude, C. J., Kleibeuker, J. H., Tiebosch, A. T., Homan, M., Beuving, A., Jansen, P. L., and Moshage, H. (2003) *J Clin Pathol* **56**(9), 699-702
76. Konstantakou, E. G., Voutsinas, G. E., Karkoulis, P. K., Aravantinos, G., Margaritis, L. H., and Stravopodis, D. J. (2009) *Int J Oncol* **35**(2), 401-416
77. Qin, L. F., and Ng, I. O. (2001) *Cancer Lett* **172**(1), 7-15
78. Tam, K. H., Yang, Z. F., Lau, C. K., Lam, C. T., Pang, R. W., and Poon, R. T. (2009) *Cancer Lett* **273**(2), 201-209