

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**IMPLICACIÓN DE PROMOTORES Y  
TRANSPORTADORES DE ANIONES  
ORGÁNICOS DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC  
EN PATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y TERAPIA  
ANTITUMORAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Elisa Herráez Aguilar**

**2011**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**IMPLICACIÓN DE PROMOTORES Y  
TRANSPORTADORES DE ANIONES  
ORGÁNICOS DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC  
EN PATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y TERAPIA  
ANTITUMORAL**

Memoria que presenta **Dña. Elisa Herráez Aguilar** para optar  
al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 09 de mayo de 2011

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "IMPLICACIÓN DE PROMOTORES Y TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC EN PATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y TERAPIA ANTITUMORAL" presentada por D<sup>a</sup>. Elisa Herráez Aguilar para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. D. José Juan García Marín y D<sup>ña</sup>. Rocío I. Rodríguez Macías del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y el Dr. 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 nueve de mayo de dos mil once.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, D<sup>a</sup>. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA y D. ÓSCAR BRIZ SÁNCHEZ INVESTIGADOR DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "IMPLICACIÓN DE PROMOTORES Y TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC EN PATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y TERAPIA ANTITUMORAL" presentada por D<sup>a</sup>. Elisa Herráez Aguilar 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 nueve de mayo de dos mil once.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías

Fdo. Óscar Briz Sánchez



La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) y a los siguientes Proyectos:

Ministerio de Educación y Ciencia. Proyecto BFU2007-30688-E/BFI “Red española de investigación sobre proteínas transportadoras de membrana y sus implicaciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas (REIT)”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2008-2009.

Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto BFU2006-12577/BFI. “Papel de transportadores de membrana de las familias OATP y ABC en los mecanismos hepáticos de defensa frente a la toxicidad de sustancias endógenas y xenobióticas”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2007-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA035/08. “Mecanismos transcripcionales que modulan la aparición del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, mediados por el gen ABCC2, en células tumorales hepáticas”. Investigador Principal: M<sup>a</sup> Ángeles Serrano García. Periodo: 2008-2010.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. “Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2008-2010.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. “Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma”. Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2009-2012.

Ayuda para contratos de investigadores en el Sistema Nacional de Salud CP05/0135.FIS, Instituto Carlos III.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2009-08493. “Papel del receptor nuclear FXR en la defensa contra el estrés oxidativo y la carcinogénesis”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo 2010.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto: BIO39/SA27/10. “Investigación de terapias vectorizadas hacia nuevas dianas moleculares características del colangiocarcinoma”. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo 2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto: SAF2010-15517. "Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas". Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo 2011-2013.

Conserjería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. "Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regida por el gen NR1H4". Investigador Principal: M<sup>a</sup> Jesús Monte Río. Periodo 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. "Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen *SLC10A2*". Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo 2011-2012.

- Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Herraez E, Macias RI, Vazquez-Tato J, Hierro C, Monte MJ, Marin JJ (2009). Protective effect of bile acid derivatives in phalloidin-induced rat liver toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239(1)**, 21-28.

Herraez E, Macias RI, Vazquez-Tato J, Vicens M, Monte MJ, Marin JJ (2009). In vitro inhibition of OATP-mediated uptake of phalloidin using bile acid derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239(1)**, 13-20.

Marin JJG, Romero MR, Martinez-Becerra P, Herraez E, Briz O (2009). Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Current Molecular Medicine* **9(9)**, 1108-1129.

Marin JJG, Romero MR, Blazquez AG, Herraez E, Keck E, Briz O (2009). Importance and limitations of chemotherapy among the available treatments for gastrointestinal tumours. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **9(2)**, 162-184.

- En forma de abstract en las siguientes revistas:

Herráez E, Macías RIR, Vicéns M, Vazquez-Tato J, Hierro C, González San Martín F, Marín JJG (2007). Protección frente a la hepatotoxicidad de la faloidina utilizando Balu-1, un derivado semisintético del ácido cólico. *Gastroenterología y Hepatología* **30**(Supli 1), 13.

Herráez E, Macías RIR, Vazquez-Tato J, Hierro C, Blázquez AG, Martinez-Becerra P, Jiménez F, González San Martín F, Marín JJG (2007). Protection against phalloidin hepatotoxicity using Balu-1, a semisynthetic cholic derivative. *Journal of Hepatology*. **46** (Supl 1), 121.

Herráez E, Macías RIR, Lozano E, Poli E, Monte MJ, González San Martín F, Jiménez F, Pérez MJ, De Lucca D, Keck E, Marín JJG (2010). Papel de la hipercolanemia materna en la etiopatogenia del síndrome de distrés respiratorio de neonatos de rata. *Gastroenterología y Hepatología* **33**, 150.

González-Sánchez E, Briz O, Herráez E, Serrano MA, Romero MR, Pizarro R, Marín JJG (2010). Activación del promotor de la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos Mrp2 en tumores del circuito enterohepático. *Gastroenterología y Hepatología* **33**, 130-131.

Briz O, Herráez E, González-Sánchez E, Romero MR, Vaquero J, Pérez MJ, Sánchez-Vicente L, Monte MJ, Muntané J, Serrano MA, Marín JJG (2011). Activación de FXR de forma independiente de ABs: papel en la quimiorresistencia asociada a la expresión de MRP2. *Gastroenterología y Hepatología* **34 (I)**, 141.

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: LXVI de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Madrid (2007).

Autores: Herráez E, Macías RIR, Vicéns M, Vazquez-Tato J, Hierro C, González San Martín F, Marín JJG.

Título: Protección frente a la hepatotoxicidad de la faloidina utilizando balu-1, un derivado semisintético del ácido cólico.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXIV Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Valladolid (2007).

Autores: Herráez E, Macías RIR, Vazquez-Tato J, Jiménez F, González San Martín F, Marín JJG.

Título: Protection against phalloidin hepatotoxicity using a semisynthetic cholic derivative, Balu-1.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXI de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao (2008)

Autores: Herráez E, Poli E, Macías RIR, Monte MJ, Pérez MJ, Keck E, Marín JJG.

Título: Papel de las proteínas ABC del epitelio alveolar en la defensa frente a la agresión química del surfactante.

Tipo de participación: Póster

Congreso: III Jornadas científicas del CIBERehd. Barcelona (2009)

Autores: Herráez E, Briz O, Serrano MA, Romero MR, González-Sánchez E, Monte I, Marín JJG.

Título: Mecanismo de inducción de la proteína de resistencia a la quimioterapia MRP2/ABCC2 por cisplatino en células de cáncer de colon.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXII de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo (2009).

Autores: Herráez E, Macías RIR, Lozano E, Poli E, Monte MJ, Marín JJG.

Título: Papel de la hipercolanemia materna en la etiopatogenia del síndrome de distrés respiratorio de neonatos de rata.

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXXIII de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba (2010)

Autores: Herraéz E, Briz O, Serrano MA, Romero MR, González Sánchez E, Pizarro R, Monte I, Marín JJG.

Título: Mecanismo de inducción de la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos MRP2/ABCC2 por cisplatino en tumores de colon.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXI Internacional Bile Acid Meeting. Freiburg (Alemania) (2010).

Autores: Herráez E, Lozano E, Poli E, de Luca D, Martínez Becerra P, Sánchez Vicente L, Blázquez AG, Vaquero J, Briz O, Monte MJ, Marín JJG, Macías RIR.

Título: Role of maternal bile acid accumulation in the pathogenesis of neonatal respiratory distress syndrome.

Tipo de participación: Póster

## AGRADECIMIENTOS:

La realización de una Tesis Doctoral supone un periodo de aprendizaje continuo, abre las puertas de la ciencia, la muestra, te incita a la interpretación de una serie de fenómenos observados que darán lugar a más interrogantes.

Culmina con esta memoria que es el resultado final de muchas horas de trabajo y dedicación, de las ganas y la ilusión de llegar hasta aquí, de aprender, de crecer. Pero todo eso no habría servido de nada sin la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. José Juan García Marín. De él he aprendido tantas cosas durante estos años que no sabría resumirlas en unas líneas. Me ha contagiado sus ganas de saber, el entusiasmo por este trabajo tan fascinante, el empeño y la determinación con que llevarlo a cabo. Me ha ofrecido consejos, su apoyo y su tiempo cuando lo he necesitado. Me ha transmitido su confianza y me ha enseñado a creer en mí. Él es el motor de este grupo, sin él todo esto sería un poquito más difícil.

A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Serrano por su apoyo incondicional, su cariño y sus buenos consejos, por hacerlo todo mucho más fácil. Por ser un ejemplo de discreción, de elegancia y de generosidad.

A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte, por todos los consejos que me ha dado a lo largo de estos años, por seguir siempre de cerca mi trabajo, por estar siempre dispuesta a ayudar, por transmitirme ese entusiasmo personal y científico. Gracias por toda tu ayuda, y por ser sin duda un referente para mí.

A los tres muchas gracias por vuestra admirable profesionalidad. Habéis sido un modelo para mí, no solo en el trabajo diario sino también fuera de él.

A la Dra Rocío I. Rodríguez Macías por todo el trabajo y tiempo que me ha dedicado, pero sobre todo por haberme abierto las puertas del grupo. Con ella me inicié en esta aventura de la investigación y ha sido un ejemplo para mí. Gran parte de esta Tesis lleva su sello.

Al Dr. Oscar Briz por haber dirigido el día a día de este trabajo y por haber empujado en los días difíciles. Por la paciencia que muchas veces tuvo conmigo, pero especialmente porque detrás de ese trabajador incansable, metódico, sencillo, discreto y concienzudo hay una gran persona.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez, siempre cariñosa y amable. Gracias por tener siempre un minuto para dedicarme, por tu compañerismo, por tu rigor en el trabajo, y por demostrarme día a día cómo se hace el buen trabajo.

A Javi y a Ester, porque siempre habéis estado ahí, para las dudas científicas y para ser un apoyo en lo personal. Por saber encontrar siempre una risa, por poner esa nota de frescura y de color al trabajo, por vuestra lealtad y ayuda incondicional, en definitiva por ser como sois. Habéis sido un pilar fundamental para mí, y vuestra amistad es, sin duda, una de las mejores cosas que me llevo de mi paso por el grupo.

A mi tocaya Elisa Lozano, y mi joven “padawan” Laura, con quienes he compartido muchas horas de trabajo. Gracias por vuestro cariño, vuestro apoyo y vuestra ayuda en todo momento, por vuestra amistad y complicidad, y vuestro buen carácter siempre.

A las Dras Marta Rodríguez y Alba García, y a Rubén Rosales, por todo el tiempo que hemos compartido, por su ayuda siempre desinteresada y su atenta disposición.

Al resto de compañeros del grupo con los que he tenido la suerte de coincidir: Emma, Olivia, Pablo, Carmen, Raquel, Manu y aquellos con quienes compartí mis primeros años de trabajo, Carlos, Susana, Beatriz, Marta Vicéns, Mariona, gracias a todos ellos porque contribuyeron a formar este gran equipo.

Al departamento de Bioquímica por permitirme el uso de sus instalaciones.

A M<sup>a</sup> Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría A los técnicos y auxiliares de laboratorio que han facilitado la elaboración de esta Tesis. Al personal del Servicio de Experimentación Animal por formar un excelente equipo.

Y a todas las personas que fuera de los muros de este laboratorio han contribuido, quizá sin saberlo, a que este sueño hoy se haga realidad.

**DEDICADA A:**

*Mis padres y mi hermano Diego, mis puntos de referencia, porque gracias a ellos estoy hoy aquí. Por su paciencia infinita, por estar siempre dispuestos a ayudarme. Porque han sabido inculcarme el valor del esfuerzo de cada cosa, de cada paso. Porque son mi mayor orgullo.*



## ABREVIATURAS

**AB:** Ácido biliar  
**ABC:** "ATP Binding Cassette"  
**AC:** Ácido cólico  
**ADC:** Ácido desoxicólico  
**ADHC:** Ácido dehidrocólico  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AEDT:** Ácido etilendiamino tetraacético  
**AGC:** Ácido glicocólico  
**ALC:** Ácido litocólico  
**ALP:** Fosfatasa alcalina  
**AQDC:** Ácido quenodesoxicólico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNsa:** Ribonucleasa  
**ASBT:** "Apical sodium-dependent bile acid transporter"  
**ATC:** Ácido taurocólico  
**ATP:** Adenosín trifosfato  
**ATQDC:** Ácido tauroquenodesoxicólico  
**ATUDC:** Ácido tauroursodesoxicólico  
**AUDC:** Ácido ursodesoxicólico  
**BCRP:** "Breast Cancer Resistance Protein"  
**BR:** Bilirrubina  
**BSEP:** "Bile Salt Export Pump"  
**BSP:** Bromosulfoftaleína  
**cADN:** ADN complementario  
**CAR:** "Constitutive androstane receptor"  
**CGC:** Colangiocarcinoma  
**CHC:** Carcinoma hepatocelular  
**CIG:** Colestasis intrahepática gestacional  
**CMC:** Concentración micelar crítica  
**Ct:** Ciclo umbral  
**CYP:** Enzimas citocromo P450  
**Dapi:** 4,6-diamino-2-fenilindol  
**DEPC:** Dietilpirocarbonato  
**DHEAS:** Dehidroepiandrosterona sulfato  
**DMEM:** "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato  
**DPFC:** Dipalmitoilfosfatidilcolina  
**ECL:** "Enhanced ChemioLuminiscence"  
**EEM:** Error estándar de la media  
**ES:** Estrona sulfato  
**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína  
**FL:** Fosfolípido  
**FLasaA2:** Fosfolipasa A2  
**FXR:** "Farnesoid X Receptor"  
**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa  
**GGT:** Gamma glutamil transferasa  
**GOT:** Aspartato aminotransferasa  
**GPT:** Alanina aminotransferasa  
**GSH:** Glutación reducido  
**GST:** Glutación-S-Transferasa  
**HDTAB:** Bromuro de hexadeciltriethylamonio  
**Hepes:** Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico

**HNF:** "Hepatocyte nuclear factor"  
**HPRT:** Hipoxantina fosforribosiltransferasa  
**IBABP:** "Intestinal bile acid binding protein"  
**IL:** Interleukina  
**kb:** Kilobase  
**KDa:** Kilodalton  
**Km:** Constante de Michaelis  
**LBA:** Lavado broncoalveolar  
**LDH:** Lactato deshidrogenada  
**LDL:** "Low density lipoprotein"  
**LXR:** "Liver X receptor"  
**MAPK:** "Mitogen-activated proteinkinases"  
**mARN:** ARN mensajero  
**MDA:** Malonildialdehido  
**MDR:** Resistencia a múltiples drogas  
**MEM:** "Minimum essential médium eagle"  
**MOPS:** Ácido morfolino propansulfónico  
**MPO:** Mieloperoxidasa  
**MRP:** Proteína asociada a resistencia a múltiples drogas  
**MTS:** Sal de tetrazolio  
**NAD:** Nicotín adenín dinucleótido  
**NADH:** Nicotín adenín dinucleótido reducido  
**NADP:** Nicotín adenín dinucleótido fosfato  
**NADPH:** Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido  
**NTCP:** Polipeptido de cotransporte de taurocolato-sodio  
**OAT:** "Organic anion transporters"  
**OATP:** Polipéptido transportador de aniones orgánicos  
**OCT:** "Organic cation transporters"  
**ORFs:** "Open Reading Frames"  
**OST:** "Organic solute transporters"  
**PAGE:** Electroforesis en gel de agarosa  
**pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**Pm:** Peso molecular  
**PMS:** Metasulfato de fenazina  
**PPAR:** "Peroxisome proliferator-activated receptors"  
**PXR:** "Pregnane X receptor"  
**RAR:** "Retinoic acid receptor"  
**RIPA:** "Radio immunoprecipitation assay"  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RT:** Transcripción reversa  
**SDR:** Síndrome de distrés respiratorio  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SHP:** "Small Heterodimer Partner"  
**SP:** "Surfactant protein"  
**SVCT:** Transportador de Vitamina C dependiente de sodio  
**SXR:** "Steroid X-receptor"  
**TAE:** Tampón Tris-Ácido acético-EDTA  
**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletildiamina  
**TMB:** Tetrametilbencinida  
**TNF:** "Tumor Necrosis Factor"  
**Tris:** Trishidroximetilaminometano  
**UAF:** Unidades arbitrarias de fluorescencia  
**UGT:** "Uridin difosfato-glucuronosil transferasa"

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Objetivos</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. Introducción</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>2.1. Los Ácidos Biliares</b> .....  | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Estructura y biosíntesis de los ABs .....   | 3         |
| 2.1.2. Conjugación de los ABs .....  | 5         |
| 2.1.3. Papel fisiológico de los ABs .....  | 5         |
| 2.1.4. Circulación enterohepática .....  | 6         |
| <b>2.2. Transportadores hepáticos de aniones orgánicos</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>2.2.1. Transportadores de captación</b> .....   | <b>8</b>  |
| 2.2.1.1. Sistemas dependientes de sodio .....  | 8         |
| 2.2.1.2. Sistemas independientes de sodio .....  | 9         |
| <b>2.2.2. Bombas exportadoras ABC</b> .....  | <b>12</b> |
| 2.2.2.1. La subfamilia ABCA .....  | 15        |
| 2.2.2.2. La subfamilia ABCB .....  | 15        |
| 2.2.2.3. La subfamilia ABCC .....  | 17        |
| 2.2.2.4. La subfamilia ABCG .....  | 20        |
| <b>2.3. Transportadores extrahepáticos de aniones orgánicos</b> .....  | <b>21</b> |
| 2.3.1. Transporte intestinal.....  | 21        |
| 2.3.2. Transporte pulmonar .....   | 23        |
| <b>2.4. Regulación de la expresión de los transportadores de aniones orgánicos</b> .....                     | <b>26</b> |
| 2.4.1. Regualación en <i>cis</i> .....   | 27        |
| 2.4.2. Regualción en <i>trans</i> .....  | 27        |
| 2.4.2.1. Receptores nucleares .....  | 28        |
| 2.4.2.2. Otros factores de transcripción .....   | 31        |
| <b>2.5. Papel de los transportadores de aniones orgánicos en patología, toxicología y farmacología</b> ..... | <b>32</b> |
| <b>2.5.1. Colestasis intrahepática gestacional</b> .....   | <b>32</b> |
| 2.5.1.1. Etiología .....   | 33        |
| 2.5.1.2. Colestasis intrahepática gestacional y el feto .....  | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5.1.3. Efecto de la colestasis sobre la expresión de proteínas transportadoras hepáticas de ABs y receptores nucleares ..... | 35        |
| <b>2.5.2. Síndrome de distrés respiratorio</b>   |           |
| 2.5.2.1. El surfactante .....  | 38        |
| 2.5.2.2. Síndrome de distrés respiratorio del neonato .....  | 39        |
| 2.5.2.3. ABs y Síndrome de distrés respiratorio .....  | 41        |
| <b>2.5.3. Papel en toxicología</b> .....   | 42        |
| 2.5.3.1. Transporte de toxinas .....   | 42        |
| 2.5.3.2. Interacciones entre sustratos endógenos y xenobióticos .....  | 43        |
| <b>2.5.4. Resistencia a la quimioterapia en tumores del circuito enterohepático</b><br>.....                                   | <b>44</b> |
| 2.5.4.1. Quimioterapia disponible .....  | 44        |
| 2.5.4.2. Mecanismos de quimiorresistencia .....  | 47        |
| 2.5.4.3. Papel del transportoma en la resistencia a la quimioterapia antitumoral .....   | 52        |
| <b>3. Material y Métodos</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>3.1. Material</b> .....   | <b>59</b> |
| 3.1.1. Material biológico .....  | 59        |
| 3.1.2. Productos .....   | 60        |
| 3.1.3. Medios instrumentales .....   | 63        |
| <b>3.2 Síntesis in vitro de ARNm de transportadores de membrana</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>3.3. Experimentos en oocitos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....   | <b>67</b> |
| 3.3.1. Extracción y selección de oocitos .....   | 67        |
| 3.3.2. Microinyección del ARNm en los oocitos .....  | 68        |
| 3.3.3. Estudios funcionales de los transportadores de membrana en los oocitos .....  | 68        |
| <b>3.4. Cultivos celulares</b> .....   | <b>69</b> |
| 3.4.1. Experimentos en células establemente transfectadas con OATP1B1  | 69        |
| 3.4.2. Experimentos de citometría de flujo .....   | 70        |
| 3.4.3. Transfección con lípidos catiónicos .....   | 71        |
| <b>3.5. Experimentos <i>in vivo</i> en ratas</b> .....   | <b>72</b> |
| 3.5.1. Estudios de secreción biliar .....  | 72        |
| 3.5.2. Modelo experimental de colestasis obstructiva .....   | 74        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.3. Marcaje del “pool” de ácidos biliares totales .....  | 74        |
| <b>3.6. Detección de proteínas por inmunofluorescencia .....</b>                                  | <b>75</b> |
| 3.6.1. Procesamiento de las muestras .....  | 75        |
| 3.6.2. Inmunodetección .....  | 75        |
| 3.6.3. Controles negativos .....  | 76        |
| <b>3.7. Detección de proteínas por WB.....</b>  | <b>76</b> |
| 3.7.1. Obtención de muestras .....  | 76        |
| 3.7.2. Inmunodetección.....   | 77        |
| <b>3.8. Estudios histológicos .....</b>   | <b>77</b> |
| 3.8.1. Obtención de muestras.....   | 77        |
| 3.8.2. Tinción hematoxilina-eosina .....  | 78        |
| 3.8.3. Análisis del contenido celular de FITC .....   | 78        |
| <b>3.9. Análisis de los niveles de ARNm por RT- PCR cuantitativa .....</b>                        | <b>78</b> |
| 3.9.1. Extracción del ARN total .....   | 78        |
| 3.9.2. Transcripción reversa (RT) .....   | 79        |
| 3.9.3. Diseño de cebadores .....  | 79        |
| 3.9.4. Realización de la PCR cuantitativa .....   | 83        |
| 3.9.5. Cuantificación de los resultados .....   | 83        |
| <b>3.10. Clonación por recombinación Gateway .....</b>  | <b>83</b> |
| 3.10.1. Fundamento.....   | 83        |
| 3.10.2. Obtención de ADN genómico humano .....  | 87        |
| 3.10.3. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR de alta fidelidad .....                        | 87        |
| 3.10.4. Clonación del producto de PCR por recombinación BP .....                                  | 87        |
| 3.10.5. Recombinación LR con un único vector Entry .....  | 88        |
| 3.10.6. Recombinación LR “Multisite Gateway” .....  | 88        |
| <b>3.11. Métodos analíticos .....</b>   | <b>88</b> |
| 3.11.1. Valoración del ARN y del ADN por fluorimetría.....  | 88        |
| 3.11.2. Determinación de la concentración sérica de marcadores de<br>funcionalidad hepática ..... | 88        |
| 3.11.3. Determinación de la actividad MPO .....   | 89        |
| 3.11.4. Determinación de la concentración de ABs en bilis .....                                   | 89        |
| 3.11.5. Determinación de la concentración de Abs totales en suero .....                           | 89        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.11.6. Determinación de la viabilidad celular .....  | 89         |
| 3.11.7. Determinación de proteínas totales .....  | 89         |
| 3.11.8. Determinación de compuestos por LC-MS-MS .....  | 90         |
| 3.11.9. Determinación de actividad luciferasa .....   | 91         |
| 3.11.10. Determinación de la expresión de GFP .....   | 92         |
| <b>3.12. Análisis estadístico .....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>4. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>4.1. Estudio de la capacidad de nuevos derivados de ABs para inhibir la captación hepática de toxinas mediada por OATPs.....</b> | <b>93</b>  |
| <b>4.1.1. Nuevos derivados sintéticos de ABs: BALUs .....</b>   | <b>95</b>  |
| 4.1.1.1. Estructura química .....   | 95         |
| <b>4.1.2. Experimentos en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....</b>  | <b>96</b>  |
| 4.1.2.1. Efecto de los BALUs sobre transportadores expresados en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....                             | 96         |
| 4.1.2.2. Estudios cinéticos de la inhibición por BALU-1 del transporte de ATC mediado por OATP1B1 .....                             | 102        |
| <b>4.1.3. Experimentos en células establemente transfectadas con OATP1B1 .....</b>  | <b>104</b> |
| 4.1.3.1. Efecto del BALU-1 sobre la captación de faloidina por células que expresan OATP1B1.....                                    | 104        |
| <b>4.1.4. Experimentos <i>in vivo</i> en ratas .....</b>  | <b>107</b> |
| 4.1.4.1 Efecto de BALU-1 sobre el flujo biliar y la secreción de ABs y faloidina .....  | 107        |
| 4.1.4.2. Efectos del BALU-1 sobre la hepatotoxicidad inducida por faloidina .....   | 116        |
| <b>4.2. Papel de la hipercolanemia materna en la etiopatogenia del síndrome de distrés respiratorio de neonatos de rata .....</b>   | <b>122</b> |
| <b>4.2.1. Modelo de colestasis materna .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>4.2.2. Efecto de la colestasis materna sobre la distribución corporal de ácidos biliares .....</b>                               | <b>125</b> |
| <b>4.2.3. Efecto de la colestasis materna sobre la estructura del tejido pulmonar.....</b>  | <b>128</b> |
| <b>4.2.4. Efecto de la colestasis materna sobre la inmunidad pulmonar .....</b>   | <b>130</b> |
| <b>4.2.5. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión de la eritropoyetina .....</b>   | <b>138</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.2.6. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión pulmonar de proteínas transportadoras y receptores nucleares .....</b> | <b>141</b> |
| <b>4.2.6. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión de la fosfolipasa A2-IIA .....</b>                                     | <b>146</b> |
| <b>4.3. Mecanismos de inducción de la expresión de MRP2 por cisplatino en células de cáncer de colon .....</b>                      | <b>150</b> |
| <b>4.3.1. Efecto del cisplatino en la expresión de bombas de eflujo en células de cáncer de colon.....</b>                          | <b>152</b> |
| <b>4.3.2. Determinación de la actividad del promotor de MRP2 .....</b>  | <b>159</b> |
| <b>4.3.3. Estimulación del promotor de MRP2 por cisplatino .....</b>  | <b>167</b> |
| <b>4.3.4. Cambios en la expresión de factores de transcripción implicados en la inducción del promotor de MRP2 .....</b>            | <b>169</b> |
| <b>5. Conclusiones .....</b>  | <b>174</b> |
| <b>6. Bibliografía .....</b>  | <b>176</b> |

**1**

**OBJETIVOS**

---





En los hepatocitos, los procesos de captación desde la sangre portal de fármacos y toxinas, así como de numerosos compuestos endógenos como ácidos biliares (ABs) y bilirrubina están mediados por diversas familias de transportadores. Entre ellas, la más importante por sus implicaciones y número de miembros es la familia de proteínas OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) codificadas por los genes *SLCO*. Por otra parte, la expulsión de sustancias orgánicas mediante transporte activo primario a la bilis en situaciones fisiológicas, o de vuelta hacia la sangre cuando su salida hacia la bilis está dificultada en situaciones de colestasis se debe en gran medida a miembros de la superfamilia de proteínas ABC (ATP-Binding Cassette).

Un mejor conocimiento de estos procesos puede ser de gran utilidad para la manipulación farmacológica de la vectorización de fármacos, para prevenir la captación o mejorar la eliminación de tóxicos, o para comprender la etiopatogenia de trastornos relacionados con la dinámica de sustancias endógenas que son sustratos de estos transportadores.

Aprovechando la analogía de la metodología necesaria para su estudio, el conocimiento de estos sistemas de transporte por parte de nuestro grupo de investigación, y la actualidad de diversas cuestiones pendientes de respuesta en este campo, nos planteamos como **objetivo general de esta Tesis Doctoral** profundizar en el estudio del papel que juegan estas proteínas y los mecanismos que regulan su expresión en diferentes aspectos de la Fisiología, la Fisiopatología y la Farmacología.

Este objetivo general engloba los siguientes tres objetivos parciales que nos fuimos planteando a lo largo del periodo de formación predoctoral:

**Objetivo 1º:** Investigar la capacidad de varios derivados de ABs para inhibir la captación mediada por proteínas de la familia OATP. El interés de este objetivo era evaluar la utilidad de bloqueantes de transportadores OATP como antídotos en casos de consumo accidental de toxinas captadas por estas proteínas. Un ejemplo es la faloidina presente en setas venenosas, como la *Amanita phalloides*.

**Objetivo 2º:** Investigar el papel de transportadores ABC en la etiopatogenia del síndrome respiratorio neonatal asociado a la hipercolanemia materna que acompaña a la colestasis de la embarazada.

**Objetivo 3º:** Investigar los mecanismos que controlan la sobreexpresión de proteínas ABC y que reducen la respuesta de las células de cáncer de colon a la quimioterapia. Como fármaco modelo se eligió el cisplatino y los estudios se centraron en la proteína ABCC2, que se cree que juega un papel importante en la resistencia a este citostático.



**2**

**INTRODUCCIÓN**

---



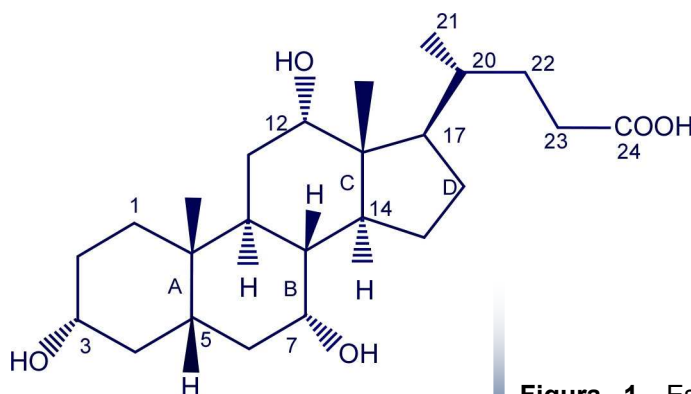
## 2.1. LOS ÁCIDOS BILIARES

Los términos “ácidos biliares” (ABs) y “sales biliares” suelen utilizarse indistintamente. Sin embargo, indican situaciones diferentes del estado de ionización de estas moléculas. Sales biliares son las formas ionizadas más hidrosolubles, que aparecen en bilis acompañadas de sodio o potasio, mientras que los ABs son formas no ionizadas menos hidrosolubles. Como en los fluidos biológicos de pH 7 o superior la mayor parte de estas moléculas se encuentra en forma aniónica (Hofmann, 1998) en este texto se denominarán ambas formas moleculares bajo el término de ABs.

### 2.1.1. Estructura y biosíntesis de los ABs

Los ABs son ácidos carboxílicos que se sintetizan en los hepatocitos por saturación e hidroxilación del núcleo de colesterol en el retículo endoplasmático liso y ruptura oxidativa de su cadena lateral en los peroxisomas. En su mayoría son compuestos anfipáticos con dos regiones claramente diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica, lo que les confiere propiedades detergentes. Esta estructura peculiar les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada denominada concentración micelar crítica (CMC), que para la mayoría de los ABs es inferior a 10 mM. En la bilis humana las concentraciones de los ABs superan el valor de la CMC.

Respecto a su estructura química, los ABs típicos son, en contraste con el colesterol del que proceden (insaturado, monohidroxilado, apolar y con 27 átomos de carbono), esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral que puede estar conjugado con glicina o taurina (Roger *et al.*, 1983). La figura 1 muestra la estructura química de un AB típico, el ácido cólico (AC).



**Figura 1.** Estructura química del ácido cólico (AC).

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). Una característica estructural común a todos los ABs y al colesterol es la presencia de 3 grupos metilo, situados en C10, C13 y C21. La relativa constancia del núcleo esteroide contrasta con la variedad de las sustituciones que puede sufrir.

En humanos adultos, el núcleo aparece curvado debido a que los anillos A y B se encuentran en configuración "cis", disponiéndose en planos perpendiculares uno respecto al otro cuando el H del C5 se dispone en posición  $\beta$ . Por ello, a estos ABs se los denomina  $5\beta$ -ABs. En ciertos defectos congénitos del metabolismo de los ABs, en fetos humanos sanos, así como en algunas patologías hepáticas (El-Mir *et al.*, 2001) aparecen ABs en los que los anillos A y B se encuentran en el mismo plano, es decir, con el H del C5 en posición  $\alpha$ ; a estos se les llama  $5\alpha$ -ABs, ABs planos o allo-ABs.

Otro tipo de ABs son los ceto-ABs, con grupos ceto generalmente en los carbonos 3 y 7 del núcleo esteroideo. Su origen es probablemente intestinal, pues la flora bacteriana del intestino distal presenta actividad 3 y 7 hidroxisteroide deshidrogenasa (Macdonald *et al.*, 1983). Algunas de estas moléculas oxidadas no son reducidas a su paso por el hígado y forman parte del conjunto circulante en forma de ceto-ABs (Bjorkhem *et al.*, 1986).

La cadena lateral generalmente tiene 5 átomos de carbono y termina en un grupo carboxilo. 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 (Figura 1).

Los ácidos cólico (AC:  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxi- $5\beta$ -colanoico) y quenodesoxicólico (AQDC:  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ -colanoico) son los denominados ABs primarios, pues son sintetizados directamente en el hígado. Sin embargo, al pasar por el intestino, los ABs primarios son modificados por las bacterias de la flora intestinal, dando lugar a los denominados ABs secundarios. De manera que a partir del AC se origina el ácido desoxicólico (ADC) y a partir del ácido quenodesoxicólico (AQDC), el ácido litocólico (ALC), carentes del correspondiente grupo OH en posición  $7\alpha$ .

Además de ésta, existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de los ABs primarios.

Los ABs primarios se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

a) la vía clásica o vía neutra, así denominada porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el AC y el AQDC, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol  $7\alpha$ -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).

b) la vía alternativa o vía ácida, donde los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el AQDC (Bjorkhem, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilasa (gen *CYP27A1*).

La contribución relativa de la vía clásica y la vía alternativa a la biosíntesis global de los ABs no está muy clara, aunque parece ser que la vía clásica sería la mayoritaria en la biosíntesis de ABs en humanos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la vía alternativa puede adquirir un papel fundamental en pacientes con algunas enfermedades hepáticas, y parece ser la vía predominante durante la vida fetal (Deleze *et al.*, 1978). Además, se ha comprobado que en cultivos de hepatocitos de rata, la vía alternativa produce aproximadamente un 50% de los ABs sintetizados (Stravitz *et al.*, 1996).

### **2.1.2. Conjugación de los ABs**

Las principales biotransformaciones que experimentan los ABs son conjugaciones con sulfato, ácido glucurónico, N-acetilglucosamina o con aminoácidos (glicina o taurina). 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 *et al.*, 1986). A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la glucuronidación o la sulfatación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, cobran importancia en situaciones como la colestasis, en la cual tanto la sulfatación como la glucuronidación de los ABs se incrementan con objeto de formar especies más hidrosolubles (Hofmann, 1994).

### **2.1.3. Papel fisiológico de los ABs**

Los efectos fisiológicos de los ABs son muy diversos. En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ABs por su efecto osmótico en la luz canalicular. Estimulan además la contracción canalicular, que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar. Inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan 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. El flujo de ABs a través del hepatocito determina la cantidad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la bilis forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas (colesterol, protoporfirinas, etc) y actúan como tampones para el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Estas micelas, a nivel intestinal, permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta facilitando así su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la



secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Izokura *et al.*, 1991; Combettes *et al.*, 1992), e inducen la secreción de agua y electrolitos.

Recientemente, se ha descrito que los ABs intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa (Houten, 2006). También se ha confirmado que los ABs inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto *et al.*, 1997). Esto sugiere funciones de estos compuestos en la homeostasis energética.

En los últimos años se ha descrito que los ABs son moléculas señalizadoras, 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)

También, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos donde los ABs se encuentran en concentraciones elevadas (Marin *et al.*, 1993).

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 otro lado, 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 las distintas especies de ABs (Rosignoli *et al.*, 2008). Sin embargo, un AB terciario como es el ácido ursodesoxicólico (AUDC), posee gran interés terapéutico. Este AB difiere del AQDC, mucho más tóxico, sólo en la orientación ecuatorial del grupo 7 $\beta$ -hidroxilo, pero esta propiedad permite que el AUDC sea marcadamente más hidrofílico que otros ABs (Perez *et al.*, 2009). Así, diversos estudios han confirmado su utilidad 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).

#### **2.1.4. Circulación enterohepática**

Estos compuestos endógenos permanecen en su mayoría reclusos en la circulación enterohepática gracias a la existencia de proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas apical y basal de ileocitos y basolateral y canalicular de los hepatocitos. Los ABs son secretados a la bilis y concentrados en la vesícula biliar. Allí permanecen a la espera de un estímulo adecuado como es la ingesta de alimentos, especialmente si son ricos en grasas, lo que hace que se libere la

colecistoquinina, hormona que estimula el vaciamiento, alcanzando entonces el duodeno donde llevan a cabo sus funciones de digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles. La mayoría son reabsorbidos de forma activa en el íleon, aunque una alta proporción de ABs dihidroxilados conjugados con glicina se reabsorben pasivamente en el yeyuno (Angelin *et al.*, 1976) y los ABs libres (generalmente desconjugados por las bacterias intestinales durante el tránsito intestinal) se reabsorben de forma pasiva en el colon (Mekhjian *et al.*, 1979). Los ABs reabsorbidos pasan en proporción de un 99,9% a las ramas de la vena porta, se transportan unidos principalmente a albúmina y a lipoproteínas (Kramer *et al.*, 1979) y son captados con gran eficacia por los transportadores de la membrana sinusoidal de los hepatocitos. El hecho de que exista un mecanismo tan complejo es una prueba de su importancia biológica.

Diariamente se pierden unos 50-500 mg de ABs, es decir menos del 5% del “pool” total, que suele ser de 3-5 g, a pesar de que el ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida). Los ABs que se pierden son reemplazados por la síntesis de nuevas moléculas de ABs, que se mantiene inhibida por un mecanismo de retroalimentación negativa, de manera que si la cantidad de moléculas circulantes disminuye, el hígado aumenta la tasa de síntesis para mantener los niveles normales.

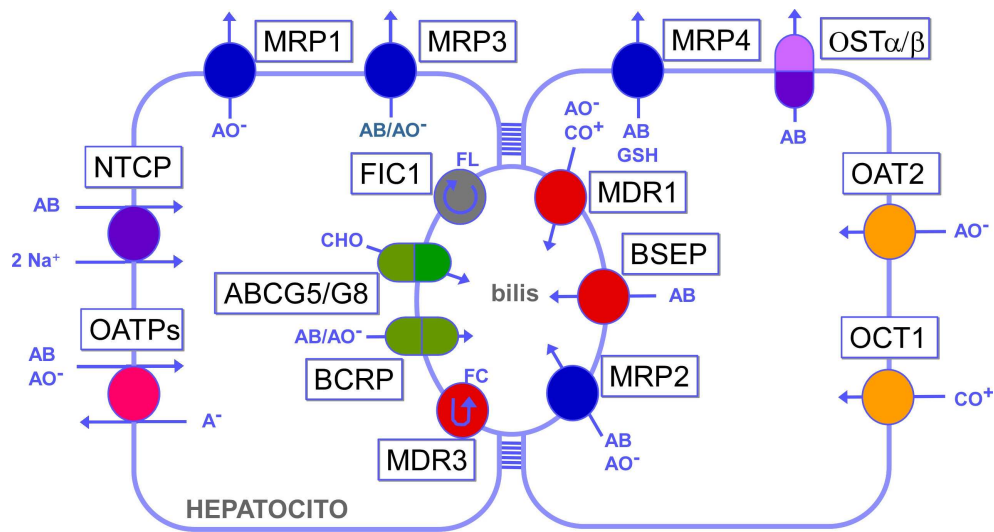
## 2.2. TRANSPORTADORES HEPÁTICOS DE ANIONES ORGÁNICOS

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 pero, aunque algunos ABs con elevado pKa pueden atravesar las membranas, la mayoría requieren de transportadores específicos de membrana.

Los transportadores de ABs incluyen proteínas de estructura muy diferente, que llevan a cabo la captación o el eflujo de ABs. Algunos transportadores son potencialmente bidireccionales aún en las mismas células, mientras que otros pueden llevar a cabo captación en unas células y contribuir al eflujo de ABs en otras.

En el proceso de captación de ABs de la circulación sanguínea por el hepatocito participan principalmente dos grupos de proteínas: unas que pertenecen a la familia de transportadores SLC10A y que median la captación de ABs dependiente de  $\text{Na}^+$ , 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  $\text{Na}^+$ . La secreción canalicular de ABs tiene lugar gracias a transportadores pertenecientes a una superfamilia de proteínas denominadas ABC, del inglés “ATP-Binding Cassette” (Muller *et al.*, 1997).

En la figura 2 se muestran los principales transportadores, presentes en los hepatocitos, implicados en la captación y secreción de compuestos colefílicos.



**Figura 2.** Representación esquemática de los sistemas de transporte implicados en la captación y secreción de compuestos colefílicos. AB, ABs; AO<sup>-</sup>, aniones orgánicos; CO<sup>+</sup>, cationes orgánicos; CHO, colesterol, GSH; glutatión reducido; FC, fosfatidilcolina; FL, fosfolípidos.

## 2.2.1. Transportadores de captación

La membrana sinusoidal o basolateral de los hepatocitos está en contacto directo con la sangre portal a través de las células endoteliales de los sinusoides y del espacio de Disse. Aunque la difusión simple a través de la membrana plasmática sinusoidal puede contribuir a la captación de algunos compuestos por los hepatocitos (Zucker *et al.*, 2000) la mayoría de los compuestos colefílicos son captados a través de mecanismos de transporte dependientes o independientes de sodio localizados en esta membrana (figura 2). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de transportadores de membrana SLC (del inglés “Solute Carriers”).

### 2.2.1.1. Sistemas dependientes 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, responsable de más del 80% del transporte de ATC. La proteína transportadora implicada en este proceso es el polipéptido cotransportador de Na<sup>+</sup> y ATC o NTCP, en humanos, y Ntcp, en roedores, del inglés “Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide”, que pertenece a la familia de proteínas SLC10A.

NTCP (gen *SLC10A1*) es una glicoproteína de aproximadamente 50 kDa y 362 aminoácidos, con 7 dominios transmembrana (Hagenbuch *et al.*, 1996). Una de sus propiedades características es la capacidad para realizar un transporte unidireccional mediante cotransporte con sodio, interaccionando con los ABs a través de una región de la molécula que incluye la cadena lateral (Kramer *et al.*, 2001). La estequiometría del transporte es de 2 Na<sup>+</sup>/1 AB, a favor del gradiente de este ion. El gradiente de Na<sup>+</sup> necesario para el transporte se debe a la actividad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa presente en la membrana sinusoidal del hepatocito (Meier, 1989).

Dentro de los sustratos de NTCP se encuentran principalmente ABs conjugados con glicina y taurina, di- y tri-hidroxilados, como el ATC, ácido glicocólico (AGC), ácido tauroquenosodesoxicólico (ATQDC) o el ácido tauroursodesoxicólico (ATUDC). También transporta, aunque con menor eficacia, ABs no conjugados, como el AC, y otras moléculas, como esteroides sulfatados (dehidroepiandrosterona sulfato, DHEAS) y estrona sulfato (ES), aniones orgánicos como la bromosulfoftaleína (BSP) y hormonas tiroideas (Meier *et al.*, 1997; Friesema *et al.*, 1999). Además, se ha comprobado su capacidad para transportar derivados de fármacos citostáticos y ABs, como es el caso del conjugado clorambucilo-ATC (Kullak-Ublick *et al.*, 1997) y conjugados con cisplatino, como el Bamet-R2 y el Bamet-UD2 (Briz *et al.*, 2002).

### 2.2.1.2. Sistemas independientes de sodio

A diferencia del transporte mediado por NTCP, la captación de compuestos colefilicos independiente de Na<sup>+</sup> no puede ser atribuida a la función de un único transportador, sino que la llevan a cabo varios sistemas de transporte situados en la membrana basolateral de los hepatocitos. El principal sistema encargado de la recaptación de ABs es el formado por la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs) (Hagenbuch *et al.*, 2003) codificados por la familia de genes *SLCO*, antes denominada *SLC21* (Hagenbuch *et al.*, 2004b). 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 estructuralmente diferentes, entre los que se encuentran ABs, colorantes orgánicos, bilirrubina (BR) conjugada o no conjugada, hormonas esteroideas, oligopéptidos de carácter aniónico y muchos fármacos entre los que destacan algunos de acción citostática como el metotrexato o el irinotecán (Hagenbuch *et al.*, 2004a). Además, algunos derivados de fármacos y ABs, como el clorambucilo-ATC (Kullak-Ublick *et al.*, 1997) o como los derivados del cisplatino (BAMETs) sintetizados por nuestro grupo de investigación (Briz *et al.*, 2002), también son sustratos de estos transportadores. Es por ello que se ha estudiado el posible papel de estos transportadores en ciertos tipos de cáncer.

La captación de ABs por los OATPs es cuantitativamente menos importante que la sodio-dependiente mediada por NTCP (Kullak-Ublick *et al.*, 2000). Sin embargo, ABs

primarios, como el AC y el AQDC, son captados por los hepatocitos principalmente a través de transportadores independientes de sodio como los OATPs (Meier *et al.*, 2002).

Hasta el momento se han identificado 52 miembros de esta familia, de los que 11 se encuentran en humanos (Hagenbuch *et al.*, 2004b). En el hígado humano están expresadas fundamentalmente las isoformas, OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*), OATP1A2 (*SLCO1A2*) y OATP2B1 (*SLCO2B1*) (Kullak-Ublick *et al.*, 2001; Hagenbuch *et al.*, 2003).

El OATP1A2 humano consta de 670 aminoácidos, 12 dominios transmembrana y 7 potenciales sitios de glicosilación. El ARNm de OATP1A2 codifica un polipéptido de 59 kDa (Kullak-Ublick *et al.*, 1995). Está presente en hígado, intestino, riñón, pulmón, cerebro y testículos, principalmente. Transporta ABs no conjugados como el AC, ABs conjugados como el ATC, y aniones orgánicos divalentes como la BR y el verde de indocianina (Kullak-Ublick *et al.*, 2001), además de una amplia variedad de sustratos como glicósidos cardiotónicos u hormonas esteroideas. Se encuentra poco expresado en los hepatocitos adultos, por lo que tiene poca importancia en la captación de ABs de la sangre sinusoidal. Sin embargo, su expresión en células del epitelio biliar parece tener un papel fundamental en la reabsorción de ABs desde la bilis hacia el plexo capilar periductular.

Otro miembro de la familia OATP es el OATP1B1 humano (Abe *et al.*, 1999), también llamado anteriormente LST-1, OATP2 u OATP-C. Este transportador presenta una similitud del 62% con Oatp1b2 de rata y se expresa de forma casi exclusiva en el hígado. Posee 691 aminoácidos, un peso molecular de 79 kDa y 12 dominios transmembrana, con 7 potenciales sitios de glicosilación. Junto con NTCP, OATP1B1 parece ser el principal transportador hepático de aniones orgánicos en humanos, y la isoforma más relevante, por tanto, en la captación de ABs a nivel hepático. Posee un amplio espectro de especificidad de sustrato, transportando, además de ABs, esteroides conjugados, eicosanoides, hormonas tiroideas y algunas sustancias tóxicas como la faloidina (Meier-Abt *et al.*, 2004).

También pertenece a esta familia el transportador OATP1B3, que presenta una similitud estructural del 80% con respecto a OATP1B1. Experimentos en los que se transfectaron células de mamífero con un plásmido que contenía la ORF ("open reading frame") del OATP1B3 evidenciaron que los ABs no eran reconocidos como sustratos de esta proteína, aunque compartía afinidad con el OATP1B1 por la BSP. Finalmente, los ABs fueron identificados como ligandos de baja afinidad mediante estudios 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 de trofoblasto (St-Pierre *et al.*, 2002; Briz *et al.*, 2003), por lo que podría desempeñar un papel importante en la captación de ABs de la 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 de OATP) en la captación de ABs. Por ejemplo el OATP4A1 (anteriormente denominado OATP-E), cuyo ARNm se ha detectado en hígado humano y se ha definido como un transportador de hormonas tiroideas, aunque se ha sugerido que interviene en la captación de ABs (Abe *et al.*, 2001). Sin embargo, la isoforma OATP2B1 no transporta ABs (Tamai *et al.*, 2000; Kullak-Ublick *et al.*, 2001)

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 (gen *Slco1a1*), Oatp1a4 (gen *Slco1a4*) y Oatp1b2 (gen *Slco1b2*).

Oatp1a1 fue el primer miembro de la familia de los Oatp clonado. Se trata de una glicoproteína con un peso molecular de 80 kDa formada por 670 aminoácidos y 12 dominios transmembrana hidrofóbicos (Jacquemin *et al.*, 1994), 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 Aubele *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). La especificidad de sustratos de ambas proteínas es muy similar, aunque no idéntica (Kullak-Ublick *et al.*, 2000). Destaca su elevada afinidad por la ouabaína, así como la capacidad única entre los OATPs de rata de transportar digoxina.

El tercer componente de la familia es Oatp1b2 (*Slco1b2*), ya que Oatp3 no se expresa en el hígado. Oatp1b2 es un 43% idéntico a Oatp1a1 y un 44% a Oatp1a4. La proteína Oatp1b2 transporta preferentemente ATC y se expresa casi exclusivamente en hígado (Meier *et al.*, 2002). Su expresión puede estar afectada en la colestasis biliar obstructiva y en la sepsis (Kakyo *et al.*, 1999). Un aspecto importante a tener en cuenta es que Oatp1a1 y Oatp1b2 difieren en 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 mecanismo de transporte de los Oatps/OATPs parece ser un intercambio de aniones, uniendo la captación celular de compuestos orgánicos con el eflujo de bicarbonato, glutatión reducido (GSH) y/o conjugados de glutatión (Satlin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Aunque el mecanismo exacto por el cual los OATP/Oatps median la captación de aniones orgánicos no se conoce con exactitud para todos ellos. Estudios con cultivos celulares 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 (Satlin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998).

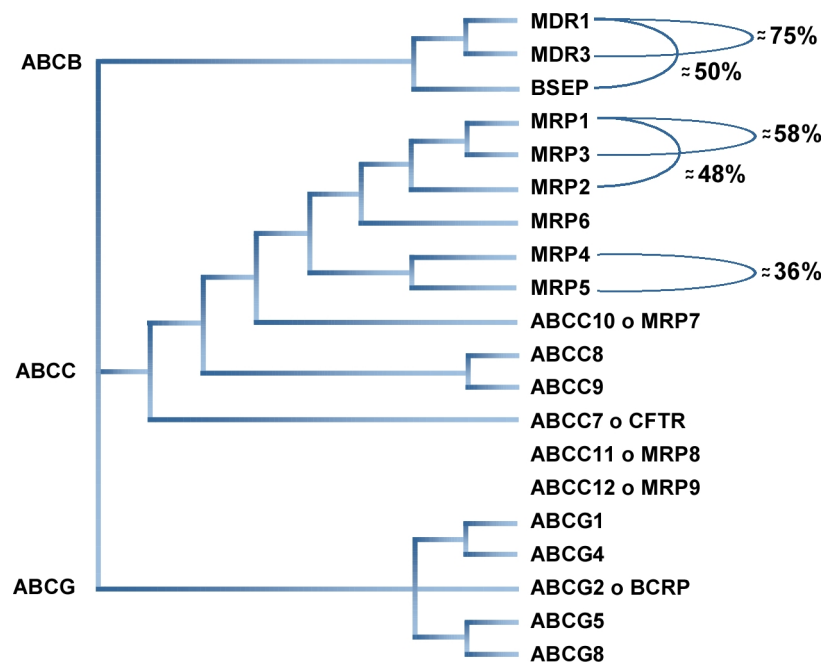
Por otra parte estudios realizados en oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban Oatp1a1 y Oatp1a4 se pudo determinar que el GSH intracelular jugaba un papel importante en el mecanismo de transporte de estas proteínas (Li *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1999).

Otros transportadores independientes de sodio presentes en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y que colaboran en la captación hepática de una gran variedad de moléculas orgánicas son los transportadores de aniones (OATs, de “Organic Anion Transporters”) o de cationes (OCTs, de “Organic Cation Transporters”) orgánicos, codificados por la familia de genes SLC22A (Suzuki *et al.*, 2000). OAT2 (SLC22A7) es el único de los transportadores de esta familia de genes que se expresa en el hígado humano y se cree que es específico de este órgano (Koepsell *et al.*, 2004). OCT1 (SLC22A1) está expresado en hígado, riñón, intestino delgado y colon.

## **2.2.2. Bombas exportadoras ABC**

Uno de los pasos limitantes en el conjunto de los procesos de transporte de los ABs desde la sangre hasta la bilis es la secreción a través de la membrana canalicular de los hepatocitos (Erlinger, 1982; Meier *et al.*, 1987). La mayoría de los sistemas de transporte canaliculares implicados en la formación de bilis pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (Gatmaitan *et al.*, 1995) que se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana capaces de translocar una gran variedad de sustancias a través de las membranas celulares utilizando la energía de la hidrólisis del ATP (Lage, 2003).

Se han caracterizado más de 48 genes ABC en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias (figura 3) basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean, 2005).



**Figura 3.** Filograma de algunos miembros de la subfamilia de proteínas ABC con el grado de similitud entre algunas de estas proteínas.

Estas proteínas participan en numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de esteroides, mecanismos inmunes y en el transporte de sustancias endógenas como azúcares, aminoácidos, metales, péptidos y proteínas (metabolitos hidrofóbicos), así como un gran número de compuestos exógenos.

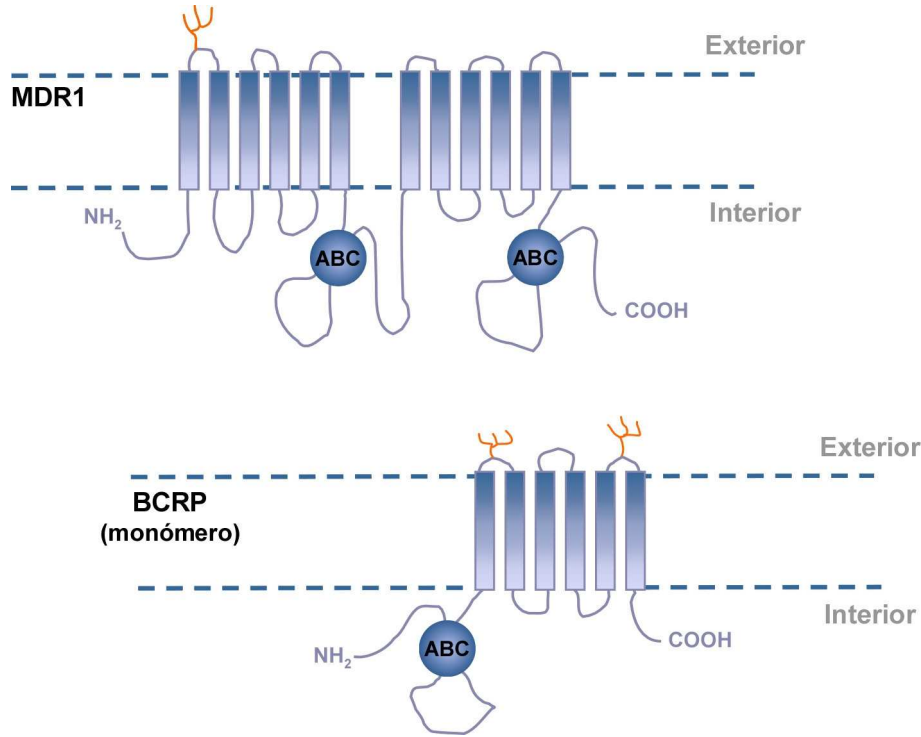
Las proteínas ABC están formadas por cuatro dominios, dos dominios transmembrana que median el transporte vectorial de los sustratos a través de las membranas celulares, y dos dominios de unión a nucleótidos (“Nucleotide-binding domain” o “ATP-binding cassette domains”), responsables de la unión e hidrólisis del ATP, y por tanto de generar la fuerza motriz para el transporte.

Debido a su sustrato común (ATP), los dominios de unión a nucleótidos contienen varias regiones conservadas: las regiones Walker A y Walker B, comunes a todas las proteínas ABC, y la denominada “ABC signature”, específica de cada subfamilia. Por el contrario, los dominios transmembrana, habitualmente formados por seis  $\alpha$ -hélices, presentan secuencias mucho más diversas que reflejan la gran diversidad de sustratos transportados por estas proteínas (Seeger *et al.*, 2009).

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). La figura 4 muestra un esquema de la topología en la membrana de un “full transporter” (MDR1) y un “half transporter” (BCRP).



**Figura 4.** Modelos topológicos de la estructura secundaria predicha para MDR1 (“full transporter”) y BCRP (“half transporter”). En naranja están representados los residuos glucídicos de estas glicoproteínas. ABC, dominio de unión a ATP o “ATP-binding cassette domain”.

El mecanismo de translocación de los sustratos de un lado a otro de la membrana es aún discutido. En general se acepta que el sustrato se une al sitio de máxima afinidad del transportador (bien desde el citosol o bien desde la membrana) y que tras la unión y/o la hidrólisis de 2 ATP (también denominado “ciclo catalítico de transportadores ABC”), la afinidad del sitio de unión al sustrato disminuye causando la liberación del mismo en el lado opuesto de la membrana (Seeger *et al.*, 2009).

Dependiendo de su localización en la membrana plasmática de los hepatocitos (figura 2), los transportadores ABC son responsables del eflujo de compuestos a la bilis, si se localizan en la membrana canalicular, o, si se encuentran localizados en la membrana basolateral, expulsan compuestos a la sangre. Dentro de los primeros destacan varios miembros de las subfamilias de genes *ABCB*, *ABCC* y *ABCG*. Por el contrario, los transportadores sinusoidales más relevantes pertenecen únicamente a la subfamilia *ABCC* (Marin *et al.*, 2008). 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.

### 2.2.2.1. La subfamilia ABCA

Hasta la fecha se han identificado 12 miembros de esta subfamilia de proteínas ABC en humanos (Albrecht *et al.*, 2007).

La proteína ABCA1 juega un papel fundamental en la formación de partículas HDL. Se expresa fundamentalmente en la membrana basolateral de las células del intestino (Ohama *et al.*, 2002), lo que sugiere un importante papel de esta proteína en la absorción del colesterol de la dieta (Wang *et al.*, 2000), y de los hepatocitos (Neufeld *et al.*, 2002), jugando, probablemente, un importante papel en la regulación de los niveles plasmáticos de HDL.

ABCA3 se expresa predominantemente en el pulmón (Klugbauer *et al.*, 1996; Connors *et al.*, 1997) donde se localiza en la membrana de los cuerpos lamelares de las células epiteliales alveolares tipo II (Yamano *et al.*, 2001; Mulugeta *et al.*, 2002) y donde parece que actúa como un transportador transmembrana de los componentes lipídicos del surfactante (Yoshida *et al.*, 2004). Recientemente se ha visto que mutaciones en esta proteína provocan deficiencias en el surfactante de los neonatos (Shulenin *et al.*, 2004).

El papel principal de las proteínas de la subfamilia ABCA parece ser por tanto el transporte de lípidos a través de la membrana plasmática y de orgánulos intracelulares. No obstante, se han encontrado líneas celulares resistentes a fármacos citostáticos que sobreexpresan ABCA2 (Laing *et al.*, 1998), ABCA3 (Wulf *et al.*, 2004) o ABCA6 (Islam *et al.*, 2003), lo que sugiere que los transportadores ABCA podrían participar en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral, probablemente mediando el almacenamiento de los fármacos en lisosomas y promoviendo su metabolismo o su expulsión de la célula (Albrecht *et al.*, 2007).

### 2.2.2.2. La subfamilia ABCB

Una de los primeros transportadores ABC descritos y mejor caracterizado es MDR1 (de "Multidrug resistance protein 1", gen *ABCB1*) o P-glicoproteína (Pgp) (Juliano, 1976). Inicialmente se la identificó como la proteína de membrana plasmática responsable del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células tumorales (Goldstein *et al.*, 1991; Bosch *et al.*, 1996; Goldstein, 1996). En la actualidad está bien establecida su presencia en células sanas como en el borde en cepillo de los túbulos renales apicales, en la membrana canalicular de los hepatocitos, en la membrana apical de los enterocitos, en las membranas lumenares de las células endoteliales capilares del cerebro (Cordon-Cardo *et al.*, 1990), colangiocitos, pulmón, placenta y testículo (Chan *et al.*, 2004). También se encuentra en muchos tumores de origen epitelial, en los que la sobreexpresión de esta proteína es uno de los mecanismos por los que las células tumorales desarrollan resistencia a múltiples fármacos (Marin *et al.*, 2009).

En un intento de revertir la resistencia a la quimioterapia mediada por la glicoproteína P, se han desarrollado varios tipos de moléculas moduladoras de la actividad transportadora de esta proteína ABC. Los primeros que se utilizaron fueron los moduladores de primera generación, sustratos de la MDR1 que inhiben competitivamente el eflujo de otros fármacos de la célula, como la ciclosporina A (Baggetto *et al.*, 1998). Los ensayos clínicos demostraron que estos fármacos tenían un bajo índice terapéutico y elevada toxicidad. Los moduladores de segunda generación, inhibidores no competitivos de la MDR1, como el verapamilo y derivados de la quinina, eran menos tóxicos, aunque sólo conseguían revertir parcialmente la resistencia (Nobili *et al.*, 2006). Por último, se están investigando los moduladores de tercera generación, moléculas que estructuralmente pertenecen a grupos de fármacos transportados por la MDR1, pero que no son sustratos de este transportador, como las epotilonas, algunos taxanos y bloqueantes alfa y beta adrenérgicos (Nobili *et al.*, 2006), así como el uso de anticuerpos monoclonales anti-MDR1 y oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión del gen *ABCB1* (Kuss *et al.*, 2002).

Dada su característica distribución, MDR1 está implicada en los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución y eliminación de fármacos (Schinkel, 1998; Fromm, 2004). Sin embargo, a pesar de que se ha convertido en la proteína modelo en muchos de los estudios de caracterización del mecanismo de transporte de las bombas ABC (Seeger *et al.*, 2009), su papel en la formación de la bilis aún no está del todo esclarecido, aunque se sabe que contribuye a la excreción canalicular de fármacos y otros xenobióticos.

MDR1 está implicada, sobre todo, en el transporte de cationes orgánicos hidrofóbicos (Muller *et al.*, 1994). Además de multitud de fármacos incluyendo glucósidos cardiotrópicos, antihistamínicos, analgésicos narcóticos o inmunosupresores (Matheny *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2004), son sustratos de MDR1 varios fármacos antitumorales como metotrexato, análogos de bases púricas, paclitaxel, alcaloides de la vinca, tamoxifeno, amsacrina, bisantreno, antraciclinas, mitoxantrona, camptotecinas, podofilotoxinas e imatinib (Marin *et al.*, 2009).

Se han descrito varios polimorfismos en el gen *ABCB1* que afectan a la función de MDR1 y modifican la biodisponibilidad de muchos fármacos (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Además es interesante señalar que existe una coordinación entre la actividad transportadora de la MDR1 y de las enzimas de fase I y II, como las de la familia del citocromo P450 (CYP) y glutatión-S-transferasas (Gatmaitan *et al.*, 1993). En particular, la isoforma CYP3A4, una de las más abundantes en el hígado, junto con la MDR1 se consideran piezas clave en el efecto de primer paso que sufren muchos fármacos (Schuetz *et al.*, 1996), reduciendo su biodisponibilidad a menos de un 50% (Wacher *et al.*, 1998).

Otro miembro de esta familia involucrado en la secreción de compuestos colefilicos al canalículo biliar es MDR3 (gen *ABCB4*), también denominada Mdr2 en roedores (Smit

*et al.*, 1993). Esta proteína está implicada en la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana canalicular de los hepatocitos (Ruetz *et al.*, 1994), un papel fundamental para neutralizar el efecto detergente de los ABs, presentes en la bilis a una concentración elevada. La MDR3 parece que también es capaz de transportar algunos xenobióticos, entre ellos paclitaxel y vinblastina, aunque con una eficacia menor que la de MDR1 (Smith *et al.*, 2000).

Otra ATPasa localizada en la membrana canalicular de los hepatocitos y que también transloca fosfolípidos de una cara a otra de la membrana es FIC1. Esta proteína no es un miembro de la familia ABC sino que se trata de una ATPasa de tipo II que transloca aminofosfolípidos de la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática, modulando la asimetría de la misma (Mouro *et al.*, 1999).

La bomba exportadora de sales biliares (BSEP; gen *ABCB11*) es una glicoproteína de 140 kDa que se considera el principal mecanismo de secreción de ABs monoaniónicos conjugados a bilis, mostrando una mayor afinidad por ATQDC>ATC>ATUDC>AGC (Gerloff *et al.*, 1998; Byrne *et al.*, 2002). Además de este papel clave en el transporte vectorial de ABs, se ha demostrado que también transporta algunos sustratos típicos de MDR1, entre ellos la vinblastina, aunque no otros como daunorrubicina y paclitaxel (Lecureur *et al.*, 2000). Por tanto, el papel de la BSEP en el aclaramiento hepático de fármacos antitumorales es considerablemente más limitado que el papel de MDR1.

Estudios mediante la técnica de Northern Blot han revelado que la expresión de la BSEP es predominantemente hepática, localizándose en las microvellosidades canaliculares y en vesículas subcanaliculares de los hepatocitos. Las mutaciones del gen *ABCB11* humano pueden determinar un subtipo de Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva o PFIC2 (“Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis 2”) que cursa con prurito extremo, retraso en el crecimiento y progresión hacia la cirrosis en la primera década de vida.

Las secuencias de aminoácidos tanto de MDR3 como de BSEP presentan un 75% y un 50% de similitud con la secuencia de aminoácidos de MDR1, respectivamente (Meier *et al.*, 2002). El buen funcionamiento coordinado de BSEP y MDR3 se relaciona con una adecuada formación de bilis así como con el mantenimiento de una correcta homeostasis lipídica (Meier *et al.*, 2002).

### **2.2.2.3. La subfamilia ABCC**

A principios de los años 90 se descubrió en humanos una proteína que confería a las células tumorales el fenotipo MDR y era diferente a la glicoproteína P. Se denominó proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos o MRP (del inglés “multidrug resistance-associated protein”) (Krishnamachary *et al.*, 1993).

Hasta el momento se han clonado y caracterizado trece miembros de la familia de proteínas MRP (Sheps *et al.*, 2007). Su estructura es similar a la de otros transportadores ABC, y se caracteriza por la presencia de dos dominios con seis segmentos transmembrana y dos dominios de unión de ATP. MRP1, 2, 3, 6 y 7 tienen, además, una región adicional llamada TMD0 en el extremo amino terminal, con cuatro (en MRP2) o cinco (en MRP1, 3, 6 y 7) segmentos transmembrana. MRP4, 5 y 8 carecen de este dominio TMD0, pero contienen el giro L0, que es un lazo citoplasmático unido al primer segmento transmembrana (Hipfner *et al.*, 1999).

La función principal de las MRPs es la protección frente a compuestos tóxicos, como metales pesados, toxinas y xenobióticos, entre los que se incluyen fármacos antitumorales. Las isoformas 1, 4 y 5 se distribuyen ampliamente en el organismo, mientras que MRP2 y 3 aparecen principalmente en el hígado, el riñón y el intestino (Lee *et al.*, 1998; Borst *et al.*, 1999). MRP1, 3, y 6 se localizan en la membrana plasmática basolateral de células polarizadas, para impedir que las sustancias potencialmente dañinas accedan al interior de la célula, mientras que MRP2, y probablemente MRP5, aparecen en la membrana apical para secretarlas, por ejemplo, en bilis o en orina. El nivel de expresión de MRP1, 3 y 4 en hepatocitos es muy bajo en individuos sanos, por lo que en circunstancias fisiológicas probablemente desempeñan un papel minoritario en el tráfico de diferentes compuestos a través del polo sinusoidal de los hepatocitos.

De esta subfamilia de transportadores ABC, MRP2 (gen *ABCC2*) es la que presenta una mayor expresión en hígado. Esta proteína, de aproximadamente 190 kDa, está localizada en el dominio apical de la membrana plasmática de células polarizadas, como los hepatocitos, epitelio del túbulo proximal renal y epitelio intestinal. Desempeña un papel fundamental en la destoxificación hepática mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky *et al.*, 1997), contribuyendo a la fuerza motriz que genera el flujo biliar. Su especificidad de sustrato es amplia, aunque tiene una mayor afinidad para los conjugados de glutatión, ácido glucurónico o sulfato y compuestos lipofílicos como leucotrieno C4, BR y algunos esteroides (Nies *et al.*, 2007). La Mrp2 de rata tiene capacidad de transportar ABs dianiónicos sulfatados (Akita *et al.*, 2001) y glucuronidados (Keppler *et al.*, 1997). No obstante, entre los sustratos de MRP2 también se encuentran algunos compuestos no conjugados, como BSP o metotrexato. El GSH, principal determinante del flujo de bilis independiente de los ABs, también es sustrato de MRP2 (Trauner *et al.*, 1998b). Esta proteína tiene una gran relevancia clínica, debido a su capacidad para conferir resistencia a una gran variedad de fármacos antitumorales en tumores sólidos. Aparece en carcinoma hepatocelular, de ovario, de riñón, en tumores colorrectales y de pulmón (Sandusky *et al.*, 2002). Entre los fármacos antitumorales transportados por MRP2 se encuentran: clorambucilo, ciclofosfamida, metotrexato, cisplatino, tamoxifeno, antraciclinas, camptotecinas y podofilotoxinas (Nies *et al.*, 2007).

La deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como el síndrome de Dubin-Johnson, provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de BR en sangre, debido al reflujo de estos compuestos desde los hepatocitos hacia la sangre sistémica mediado principalmente por MRP3 (*ABCC3*), localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos, como mecanismo compensatorio del deficiente eflujo apical mediado por MRP2 (Kartenbeck *et al.*, 1996).

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 ATSLC y el ATQDC, y monovalentes, como el ATC y el AGC (Hirohashi *et al.*, 1999; Hirohashi *et al.*, 2000), en el hombre, MRP3 únicamente transporta AGC con baja afinidad ( $K_m=0,248$  mM) (Zeng *et al.*, 2000).

Otro miembro de esta familia localizado en la membrana basolateral de los hepatocitos es MRP1 (*ABCC1*) que inicialmente se clonó de una línea tumoral resistente derivada de pulmón humano (Trauner *et al.*, 2003). Al igual que MRP2 tienen una gran relevancia clínica, debido a su capacidad para conferir resistencia a una gran variedad de fármacos antitumorales en tumores sólidos. Aparece en carcinomas gástricos, de próstata, o de mama (Bakos *et al.*, 2007). En tumores colorrectales y de pulmón ambas MRPs están presentes (Sandusky *et al.*, 2002; Bakos *et al.*, 2007).

MRP1 está implicada fundamentalmente en el transporte de compuestos hidrofóbicos neutros y presenta una alta afinidad para los conjugados de glutatión, ácido glucurónico o sulfato. MRP1 transporta fármacos antitumorales, entre los que se encuentran: oxazafosforinas, alcaloides de la vinca, metotrexato, antraciclinas mitoxantrona, camptotecinas, podofilotoxinas y mostazas nitrogenadas, como el clorambucilo (Bakos *et al.*, 2007).

Tanto MRP1 como MRP3 también participan en el transporte de glucurónidos y conjugados de glutatión de distintos compuestos exógenos (Akita *et al.*, 2001).

En condiciones normales se encuentra poco expresada en hígado y transporta ABs dianiónicos como ATSLC y ATQDC (Trauner *et al.*, 2003). Pero cuando la ruta de excreción biliar no es funcional, como ocurre en colestasis o endotoxemia, se induce la expresión de MRP1 y MRP3 (Vos *et al.*, 1998; Donner *et al.*, 2001; Soroka *et al.*, 2001). Este hecho, no es más que una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefilicos, mediante su transporte de nuevo a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka *et al.*, 2002).

Recientemente se ha demostrado que MRP4 (*ABCC4*) cotransporta ABs junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius *et al.*, 2003; Rius *et al.*, 2006), además de distintos fármacos como análogos de nucleótidos, como la lamivudina, y antitumorales, como el metotrexato, entre otros (Borst *et al.*, 2000). MRP4 presenta una alta afinidad por los conjugados con glicina y taurina de los ácidos AQDC, AQC y AUDC, además



del AC (Rius *et al.*, 2003; Rius *et al.*, 2006). Estudios de inhibición del transporte sugieren que los derivados sulfatados también podrían ser sustratos de esta bomba (Zelcer *et al.*, 2003).

Otros transportadores de esta subfamilia cuya expresión también se ha encontrado en los hepatocitos son MRP6 (*ABCC6*), MRP7 (*ABCC10*) y MRP8 (*ABCC11*). MRP6 se ha caracterizado como un transportador basolateral y canalicular en hepatocitos de rata (Madon *et al.*, 2000). Aunque se han encontrado niveles elevados del ARNm de MRP6 en hígado humano, su papel en el transporte de fármacos no está claro (Bergen *et al.*, 2007). Parece que no está implicada en el transporte de productos de biotransformación de fase II como conjugados con ácido glucurónico, sulfato o glutation, aunque tiene capacidad de transportar cisplatino, doxorubicina o etopósido (Belinsky *et al.*, 2002). Menos conocidos son MRP7 y MRP8. El ARNm de MRP7 se ha encontrado en numerosos tejidos, incluyendo el hígado, y transporta algunos fármacos antitumorales como paclitaxel y vincristina (Hopper-Borge *et al.*, 2004). El ARNm de MRP8 se ha detectado a bajos niveles en el hígado y entre sus sustratos se encuentran fármacos como el metotrexato y el fluorouracilo (Guo *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

#### **2.2.2.4. La subfamilia ABCG**

Los miembros de esta familia son “half transporters”, que como ya se ha mencionado forman dímeros (homo o heterodímeros) mediante puentes disulfuro para dar lugar a un complejo de transporte funcional capaz de expulsar fuera de la célula una amplia variedad de sustratos utilizando la energía desprendida de la hidrólisis del ATP.

La mayoría de los miembros de esta subfamilia, como ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8, son bombas exportadoras de colesterol (Kusuhara *et al.*, 2007). Los que presentan una mayor expresión en los hepatocitos son los transportadores ABCG5 y ABCG8, que forman un heterodímero localizado en la membrana canalicular (Graf *et al.*, 2003), que promueve la excreción biliar de esteroides neutros (Wittenburg *et al.*, 2002).

BCRP (de “Breast cancer resistance protein”; gen *ABCG2*) es otro miembro de esta familia de transportadores, que presenta una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto, incluyendo una gran variedad de fármacos antitumorales. Desempeña un papel importante en la biodisponibilidad y eliminación hepática de fármacos y en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral (Kusuhara *et al.*, 2007). BCRP se localiza en la membrana plasmática y su distribución tisular es casi ubicua destacando su expresión en placenta, cerebro, riñón, hígado y colon (Allikmets *et al.*, 1998).

Mientras que la heteromerización de ABCG5/ABCG8 es esencial para su tráfico y localización en la membrana plasmática (Graf *et al.*, 2003), el estado de oligomerización de BCRP en la membrana aún no se ha establecido definitivamente (Kage *et al.*, 2002; Litman *et al.*, 2002; McDevitt *et al.*, 2009). Inicialmente se sugirió que la unidad funcional mínima de BCRP era un homodímero. Frente a este sencillo modelo de homodimerización, han surgido nuevas evidencias que indican que BCRP podría formar oligómeros de mayor entidad en la membrana (Xu *et al.*, 2004; McDevitt *et al.*, 2006).

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-3-sulfato y DHEAS (Imai *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004; Janvilisri *et al.*, 2005), y porfirinas (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Además, tiene capacidad para transportar una gran variedad de fármacos antitumorales como oxazafosforinas, metotrexato, flavopiridol, tamoxifeno, bisantreno, doxorubicina, mitoxantrona, camptotecinas, etopósido e imatinib (Kusuhara *et al.*, 2007).

Se han descrito varios polimorfismos en la proteína que afectan a la expresión, localización y actividad transportadora de la misma, alterando la farmacocinética y el espectro de resistencia a fármacos antitumorales (Yanase *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2007).

## **2.3. TRANSPORTADORES EXTRAHEPÁTICOS DE ANIONES ORGÁNICOS**

### **2.3.1. Transporte intestinal**

Los ABs, una vez alcanzan el lumen intestinal, deben ser transportados por los enterocitos hasta la circulación portal para retornar al hígado y ser de nuevo excretados a bilis. El transporte de ABs por las células del epitelio intestinal se produce en tres pasos: captación apical, transporte intracelular y eflujo basolateral.

La captación de ABs libres desde el lumen intestinal por la membrana apical de los enterocitos ocurre mayoritariamente por difusión pasiva a lo largo de todo su recorrido. Sin embargo, el transporte de ABs conjugados, impermeables para las membranas celulares, requiere de un mecanismo dependiente de sodio.

El principal transportador de ABs a nivel de la membrana apical del ileocito es el denominado ASBT (del inglés "Apical Sodium Bile Salt Transporter") o IBAT (del inglés "Intestinal Bile Acid Transporter") (Craddock *et al.*, 1998) perteneciente a la familia de proteínas SLC10A (gen SLC10A2). Se trata de una proteína de 348 aminoácidos y aproximadamente 50 kDa, con 9 dominios transmembrana y relacionada estructuralmente con NTCP. Se expresa fundamentalmente en el íleon distal. Su



expresión es máxima a nivel de la válvula ileocecal, disminuye a medida que nos alejamos de ésta y es prácticamente inexistente desde la mitad del intestino delgado hasta las zonas más próximas al píloro (Shneider *et al.*, 1995). Aparece también en los túbulos renales proximales y en colangiocitos, aunque con niveles de expresión mucho más bajos que en íleon.

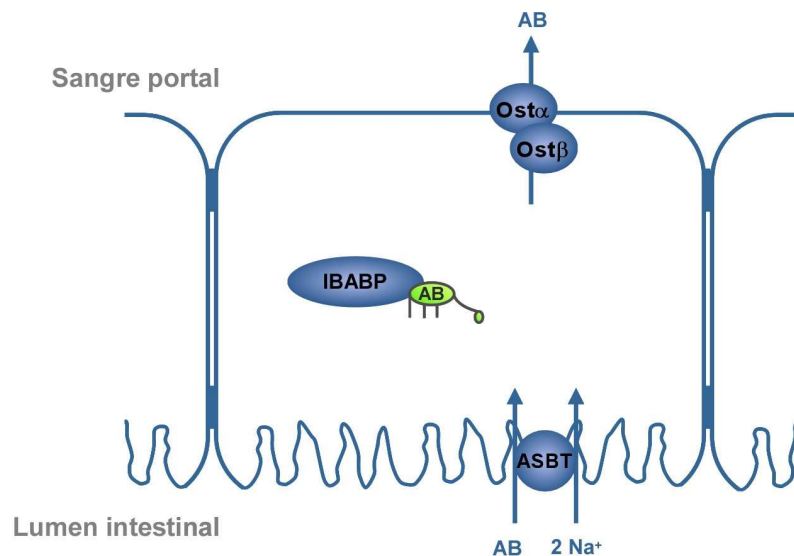
Esta proteína es un sistema electrogénico de cotransporte de dos iones sodio y un AB, capaz de transportar todo tipo de ABs aunque con preferencia por los ácidos trihidroxilados frente a los dihidroxilados, y por los AB conjugados frente a los no conjugados (Craddock *et al.*, 1998).

Se han descrito, en pacientes con hipertrigliceridemia tipo IV, varias mutaciones en el gen *SLC10A2* que afectan a la expresión y actividad transportadora de la proteína, alterando la absorción de AB (Hagenbuch *et al.*, 2004a).

En cuanto al movimiento transcelular de ABs a través de las células del epitelio intestinal, el transportador más importante es una proteína asociada a ASBT denominada IBABP (del inglés "Ileal Bile Acid Binding Protein") perteneciente a una familia de proteínas intracelulares de unión a lípidos que transportan ácidos grasos, retinoides, colesterol y ABs (Trauner *et al.*, 2003). IBABP es una proteína citoplasmática de unos 14-15 kDa capaz de unirse reversiblemente a los ABs, una vez éstos han entrado en la célula, y transportarlos a través del interior celular (Trauner *et al.*, 2003). Su expresión está casi restringida al íleon, apareciendo también, aunque con niveles de expresión bajos, en los colangiocitos (Lin *et al.*, 1990).

Los ABs hidrofóbicos pueden estimular la expresión de esta proteína de unión a ABs en el íleon, a través de su acción sobre el receptor nuclear de ABs FXR (Meier *et al.*, 2002). La mayoría de estudios realizados indican que la expresión intestinal de ASBT e IBABP debe estar bajo el control de similares, aunque no idénticos, factores de transcripción (Meier *et al.*, 2002).

El eflujo de ABs a través de la membrana basolateral de los enterocitos tiene lugar a través de un mecanismo independiente de sodio. El complejo denominado OST (del inglés "Organic Solute Transporter") formado por dos subunidades, OST- $\alpha$  y OST- $\beta$ , se encarga de este transporte (Dawson *et al.*, 2005), expulsando al torrente sanguíneo ABs y otros esteroides sulfatados mediante un mecanismo de difusión facilitada (Ballatori, 2005; Ballatori *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2005) que puede ser inhibido por otros esteroides y compuestos aniónicos. Su expresión está ampliamente distribuida en humanos, con niveles elevados en intestino delgado, testículo, colon, hígado, riñón, ovario y glándula adrenal (Seward *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Representación esquemática de los sistemas de transporte implicados en la captación y secreción intestinal de ABs.

### 2.3.2. Transporte pulmonar

Las necesidades respiratorias hacen que el epitelio pulmonar sea la mayor superficie del organismo expuesta a su entorno, por lo que el sistema respiratorio está continuamente expuesto a una gran variedad de sustancias potencialmente tóxicas presentes en el aire inhalado. Aunque muchas de estas partículas son eliminadas en la parte superior del tracto respiratorio, gracias al movimiento de los cilios de las células del epitelio, deben existir sistemas de protección localizados en la parte más distal de las vías aéreas que protejan al tejido frente a estas sustancias potencialmente dañinas para él.

El surfactante pulmonar, con actividad bactericida, y los macrófagos alveolares juegan un papel crucial en la defensa del sistema respiratorio. Por otra parte, muchas de las proteínas transportadoras expresadas en el hígado, el intestino, o el riñón, implicadas en la fisiología y fisiopatología de estos órganos, están también presentes en el pulmón, y parece que podrían contribuir a su protección frente tóxicos endógenos y exógenos (Scheffer *et al.*, 2002c), además de encargarse del transporte de moléculas convencionales y terapéuticas a través del epitelio respiratorio.

En el pulmón se encuentran expresados fundamentalmente transportadores de captación pertenecientes a las familias OCT (del inglés “organic cation transporters”), OAT (del inglés “organic anion transporter”) y OATP y bombas de eflujo de la superfamilia de transportadores ABC (Langmann *et al.*, 2003).

Debido a su potencial papel limitando el transporte de fármacos inhalados y en la etiología de diferentes patologías pulmonares, la función y expresión de las proteínas ABC ha sido más estudiada.

MDR1 se encuentra localizada en la membrana apical de las células del epitelio bronquial y bronquiolar (Lechapt-Zalcman *et al.*, 1997; Scheffer *et al.*, 2002c), en el endotelio pulmonar (Schinkel *et al.*, 2003) y en los macrófagos alveolares (van der Valk *et al.*, 1990; Scheffer *et al.*, 2002c), y parece jugar un papel importante en la defensa frente a tóxicos ambientales y en el transporte de compuestos desde el intersticio pulmonar hasta el lumen alveolar. Incluso se ha sugerido su implicación en el control del volumen celular a través de canales de cloruro (Valverde *et al.*, 1992), aunque su papel en este proceso no está del todo esclarecido (Higgins, 1995).

No existen muchos estudios en cuanto a los cambios de expresión de esta proteína en diferentes patologías pulmonares, pero algunos de ellos sugieren una sobreexpresión de MDR1 en el pulmón de fumadores (Ruparelia *et al.*, 2008), así como en el tejido de pacientes tratados con glucocorticoides (Henriksson *et al.*, 1997; Demeule *et al.*, 1999). Parece, por otra parte, que la expresión de MDR1 podría incrementar las propiedades invasivas de tumores pulmonares (Beer *et al.*, 1996), aunque existen estudios que indican que los niveles de expresión de MDR1 en este tipo de tumores no son relevantes (Wood *et al.*, 1998).

La fibrosis quística es un desorden congénito causado por una mutación en el gen *CFTR*, que codifica para una proteína de la familia de transportadores ABC localizada en la cara luminal de las glándulas submucosas, la membrana apical de las células epiteliales y alveolares de tipo I y la mucosa nasal (Denning *et al.*, 1992; Puchelle *et al.*, 1992; Engelhardt *et al.*, 1994; Kalin *et al.*, 1999; Wioland *et al.*, 2000), regulando el transporte de iones. Debido a la gran similitud estructural entre las proteínas CFTR y MDR1, se ha sugerido que algunas de las funciones alteradas de CFTR podrían ser compensadas por la sobreexpresión de MDR1 en pacientes con fibrosis quística (Lallemand *et al.*, 1997; Naumann *et al.*, 2005).

MRP1 se encuentra bastante expresada en el tejido pulmonar, localizándose fundamentalmente en la membrana basolateral de las células ciliadas y secretoras del epitelio bronquial (Brecht *et al.*, 1998) y en macrófagos alveolares (Scheffer *et al.*, 2002c), por lo que sus funciones pueden incluir la eliminación de tóxicos acumulados en el lumen hacia el líquido intersticial o la participación en la respuesta inflamatoria.

Parece además, que MRP1 juega un importante papel en la defensa antioxidante frente a los compuestos tóxicos contenidos en el humo del tabaco. Así su expresión se encuentra disminuida en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lo que se relaciona con una función pulmonar disminuida (van der Deen *et al.*, 2006) y confirma el papel protector de MRP1 frente al daño celular inducido por el tabaco y su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (van der Deen *et al.*, 2007; van der Deen *et al.*, 2008). Por otra parte, la sobreexpresión de MRP1 parece jugar un papel importante en la proliferación y la invasividad de las células de tumores pulmonares no microcíticos, además de ser un

importante factor de resistencia a la quimioterapia en este tipo de cáncer (Doubre *et al.*, 2005).

Los datos existentes en la bibliografía en cuanto a la presencia de MRP2 y MRP3 en el pulmón son escasos y contradictorios. Aunque la mayoría de los estudios descartan su expresión en este tejido, otros parecen localizarlas en la membrana apical y basolateral, respectivamente, de las células del epitelio bronquial (Scheffer *et al.*, 2002c), por lo que, de encontrarse allí, podrían estar implicadas en el transporte de compuestos nocivos hacia el lumen pulmonar.

Estudios de PCR cuantitativa e inmunolocalización han determinado la presencia de MRP4 y MRP5 en el tejido pulmonar (Borst *et al.*, 2000; Langmann *et al.*, 2003; Torkey *et al.*, 2005), aunque su papel fisiológico en este órgano aún no se conoce. Podrían funcionar como bombas de eflujo de nucleósidos a baja afinidad, probablemente de una manera independiente de GSH (Jedlitschky *et al.*, 2000; Wielinga *et al.*, 2003). En el pulmón de pacientes asmáticos y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica se han encontrado elevados niveles de AMP, por lo que MRP4 y MRP5 podrían jugar un papel clave en el desarrollo y tratamiento de estas enfermedades (van den Berge *et al.*, 2004). Por otra parte, parece que estos transportadores están implicados en el desarrollo de resistencia a fármacos derivados del platino en tumores de pulmón (Suzuki *et al.*, 2001; Savaraj *et al.*, 2003; Szakacs *et al.*, 2004).

Los niveles de BCRP en el pulmón son menores que los encontrados para MDR1 o MRP1 pero detectables en la capa de células epiteliales y en las glándulas seromucosas (Scheffer *et al.*, 2002c). Está ausente en macrófagos alveolares, lo que sugiere que BCRP no juega un papel importante en la respuesta inflamatoria del tejido pulmonar. Las células endoteliales de los pequeños capilares también son positivas para BCRP, indicando que este transportador podría proteger al pulmón frente a compuestos nocivos que llegan al tejido a través de la circulación sistémica.

La proteína ABCA1 controla el transporte de fosfolípidos y colesterol a la apolipoproteína I en las células alveolares tipo II. Además, está implicada en el transporte basolateral de surfactante activado por oxisteroles (Agassandian *et al.*, 2004). Estudios realizados con ratones “knockout” que carecen de este transportador han demostrado que estos animales acumulan precursores del colesterol en plasma, intestino, heces y pulmón (Drobnik *et al.*, 2001) y presentan numerosas alteraciones a nivel pulmonar que afectan a la estructura del parénquima pulmonar, los macrófagos alveolares y los pneumocitos de tipo II, que presentan cuerpos lamelares anómalos (McNeish *et al.*, 2000).

Como ya se ha comentado en este texto, ABCA3 está presente casi exclusivamente en el pulmón, localizándose en los cuerpos lamelares de los pneumocitos de tipo II (Langmann *et al.*, 2003). Su función no se conoce bien, pero su elevada expresión en estas células sugiere que pueda jugar un papel importante en la regulación de la composición y función del surfactante (Yamano *et al.*, 2001), probablemente

participando en el metabolismo de los fosfolípidos. De hecho, se ha demostrado que mutaciones en el gen *ABCA3* están asociadas con deficiencias en el surfactante pulmonar y diferentes patologías pulmonares neonatales severas (Shulenin *et al.*, 2004).

En cuanto a las proteínas de la familia OATP, encargadas de mediar la absorción de aniones orgánicos endógenos y exógenos, el análisis de muestras de tejidos humanos indica que las dos isoformas mayoritarias en el hígado, OATP1B1 y OATP1B3, así como OATP1A2, OATP1C1, OATP5A1 y OATP6A1 no se expresan en el pulmón (Konig *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000; Pizzagalli *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004b; Bleasby *et al.*, 2006), aunque se han encontrado elevados niveles de OATP2B1, OATP3A1 y OATP4A1, y moderados en el caso de OATP4C1 (Tamai *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001; Kullak-Ublick *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003; Bleasby *et al.*, 2006). También se ha encontrado expresión de *Oatp2b1* y *Oatp3a1* en el pulmón de ratas (Nishio *et al.*, 2000; Adachi *et al.*, 2003; Bleasby *et al.*, 2006). No se sabe nada, sin embargo, sobre la localización celular de estos transportadores en el tejido pulmonar, ni los sustratos que cada una de ellas puede transportar.

Las células alveolares de tipo II son relativamente resistentes al daño oxidativo jugando un papel clave en la regeneración del epitelio alveolar tras una agresión de este tipo. Parece que pneumocitos tipo II y macrófagos alveolares poseen sistemas de transporte específicos para la captación de ácido ascórbico, de manera que la acumulación de este conocido antioxidante explicaría en parte la mayor resistencia de estas células al daño oxidativo. Así se han encontrado elevados niveles de expresión de la proteína SVCT2 (*SLC23A2*) en tejido pulmonar, y mucho menores para la isoforma SVCT1 (*SLC23A1*). Parece por tanto que SVCT2 tiene una mayor importancia en el transporte de ácido ascórbico en este tejido, y su defensa antioxidante a través de esta vía. Por otra parte se ha demostrado que ratones “knockout” para *Svct2* desarrollan un fallo respiratorio asociado a una producción anormal de proteína B del surfactante y una ausencia de expansión pulmonar postnatal.

## **2.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS**

La expresión de los transportadores de aniones orgánicos está sujeta a una compleja regulación transcripcional que, tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas, depende de múltiples factores, como el nivel de ABs, determinados metabolitos, citocinas pro-inflamatorias, hormonas y diferentes fármacos.

Aunque se desconocen aún muchos aspectos del control transcripcional de dichos transportadores, se sabe que está determinado por muchos elementos de respuesta en la zona del promotor (regulación en *cis*) así como por los factores de transcripción

complementarios disponibles para interactuar con estos elementos (regulación en *trans*). La presencia de estos factores está influenciada por condicionantes del medio intra y extracelular, y estos pueden variar en gran medida en la vida de una célula. La formación de complejos multiproteicos dinámicos, que viene condicionada por la arquitectura del promotor y modulada por diferentes señales, conduce a profundos cambios en la activación o represión del gen en cuestión.

### 2.4.1. Regulación en *cis*

El nivel de expresión de los genes está estrechamente controlado por la interacción de factores de transcripción con secuencias específicas localizadas en las regiones promotoras de los genes. Estas regiones del ADN, llamadas elementos reguladores *cis*, son secuencias diana para la unión de los factores de transcripción que actúan en *trans*, ya sean de la maquinaria transcripcional básica o de regulación de la misma.

Podemos distinguir dos clases de elementos en función de su posición relativa:

- Cerca del sitio de inicio de la transcripción se localizan secuencias que interactúan físicamente con proteínas que ayudan a la unión de la ARN polimerasa II a su promotor. El promotor mínimo es la región más próxima al sitio de inicio de la transcripción. Es incapaz por sí mismo de mediar una transcripción eficaz, y precisa para ello de elementos proximales, localizados a unas 100-200 pb del sitio de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT, un segmento rico en GC y la secuencia TATA, ausente en el promotor de las proteínas ABC, funcionan como estos elementos.
- Existen además, secuencias con una localización más distal, situadas a veces a miles de pares de bases de la región promotora y pueden operar “aguas arriba” o “aguas abajo” del promotor al que controlan. Son las denominadas regiones intensificadoras o “enhancers”, aunque existen también secuencias con una función silenciadora, a las que se unen represores, inhibiendo a los activadores, o reduciendo el nivel de transcripción.

### 2.4.2. Regulación en *trans*

La regulación transcripcional de la expresión génica, requiere la participación de un gran número de factores nucleares que actúan como factores de transcripción, cofactores transcripcionales, factores remodeladores de la cromatina y otras proteínas de unión a secuencias específicas de ADN, que interactúan de forma muy compleja.

Son las proteínas reguladoras en *trans*, que operan uniéndose específicamente a secuencias diana del ADN, formando, junto con la ARN polimerasa II, el complejo de iniciación.

Algunos de estos factores pueden actuar como sensores de diferentes metabolitos y compuestos endógenos (LXR, FXR, CAR, SREBP, PPARs), xenobióticos (PPARs, PXR), estrés oxidativo (NF-kappa B, AP-1), o de daños en el ADN (p53). Los cambios en los niveles celulares y actividad de estos factores determinan la localización tisular, o el desarrollo de respuestas efectivas ante situaciones de estrés celular, de aquellos genes que contengan elementos de respuesta específicos para estos factores en su promotor.

Numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años han permitido caracterizar un gran número de proteínas de unión a ADN implicadas en la regulación de la expresión de los transportadores de aniones orgánicos, así como las secuencias de ADN con las que interactúan estos factores. Estas proteínas poseen características estructurales comunes, como la existencia de un dominio polipeptídico de unión al ADN, capaz de interactuar con el surco mayor de la doble hélice de ADN, y que puede estar formado por diferentes motivos (hélice-giro-hélice, doble hélice  $\alpha$ , dedos de zinc, etc).

#### 2.4.2.1. Receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción que, por medio de su unión a un ligando, adquieren la capacidad de activar o inhibir la transcripción de genes. Constituyen una superfamilia formada por más de 150 miembros (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Blumberg *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 1999). En general, estas proteínas contienen un dominio N-terminal de transactivación independiente de ligando, un dominio central de unión al ADN, una región intermedia flexible que permite que el receptor forme un dímero y se una simultáneamente al ADN, y finalmente, una amplia región C-terminal que contiene el dominio de unión a ligando, la región de dimerización y la región de activación dependiente de ligando (Aranda *et al.*, 2001; Chawla *et al.*, 2001).

Los receptores nucleares llevan a cabo su acción por unión a zonas reguladoras específicas del gen diana, que reciben el nombre de *elementos respuesta*. En general, estos elementos respuesta son 2 secuencias de 6 pares de bases separadas por entre 0 y 8 nucleótidos, organizadas como repeticiones (directas, invertidas o evertidas), cuya especificidad se basa tanto en la secuencia, como en la orientación y en el espacio entre dichas repeticiones. Los receptores nucleares se unen a estos elementos de respuesta en el ADN en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros (Aranda *et al.*, 2001).

Los receptores nucleares se pueden clasificar en dos grupos:

- Tipo I o receptores clásicos: activados por su unión a esteroides. Son los receptores de las hormonas esteroideas. Actúan como homodímeros que, una vez activados, se unen a los elementos respuesta, formados por repeticiones invertidas separadas por 3 nucleótidos.



- Tipo II o receptores no esteroideos: entre los que destacan los que unen ácido retinoico (RAR, "Retinoic acid receptor"), hormonas tiroideas, vitamina D (VDR), pregnano (SXR, "Steroid X receptor"), androstano (CAR, "Constitutive androstane receptor"), oxisteroles (LXR) y ABs (FXR) y además, el receptor de activación de los peroxisomas (PPAR). Actúan como heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR, "Retinoic X receptor") y sus elementos respuesta están formados por repeticiones de tipo directo o invertido.

Además de estos receptores nucleares, activados por su unión a determinados ligandos, hay otros factores pertenecientes a la familia "hepatocyte nuclear factor" (HNF) que también parecen tener una importante función en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras hepáticas.

La expresión de un receptor nuclear está condicionada al tipo celular, al periodo de vida del individuo y de la célula, al promotor, al elemento respuesta al que se una y a la posible existencia de otras señales (Smirlis *et al.*, 2001).

La unión de constituyentes de la bilis (como ABs o BR), de productos del metabolismo lipídico (como los oxisteroles) o de xenobióticos (como fármacos) a receptores nucleares modula la expresión de los transportadores y del metabolismo de estos compuestos en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, aumentándola o disminuyéndola, o en ocasiones potenciando o reduciendo la respuesta a otro factor de transcripción, (Karpen, 2002).

La limitación de la captación de ABs se considera un mecanismo hepatoprotector para reducir la sobrecarga celular de estas moléculas en colestasis. Así, en enfermedades hepáticas que cursan con colestasis la expresión de NTCP está reducida (Shneider *et al.*, 1997; Zollner *et al.*, 2001; Keitel *et al.*, 2005). Mientras que en roedores el represor nuclear SHP ("small heterodimer partner") inhibe la actividad transcripcional de HNF4 $\alpha$  y del heterodímero RXR $\alpha$ :RAR $\alpha$  (Lee *et al.*, 2000b), en el hombre, SHP actúa independientemente de RXR $\alpha$ :RAR $\alpha$  e inhibe el receptor de glucocorticoides que media la activación de NTCP en humanos (Eloranta *et al.*, 2006).

FXR también inhibe la expresión de OATP1B1 en situaciones de colestasis (Shneider *et al.*, 1997; Zollner *et al.*, 2001; Keitel *et al.*, 2005). Cuando los ABs activan FXR (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999) se desencadena una cascada de regulación que produce la inhibición de la actividad de HNF4 $\alpha$  y HNF1 $\alpha$ , este último un fuerte inductor del promotor de OATP1B1 (Jung *et al.*, 2003), vía SHP. Por el contrario, OATP1B3 es transactivado por FXR (Jung *et al.*, 2002).

La represión de la síntesis de ABs también es una respuesta adaptativa en la colestasis. La activación de FXR (gen *NR1H4*) por los ABs aumenta la síntesis de SHP que, a su vez, bloquea la acción estimuladora de LRH-1 (de "liver receptor homologue") sobre la expresión de los genes *CYP7A1* y *CYP8B1*, que codifican respectivamente la enzima clave de la síntesis de ABs por la vía neutra, colesterol 7 $\alpha$ -



hidroxilasa, y la enzima clave que lleva a cabo la formación de AC, estero1 12 $\alpha$ -hidroxilasa (Nagano *et al.*, 2004). Además FXR induce la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF19, “fibroblast growth factor 19”) que inhibe la expresión de CYP7A1 a través de una ruta dependiente de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Holt *et al.*, 2003). Otros mecanismos indirectos de regulación de la síntesis “de novo” de ABs a través de FXR, han sido descritos en los últimos años (Eloranta *et al.*, 2005). Un efecto opuesto a esta acción inhibitoria de FXR lo ejerce LXR $\alpha$  (Peet *et al.*, 1998).

Los ABs así como diversos fármacos y xenobióticos son metabolizados por la enzima CYP3A4 que los convierte en compuestos más hidrofílicos y fácilmente excretables (Handschin *et al.*, 2003; Bodin *et al.*, 2005). La expresión de esta enzima está regulada por SXR, VDR, CAR y FXR (Zollner *et al.*, 2006). La presencia de ligandos de estos receptores, como xenobióticos, fármacos y ABs, induce la expresión de esta enzima, aunque la contribución relativa de cada receptor nuclear aún no está clara (Zollner *et al.*, 2006).

Además de la hidroxilación, la conjugación con sulfato o glucurónico facilita la detoxificación de ABs. En este sentido, FXR, SXR, VDR y CAR participan en la regulación de la expresión de la sulfotransferasa SULT2A1/Sult2a1 (Zollner *et al.*, 2006). Estos receptores nucleares inducen la expresión de esta enzima y reducen la toxicidad hepática producida por la sobrecarga de ABs.

También los ABs inducen la expresión de una de las enzimas responsables de su glucuronidación, la UGT2B4, vía FXR (Barbier *et al.*, 2003). Este es el único caso donde FXR funciona como un homodímero que se une al elemento de respuesta del gen que codifica para UGT2B1.

En situaciones de colestasis la principal ruta de excreción de ABs es la basolateral mediada por MRPs y por el heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$ . Estas proteínas se expresan normalmente a niveles muy bajos en los hepatocitos pero sus niveles aumentan en patologías que cursan con colestasis (Zollner *et al.*, 2003b; Keitel *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que FXR transactiva la expresión de OST $\alpha$ /OST $\beta$  (Boyer *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). También media la inducción de BSEP y MRP2 en respuesta a ABs. Mientras que el mecanismo de regulación de la excreción de ABs por BSEP está directamente relacionado con FXR (Ananthanarayanan *et al.*, 2001), la regulación de MRP2 es más compleja y participan, además de FXR, SXR y CAR (Kast *et al.*, 2002). Sin embargo, mientras que FXR regula la expresión de las bombas canaliculares, la sobreexpresión de Mrp3 y Mrp4 en colestasis es independiente de este receptor nuclear (Zollner *et al.*, 2003a), al menos en roedores. CAR parece ser el regulador principal de Mrp3 y Mrp4, ya que ligandos de CAR inducen la expresión de ambas bombas (Maher *et al.*, 2005). También participan en la regulación de Mrp3 VDR y PXR (ortólogo de SXR en roedores) (Maher *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2005).

Aunque la activación de CAR por los ABs no se ha demostrado todavía, a diferencia de FXR, SXR y VDR (Chiang, 2004), otras sustancias que se acumulan en la colestasis, como la BR, han demostrado ser activadoras de CAR (Huang *et al.*, 2003) y esto podría explicar la sobreexpresión de sus genes diana en situaciones de colestasis.

#### 2.4.2.1. Otros factores de transcripción

Se han identificado secuencias consenso AP1 en el promotor de varios genes de transportadores ABC. C-Jun y C-Fos se unen a estos elementos incrementando la actividad del promotor. Estudios llevados a cabo en ratones modificados genéticamente han demostrado un papel crucial de AP-1 en una gran variedad de situaciones celulares, como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el desarrollo de tumores.

YB-1 modula no sólo la transcripción de varios genes asociados con el crecimiento celular, resistencia a los fármacos y la síntesis de ADN, sino también la traducción, la estabilización del ARNm y la reparación del ADN. También está implicado en la angiogénesis y el crecimiento, invasión y metástasis de tumores.

Nrf2 pertenece a la familia de factores de transcripción con dominios de cremallera de leucina. Se activa en respuesta a estrés oxidativo, traslocándose al núcleo donde se une a elementos de respuesta a antioxidantes presentes en el promotor de sus genes diana, regulando de esta forma su expresión (Aleksunes *et al.*, 2007). Se han identificado elementos de respuesta a antioxidantes en el promotor de los genes *Abcc1-4* (Hayashi *et al.*, 2003; Vollrath *et al.*, 2006; Maher *et al.*, 2007) y se ha podido demostrar que activadores de Nrf2 inducen las proteínas Mrp3, Mrp4 y Mdr1 en el hígado de ratas (Cherrington *et al.*, 2002; Merrell *et al.*, 2008) y MDR1, MRP2, MRP3 y BCRP en hepatocitos humanos (Jigorel *et al.*, 2006).

C/EBP pertenece a una familia de factores de transcripción implicados en la diferenciación celular, la proliferación, respuesta inflamatoria, y diferentes funciones metabólicas. El promotor de NTCP/Ntcp contiene varios sitios de unión para C/EBP $\alpha$  y  $\beta$  (Karpen *et al.*, 1996; Shiao *et al.*, 2000). Además se han identificado sitios de unión para C/EBP en el promotor de Mdr1 de rata, MRP3 y MRP2 humanos (Muller, 2000; Stockel *et al.*, 2000), lo que sugiere que este factor de transcripción juega un papel importante en la regulación de la expresión de los transportadores hepáticos.

HNF-1 regula la transcripción de varios genes que codifican para proteínas hepáticas. Se han identificado dos isoformas HNF-1 $\alpha$  y HNF-1 $\beta$ . Ambos factores pueden formar homo- o heterodímeros que se unen a la secuencia consenso A/GTTAAT. Mientras que HNF-1 $\beta$  tiene una amplia distribución en el organismo, HNF-1 $\alpha$  se expresa predominantemente en hepatocitos, aunque también se ha detectado en células epiteliales, células del túbulo proximal renal, estómago, intestino delgado, colon y

páncreas. En humanos HNF-1 $\alpha$  es necesario para la expresión de OATP1B1 y OATP1B3 (Jung *et al.*, 2001), y en roedores juega un papel clave en la expresión de Ntcp (Karpen *et al.*, 1996; Trauner *et al.*, 1998a) y Oatp1b2. Se ha podido comprobar que su expresión, así como la de Oatp1a1 y Oatp1a4, está significativamente reducida en ratones “knockout” para este factor (Shih *et al.*, 2001). Parece claro, por tanto, que este factor juega un papel clave en la expresión de genes relacionados con el transporte y la homeostasis de los ABs. El factor HNF-3 $\beta$ , que pertenece a la misma familia de factores que HNF1, también puede desempeñar un papel similar al de HNF1 (Kaestner, 2000).

HNF4 pertenece al grupo de los receptores nucleares, aunque se desconoce el ligando. Estudios recientes llevados a cabo con ratones “knockout” condicionales para HNF4 muestran una caída en los niveles de expresión de Ntcp y varias Oatps en respuesta a la pérdida de este factor (Hayhurst *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado que HNF4 se une a elementos de respuesta localizados en el promotor de los genes CNT1, OCT, OAT1 y OAT2 incrementando su actividad transcripcional (Popowski *et al.*, 2005; Saborowski *et al.*, 2006; Ogasawara *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2009). Por tanto, HNF4 juega un papel importante en el control de la expresión de los transportadores hepáticos (Kamiyama *et al.*, 2007), de manera que se ha considerado que sus niveles de expresión pueden determinar las variaciones interindividuales que se han encontrado en la expresión de estos transportadores.

## **2.5. PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS EN PATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

### **2.5.1. Colestasis intrahepática gestacional**

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 BR dando lugar a ictericia, y de los ABs, alcanzándose valores superiores a 100  $\mu$ M (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 canalículos biliares o de los pequeños conductillos microscópicos, mientras que en la colestasis extrahepática la lesión obstructiva se encuentra en los conductos biliares grandes.

Un tipo particular de colestasis intrahepática es la colestasis gravídica o colestasis intrahepática gestacional (CIG), 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 %), en Portugal (1%) (Brites *et al.*, 1998a) 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 esos datos, la prevalencia es muy baja en países como Canadá, Suiza y E.E.U.U. En España, la prevalencia de esta enfermedad es baja según se desprende de los estudios epidemiológicos realizados Salamanca durante los años 1996-1999 (Pascual *et al.*, 2002).

### 2.5.1.1. Etiología

La etiología de la CIG es compleja, ya que se encuentran implicados factores genéticos, endocrinos y ambientales. Aproximadamente en el 10% de los casos se han identificado mutaciones en diversos genes que codifican transportadores de ABs (Mullenbach *et al.*, 2005; Dixon *et al.*, 2009) 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 BSEP, constituye un factor de riesgo en la CIG (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, además, 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 $\beta$ -glucurónido de estradiol (17 $\beta$ GE) pueden afectar al 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; Yamamoto *et al.*, 2006). El 17 $\beta$ GE puede, además, inducir la internalización de Bsep desde la membrana plasmática hacia vesículas intracelulares en rata (Crocenzi *et al.*, 2003) y trans-inhibir el eflujo de ABs mediado por Bsep, como se demuestra en experimentos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en oocitos de rana *Xenopus laevis* (Vallejo *et al.*, 2006).

El papel de los estrógenos en la CIG está bien establecido si se tiene en cuenta que su aparición ocurre mayoritariamente en el tercer trimestre del embarazo, periodo durante el cual la producción de estrógenos es más elevada. Sin embargo, el papel de la progesterona no está del todo esclarecido. Ésta se metaboliza y sus productos de reacción son rápidamente glucuro o sulfoconjugados. Se sabe que los niveles séricos

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

En cuanto a los factores exógenos que pueden condicionar una mayor prevalencia de la CIG, se han estudiado la estación del año, el ácido erúcico (ácido graso presente en aceites de algunas variedades de colza de consumo humano durante los años 70), dietas bajas en selenio o la administración de progesterona natural vía oral para prevenir el riesgo de parto prematuro.

Por tanto podemos decir que la etiología de la CIG es multifactorial, y que una predisposición metabólica hereditaria sensibilizada por factores exógenos desconocidos desencadenaría la enfermedad y modularía su intensidad.

#### **2.5.1.2. Colestasis intrahepática gestacional y el feto**

La sintomatología de la CIG 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, sobretodo 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.

Aunque, como puede verse, es una enfermedad benigna para la madre, para el feto las consecuencias son más graves, y parece que la probabilidad de que se produzcan complicaciones fetales y la gravedad de éstas son proporcionales a la magnitud de la hipercolanemia materna. Así, se han correlacionado niveles plasmáticos maternos de ABs de 10 a 100 veces superiores a los normales con la aparición de estas alteraciones, que, como ha podido demostrarse en ratas, son debidas a la elevada capacidad teratogénica de los ABs secundarios (Zimber *et al.*, 1990).

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 asfisia y la aparición de deformaciones graves en los fetos. Recientemente se

ha observado además, una mayor incidencia de distrés respiratorio neonatal en hijos nacidos de madres con colestasis gravídica (Zecca *et al.*, 2006).

Parece que los ABs podrían ser responsables de la asfixia fetal en gestaciones complicadas con colestasis intrahepática. La acumulación de ABs en la placenta produce importantes cambios en su estructura, con atrofia del tejido trofoblástico (Macias *et al.*, 2000) y vasoconstricción de las venas coriónicas (Sepulveda *et al.*, 1991), lo que puede producir un aumento de la resistencia al flujo de sangre a través de la placenta y por tanto una reducción del aporte de oxígeno al feto.

También se ha comprobado que el perfil de los ABs en el suero materno y fetal se modifica profundamente durante la CIG (Brites *et al.*, 1998b), produciéndose un aumento de ABs hepatotóxicos, como el ALC, lo que podría comprometer el desarrollo fetal (Brites *et al.*, 1998b). De hecho, al menos en la rata, la administración de ALC, en el agua de bebida de ratas gestantes, produce un retraso del crecimiento de los fetos, con cambios bioquímicos y microscópicos en sus hígados (Zimber *et al.*, 1991). Esto puede deberse, al menos en parte, al aumento del estrés oxidativo y apoptosis que se ha encontrado en el hígado fetal durante la CIG (Perez *et al.*, 2005).

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 CIG.

### **2.5.1.3. Efecto de la colestasis sobre la expresión de proteínas transportadoras hepáticas de ABs y receptores nucleares**

En todo proceso patológico el organismo reacciona desarrollando una serie de mecanismos de defensa. Así, por ejemplo, mientras que en situaciones fisiológicas sólo pequeñas cantidades de ABs son conjugadas con glucurónido (en los grupos hidroxilo o carboxilo), en colestasis la glucuronidación de los ABs se encuentra 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 (Frohling *et al.*, 1976).



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 sustancias tóxicas, facilitándose las rutas de excreción extrahepáticas. Así, 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, hay que hablar del sistema implicado en el 80% de la captación hepática de ABs, la proteína NTCP/Ntcp. Ésta 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 *et al.*, 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 estos 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 la 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 (Zollner *et al.*, 2001) durante la colestasis.

Recientemente se ha demostrado que MRP4, expresada a nivel de la membrana basolateral de los hepatocitos, cotransporta ABs junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius *et al.*, 2003; Rius *et al.*, 2006). 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 y MRP3 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 *et al.*, 2001). Este hecho supone una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefílicos, mediante

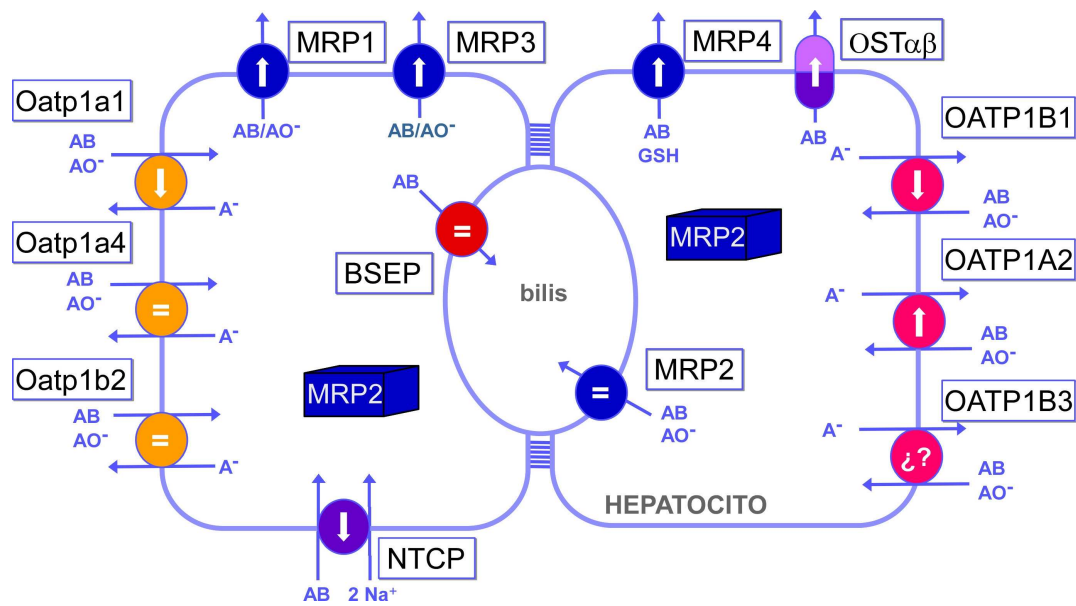
su transporte de nuevo a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka *et al.*, 2002). Se sabe que MRP1 es capaz de transportar ABs dianiónicos como el ATQDC (Trauner *et al.*, 2003), sin embargo, la contribución de MRP3 en la homeostasis de los ABs aún no está clara (Zelcer *et al.*, 2006). Mientras que su ortólogo de rata, Mrp3, tiene capacidad para transportar ABs divalentes como el ATDC, y monovalentes, como el ATC y 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 común se distribuye ampliamente, llegando a aparecer a lo largo de todo el lóbulo hepático (Donner *et al.*, 2001). MRP3 también aparece sobreexpresada en la deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como es el síndrome de Dubin-Jonson, donde provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de BR en sangre, debido al reflujó 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 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.*, 2000a).

La expresión del heterodímero OST $\alpha$ /OST $\beta$  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 7.** Cambios en la expresión de transportadores de ABs en situaciones de colestasis.

## 2.5.2. Síndrome de distrés respiratorio

### 2.5.2.1. El surfactante

En cualquier interfase aire-líquido, la superficie de éste último se encuentra bajo tensión. Es la tensión superficial, que crea la mayor parte de la resistencia al estiramiento, y que en el pulmón está generada por la fina capa de líquido que existe entre las células alveolares y el aire.

Normalmente nuestros pulmones secretan una sustancia tensoactiva o surfactante que reduce la tensión superficial del líquido alveolar, disminuyendo así la resistencia del pulmón al estiramiento y la tendencia de los alveolos pequeños al colapso. Este surfactante pulmonar es una compleja mezcla de fosfolípidos y proteínas que cubre completamente la superficie del epitelio alveolar. Es sintetizado por los pneumocitos tipo II, uno de los dos únicos tipos celulares que componen el epitelio alveolar, almacenándose en el interior de unos orgánulos intracelulares denominados cuerpos lamelares, desde donde es secretado al espacio alveolar sufriendo entonces diversas transformaciones (Gross *et al.*, 1988).

Su composición en humanos es muy constante, aunque puede variar en diversas situaciones patológicas (Hallman *et al.*, 1982). Los fosfolípidos constituyen aproximadamente el 85% de la misma, siendo la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) el más abundante de ellos. Además, el surfactante contiene lípidos neutros, carbohidratos y proteínas (Goerke, 1998), de las que han sido descritas cuatro, dos de carácter hidrofóbico denominadas proteína del surfactante B y C (SP-B y SP-C respectivamente) y dos hidrofílicas, SP-A y SP-D.

El surfactante está sometido a un continuo proceso de reciclado. Aunque una parte es degradada por los macrófagos alveolares, parece que la recaptación por los pneumocitos tipo II es la vía mayoritaria para su regeneración. Éstos lo degradan y reutilizan posteriormente sus componentes (Wright *et al.*, 1991).

La principal función del surfactante pulmonar es disminuir la tensión superficial, impidiendo el colapso alveolar, reduciendo el trabajo respiratorio, previniendo el edema pulmonar y facilitando el intercambio gaseoso. Reduce la magnitud de la fuerza de los puentes de hidrógeno al intercalarse entre las moléculas de agua, facilitando así la transferencia de gases entre la sangre y el aire de la cavidad alveolar. Recientemente se ha visto que el surfactante juega además un importante papel en la defensa inmune del pulmón, y que tanto las proteínas como los lípidos que lo componen podrían estar implicados en la modulación de la inflamación del tejido pulmonar, regulando la actividad de las células del sistema inmune y colaborando en la eliminación de los patógenos (Chroneos *et al.*, 2010).

El efecto del surfactante pulmonar sobre la tensión superficial es particularmente importante en el momento del nacimiento cuando los pulmones se expanden por primera vez. Durante toda la vida intrauterina los pulmones han permanecido colapsados y llenos de líquido. Para llenarlos de aire por primera vez el recién nacido debe superar la tensión superficial de la interfase aire-líquido, establecida dentro de los pulmones en cuanto el neonato respira por primera vez. De no ser así las paredes de los alveolos tenderán a pegarse entre ellas y colapsarse. El surfactante pulmonar, cuya síntesis comienza en torno a la semana 25 de gestación y se completa alrededor de la semana 34, consigue disminuir esta tensión superficial, facilitando la insuflación pulmonar.

La deficiencia de surfactante pulmonar se asocia a numerosas patologías, entre las que destaca el edema pulmonar, la atelectasia pulmonar, el síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto y el síndrome de dificultad respiratoria del neonato.

### **2.5.2.2. Síndrome de distrés respiratorio del neonato**

El síndrome de distrés o dificultad respiratoria del neonato (SDR), conocido también como enfermedad de membrana hialina, es una patología desarrollada por neonatos con deficiencias en el surfactante pulmonar (Clements *et al.*, 1998), que conducen a un aumento de la tensión superficial con tendencia al colapso alveolar al final de la espiración. Esta situación provoca que los recién nacidos deban usar enormes cantidades de energía para expandir, en cada inspiración, sus pulmones colapsados, lo que resulta en una disminución progresiva de su volumen pulmonar y el desarrollo de insuficiencia respiratoria severa (Avery *et al.*, 1959).

El SDR es el trastorno respiratorio más frecuente en los recién nacidos prematuros, y la segunda causa de muerte durante el periodo perinatal, precedido tan sólo por las

malformaciones congénitas. Su incidencia es inversamente proporcional a la edad gestacional (Robertson *et al.*, 1992), apareciendo en el 60% de los neonatos con menos de 28 semanas de gestación, en el 15-20% de los niños con 32-36 semanas de gestación y en menos del 5% en los de 37 semanas o más. Parece además, que existe una mayor frecuencia de casos en hijos de madres diabéticas, de embarazos múltiples, de parto precipitado o de asfisia perinatal. Otros factores de riesgo son la aspiración del contenido gástrico, de meconio, sepsis o la neumonía infecciosa.

Clínicamente, la enfermedad se manifiesta poco después del parto, y se caracteriza por una severa disnea con elevada frecuencia respiratoria, quejido durante la respiración, retracción inspiratoria de las costillas y centro del tórax. Posteriormente aparece cianosis, congestión, apnea, aumento de la permeabilidad vascular, edema pulmonar y formación de membranas hialinas, un material eosinófilo, rico en proteínas que recubre de modo homogéneo la superficie alveolar y que dio nombre inicialmente a esta enfermedad. El déficit de surfactante también origina inflamación pulmonar, lo que contribuye aún más al deterioro de la función pulmonar.

Si la enfermedad persiste pueden aparecer numerosas complicaciones, como acidosis, deshidratación, hipernatremia, hiperbilirrubinemia, híper o hipoglucemia, así como diferentes infecciones intrahospitalarias, generalmente asociadas a las maniobras invasivas que se realizan en estos niños. Flebitis, infección en el sitio de instalación de un catéter u otras del tipo de neumonía o septicemia son de ocurrencia frecuente.

Los pulmones de niños muertos por SDR muestran un espectro de cambios histopatológicos que dependen del grado de desarrollo pulmonar y la duración de la enfermedad. Pueden aparecer necrosis, desestructuración del epitelio, edema intersticial e intraalveolar, hemorragias, focos de fibrosis y acúmulo, en alveolos y bronquiolos, de membranas hialinas, formadas principalmente de restos celulares y fibrina, así como de material surfactante agregado y dispuesto en forma de láminas.

Además del tratamiento de la insuficiencia respiratoria con ventilación mecánica, que fuerza la entrada de aire en los pulmones y permite abrir los alveolos, la administración de surfactante exógeno por vía intratraqueal a estos niños, hasta que sus pulmones desarrollan la capacidad de producir el suyo propio, ha sido uno de los más importantes avances en el tratamiento del SDR, consiguiendo un importante descenso en la mortalidad de estos pacientes (Adams *et al.*, 1978; Fujiwara *et al.*, 1980).

Los surfactantes empleados en clínica en el momento actual son de origen animal o sintético, no habiéndose demostrado diferencias significativas en cuanto al resultado final en el tratamiento del SDR, aunque parece que con los de origen animal se observa una mejoría más rápida de la función pulmonar y la oxigenación.

También ha demostrado un efecto beneficioso la estimulación intrauterina o perinatal de la producción de surfactante mediante el uso de corticoesteroides. Estos aceleran

la maduración de los mecanismos de síntesis de surfactante, reduciendo la incidencia y gravedad del SDR (Kinalski *et al.*, 2000; Smrcek *et al.*, 2005). Sin embargo, estos fármacos presentan numerosos efectos secundarios a nivel neurológico, por lo que se recomienda un uso prudente de los mismos (Halliday *et al.*, 2009).

### 2.5.2.3. ABs y síndrome de distrés respiratorio

La inmadurez de los sistemas enzimáticos que permiten la síntesis de cantidades adecuadas de surfactante en los pneumocitos tipo II es la causa más frecuente de SDR. Sin embargo, la síntesis y/o liberación de surfactante así como su actividad, pueden verse comprometidas por diversos factores como la asfixia perinatal, la hipotermia, la presencia de meconio o edema en el espacio alveolar y la diabetes materna (Clark *et al.*, 1987).

Estudios recientes han demostrado que la CIG está significativamente asociada al SDR del neonato (Zecca *et al.*, 2004; Zecca *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la presencia de elevados niveles de ABs en los alveolos podría ser responsable de la inflamación local, los cambios en el metabolismo del surfactante y la alteración de la inmunidad pulmonar (Zecca *et al.*, 2004).

Durante la vida intrauterina el feto es capaz de sintetizar ABs desde una edad muy temprana, lo que genera un gradiente de estas moléculas en dirección feto-madre. Debido a la inmadurez del sistema excretor fetal, la placenta es la principal ruta de eliminación de estas sustancias durante la etapa prenatal. Una vez en la circulación materna, los ABs serán eliminados principalmente por el hígado de la madre. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que en situaciones de colestasis la acumulación de ABs en la sangre materna invierte el gradiente de estas moléculas (Monte *et al.*, 1995), y altera la capacidad de la placenta de llevar a cabo el transporte vectorial de ABs (Macías *et al.*, 2000), lo que produce un aumento de sus niveles en la circulación fetal, por lo que, en estas circunstancias, podrían pasar al alveolo.

Recientemente se ha descrito la presencia de ABs en el lavado broncoalveolar de neonatos con SDR, hijos de madres con CIG (Zecca *et al.*, 2008), y que el riesgo de desarrollar SDR está directamente relacionado con la magnitud de la hipercolanemia materna (Zecca *et al.*, 2006), lo que demuestra que ambas patologías se relacionan a través de la presencia de ABs en el alveolo. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que los ABs pueden alcanzar el espacio alveolar. Un posible mecanismo sería la aspiración desde el líquido amniótico, aunque esta vía parece poco probable puesto que los niveles de ABs detectados en él, en gestaciones que cursan con CIG, no se correlacionan con la morbilidad perinatal (Heikkinen *et al.*, 1980). La captación de los ABs desde la circulación parece ser, por tanto, la opción más probable.

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo por el que los ABs podrían dañar el tejido pulmonar. Una de ellas podría ser el daño directo del epitelio alveolar por los ABs. La acumulación de éstos acidificaría el pH intracelular provocando la ruptura de las membranas celulares (Porembka *et al.*, 1993).

Otro mecanismo propuesto es la disminución de los niveles de proteínas del surfactante A y D, con un importante papel en la inmunidad pulmonar, que facilitaría el desarrollo de infecciones. La respuesta inmune desencadenada podría ser la responsable del daño tisular asociado a la presencia de ABs.

Sin embargo, la hipótesis más consistente parece ser la alteración de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 (FLasa A2) en respuesta a elevados niveles de ABs en el alveolo, originando la depleción del surfactante.

La FLasa A2 pertenece a una superfamilia de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster en posición *sn*-2 de fosfolípidos (Touqui *et al.*, 2003). Estas enzimas están implicadas en el recambio de fosfolípidos de membrana, la digestión de lípidos y en los procesos inflamatorios, a través de la formación de eicosanoides y otros mediadores de inflamación (Touqui *et al.*, 1999; Touqui *et al.*, 2003). En mamíferos, estas enzimas pueden clasificarse en dos grandes grupos, las intracelulares y las secretadas (sFLasas A2). En el pulmón sFLasa A2 es principalmente producida por los macrófagos, y está implicada en la inflamación pulmonar y la degradación del surfactante (Touqui *et al.*, 1999).

Estudios llevados a cabo en los últimos años sugieren que los ABs en el alveolo provocan un cambio en la dirección de la reacción catalizada por la enzima FLasa A2. Esta enzima juega un papel clave en la síntesis de surfactante, pero en el intestino cataliza la reacción en sentido contrario, hidrolizando la fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina. Parece que la dirección en que tiene lugar la reacción está determinada principalmente por la relación ABs - fosfolípidos (Ihse *et al.*, 1973; Hills *et al.*, 1997). Por tanto, la reacción en sentido contrario en el pulmón produciría la pérdida de actividad del surfactante, a pesar del grado de maduración pulmonar alcanzado durante la gestación (Zecca *et al.*, 2004).

### **2.5.3. Papel en toxicología**

#### **2.5.3.1. Transporte de toxinas**

Como hemos visto, tanto las proteínas ABC, como los transportadores SLC, desempeñan un importante papel en la absorción, distribución en los tejidos y eliminación de una amplia gama de fármacos y compuestos endógenos. Además, estas proteínas participan en la captación y eflujo de numerosas toxinas y sus metabolitos.

Recientemente se ha demostrado que las proteínas OATP son las responsables de la captación hepática de diferentes toxinas, entre las que se incluyen la  $\alpha$ -amanitina, la faloidina y la microcistina (Meier-Abt *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2005; Letschert *et al.*, 2006). Varias proteínas de la familia OAT también transportan micotoxinas como la ocratoxina (Tsuda *et al.*, 1999; Youngblood *et al.*, 2004).

A nivel intestinal, la absorción depende de la difusión a través de la mucosa, así como del transporte mediado a través de la membrana apical de los enterocitos. Sin embargo, la presencia de bombas ABC en la mucosa intestinal restringe el paso de estas toxinas a la circulación (Schinkel *et al.*, 2003).

El eflujo de toxinas previene la acumulación de las mismas constituyendo un importante mecanismo de defensa celular frente a estos compuestos. En este sentido, se sabe que BCRP limita la acumulación de toxinas en los tejidos donde presenta elevados niveles de expresión. Entre las toxinas que se han descrito como sustratos de BCRP destaca la feoforbina (van Herwaarden *et al.*, 2003), un catabolito de la clorofila, o la aflatoxina B1 (van Herwaarden *et al.*, 2006), una de las más potentes micotoxinas conocidas, y un importante factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC).

Las proteínas MRP también cuentan entre sus sustratos con varias toxinas como la aflatoxina B1 transportada por MRP1 (Lorico *et al.*, 2002), o la faloidina, excretada por MRP2 a través de la membrana canalicular de los hepatocitos (Gavrilova *et al.*, 2007). Otra micotoxina, la fumonisina, relacionada con el desarrollo de tumores hepáticos (Gelderblom *et al.*, 2001) es sustrato de MDR1, que parece jugar un papel importante en la reducción de su biodisponibilidad al reducir su captación intestinal (De Angelis *et al.*, 2005).

### **2.5.3.2. Interacciones entre sustratos endógenos y xenobióticos**

Como hemos visto, los transportadores de aniones orgánicos muestran un amplio rango de especificidad de sustrato con un alto grado de solapamiento, lo que puede dar lugar a la existencia de interacciones entre los distintos sustratos.

Así, por ejemplo, la modulación de la expresión y/o actividad de los transportadores biliares por los fármacos antitumorales puede afectar la captación y secreción hepática de compuestos endógenos. En este sentido, se ha observado la aparición de ictericia en pacientes tratados con ciclosporina y daunorrubicina (List *et al.*, 1993), doxorubicina (Adachi *et al.*, 2002) o etopósido (Lum *et al.*, 1992).

De modo similar, los niveles elevados de determinadas sustancias endógenas pueden afectar al transporte de fármacos. Se ha comprobado en ratas que los ABs reducen la excreción neta de cisplatino por el hígado (Villanueva *et al.*, 1997). Por otra parte, varias hormonas pueden afectar a la expresión de bombas ABC tales como MDR1, BSEP o MRP2 (Yang *et al.*, 1989). Los esteroides hidroxilados, incluyendo cortisol,

dexametasona, aldosterona y corticoesterona, pueden ser transportados por MDR1, mientras que la progesterona no es transportada (Ueda *et al.*, 1992), pero se comporta como modulador (Qian *et al.*, 1990). Estudios llevados a cabo en líneas celulares han demostrado que la resistencia a la vinblastina y doxorrubicina mediada por la MDR1 puede superarse con antiestrógenos, como el tamoxifeno o el toremifén (Kirk *et al.*, 1993) y antiprogestágenos como RU 486 (Lecureur *et al.*, 1994). Otras hormonas capaces de modular estos transportadores que pueden afectar a la biodisponibilidad de los fármacos antitumorales son la insulina (Zhou *et al.*, 1997), el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) (Hirsch-Ernst *et al.*, 1995) y algunas hormonas pituitarias (Russell *et al.*, 1994), capaces de inducir la expresión de Mdr1 en hepatocitos de roedor.

En hepatocitos de rata, los glucocorticoides inducen Mrp2 (Courtois *et al.*, 1999) y Bsep (Warskulat *et al.*, 1999), mientras que la prolactina aumenta la expresión de Bsep en hígados de ratas ovariectomizadas (Liu *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2001).

La conjugación con glutatión, y la eliminación de los conjugados a través de MRPs constituye una vía importante de detoxificación de fármacos. De hecho, los niveles de glutatión, enzimas conjugantes y de expresión de MRPs aumentan en muchos tipos de células tumorales resistentes a los fármacos, lo que sugiere que los niveles de glutatión podrían modificar la respuesta celular al tratamiento antitumoral. En general, una disminución en el contenido celular de glutatión aumentaría la acumulación de fármaco intracelular, mientras que elevados niveles de glutatión favorecerían los procesos de eflujo (Mitchell *et al.*, 1989). Además, algunos fármacos antitumorales como la vincristina pueden ser cotransportados con glutatión por MRP1 (Loe *et al.*, 1998).

## **2.5.4. Resistencia a la quimioterapia en tumores del circuito enterohepático**

### **2.5.4.1. Quimioterapia disponible**

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia y peor pronóstico a nivel mundial en nuestros días. Los tumores más comunes son aquellos que afectan a tejidos que están en continua renovación y a los que están más expuestos a agentes nocivos del entorno. Así, los tumores que afectan a órganos del circuito enterohepático (hígado, intestino, vesícula biliar) representan un elevado porcentaje del total de esta enfermedad.

En este apartado de la introducción se comentará el papel que desempeña la quimioterapia entre las estrategias disponibles para tratar los tumores malignos más relevantes en cada órgano.



Las neoplasias epiteliales del intestino delgado representan menos del 2% de los tumores gastrointestinales. La curación se relaciona con la capacidad de reseca completamente el tumor, aunque la supervivencia media a los 5 años es de menos del 50%. Cuando se utiliza quimioterapia, las combinaciones más eficaces son las de gemcitabina sola o más 5-fluorouracilo o capecitabina (Fishman *et al.*, 2006). Frente al leiomioma la combinación más eficaz es la de ifosfamida y doxorubicina (Tascilar *et al.*, 2007) y para los linfomas de intestino delgado, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y procarbazona (Akbulut *et al.*, 1997).

En el intestino grueso, los tumores epiteliales tanto benignos como malignos son frecuentes. Entre los tumores malignos destaca el adenocarcinoma colorrectal, que aparece principalmente en personas de edad avanzada, asociado a dietas de elevado contenido en grasa o pobres en fibra, aunque algunos autores consideran que determinados ABs secundarios pueden jugar un papel en la etiología de estos tumores (Kandell *et al.*, 1991). El tratamiento curativo de elección es la cirugía (McKenzie *et al.*, 2005), eficaz en más del 50% de los pacientes. Si el tumor está en los primeros estadios y localizado, puede llegar a ser curativa en más del 85% de los casos (Kosmider *et al.*, 2007). Sin embargo, la recurrencia tras la cirugía es un problema serio y a menudo es la causa definitiva de muerte (Desch *et al.*, 2005).

Se suele utilizar la quimioterapia o una combinación de radiación externa e interna con fines curativos y adyuvante a la cirugía (Mendenhall *et al.*, 1997), pero la combinación de los tres tratamientos, por su elevada toxicidad, queda reservada para pacientes con enfermedad avanzada (Mendenhall *et al.*, 2004).

En la actualidad, existen siete fármacos antineoplásicos activos aprobados para pacientes con cáncer colorrectal: 5-fluorouracilo, capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab y panitumumab. No obstante, hay algunas alternativas a estos fármacos, como el raltitrexed, un inhibidor específico de la timidilato sintasa, que ha demostrado una actividad similar en el cáncer rectal a la del 5-fluorouracilo y la leucovorina (Cunningham, 1998). El oxaliplatino (Andre *et al.*, 2004) y el irinotecán (Saltz *et al.*, 2000) muestran mayor actividad cuando se combinan con 5-fluorouracilo y leucovorina en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Si a estos fármacos se les añade además bevacizumab, mejora aún más la eficacia del tratamiento (Hurwitz *et al.*, 2004). Sin embargo, incluso con la combinación más eficaz de irinotecán, 5-fluorouracilo, leucovorina y bevacizumab, no se consigue aumentar la supervivencia más de 20 meses en pacientes con tumores en estadio III y IV, y un 65% de los pacientes no responden (Hurwitz *et al.*, 2004).

El CHC está cobrando cada vez un mayor interés clínico debido al aumento de su incidencia en todo el mundo (Bosch *et al.*, 1999); ya en el año 2000 representaba más del 5% de todos los cánceres que se diagnosticaron (Parkin *et al.*, 2001), y casi el 85% de los tumores malignos primarios del hígado. Aunque ocupa el quinto lugar en



frecuencia de diagnóstico a nivel mundial con 564.000 casos por año, es la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer (Parkin *et al.*, 2001).

Tiene un origen etiológico complejo en el que interactúan múltiples factores, entre los que destacan sin lugar a dudas las hepatitis B y C, la alta ingesta de alcohol y, en general, cualquier agente capaz de producir cirrosis hepática. Generalmente su pronóstico es nefasto y la muerte suele producirse entre 1 y 4 años después de la aparición del tumor. En los países desarrollados, la tendencia está cambiando, debido a que el 30-40% de los pacientes son diagnosticados en los estadios iniciales del proceso tumoral, cuando la aplicación de los tratamientos curativos es óptima (Bruix *et al.*, 2002).

Por otra parte, el hígado es singularmente vulnerable a la invasión tumoral de origen externo. Su volumen, abundante riego sanguíneo y doble vascularización lo hacen, después de los ganglios linfáticos, el asiento más frecuente de metástasis, fundamentalmente de tumores colorrectales, cáncer de mama o melanomas.

La resección hepática es la opción principal cuando el tumor se detecta en una etapa temprana, aunque el uso de esta técnica se ve frecuentemente limitado por la coexistencia del carcinoma con una cirrosis avanzada. Se estima que aproximadamente el 70% de los pacientes a los que se les trata quirúrgicamente para eliminar el tumor sobreviven más de 5 años (Llovet *et al.*, 1999). Otros tratamientos curativos son la inyección percutánea de etanol en el tumor, la ablación por radiofrecuencia y el trasplante.

El colangiocarcinoma (CGC) es un cáncer epitelial originado a partir de los conductos biliares. Es el segundo tipo de cáncer hepático más frecuente, después del CHC y los estudios epidemiológicos indican que su incidencia está aumentando en los países occidentales (Welzel *et al.*, 2006; Aljiffry *et al.*, 2009), representando aproximadamente el 2% de todos los cánceres descritos (Jarnagin *et al.*, 2001).

Esta forma de cáncer tiene una prevalencia ligeramente superior en hombres que en mujeres y afecta principalmente a pacientes entorno a los 70 años con hepatopatías, como colangitis esclerosante primaria, hepatolitiasis, fibrosis hepática congénita, o que han estado expuestos a carcinógenos (Khan *et al.*, 2005; Lazaridis *et al.*, 2005; Shaib *et al.*, 2005; Patel, 2006).

La resección quirúrgica es la única terapia curativa y, por tanto, el tratamiento de elección siempre que sea posible realizarlo (Blechacz *et al.*, 2008). Los fármacos antitumorales mejor estudiados son el 5-fluorouracilo y la gemcitabina (Alberts *et al.*, 2007). Aunque ambos fármacos han sido testados en combinación con otros, incluyendo cisplatino, oxaliplatino, docetaxel, paclitaxel, mitomicina-C, doxorubicina, epirubicina, lomustina, e interferón- $\alpha$  (Takada *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996; Patt *et al.*, 2001; Scheithauer, 2002; Lee *et al.*, 2004a), actualmente no hay estudios

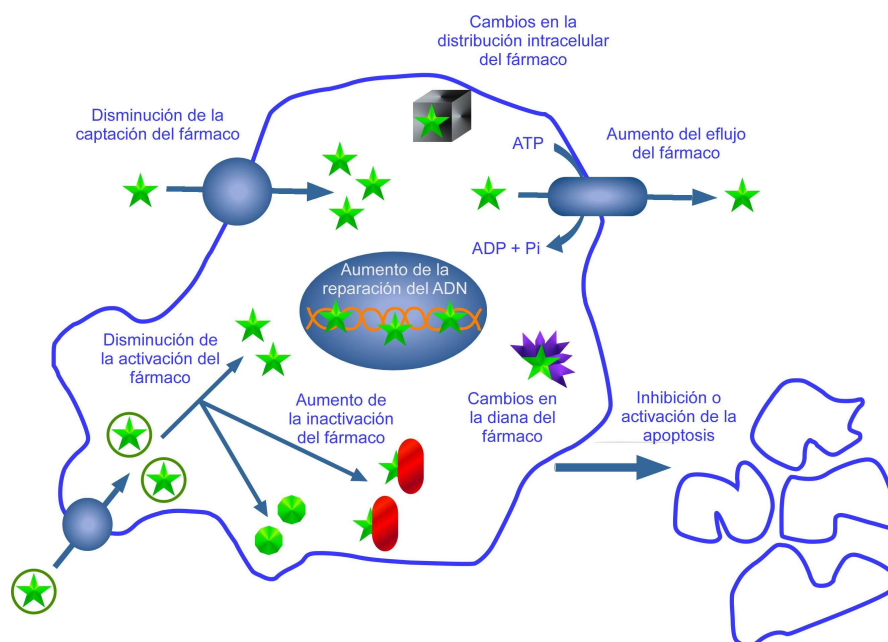
randomizados que muestren claros beneficios de supervivencia para un régimen quimioterápico específico.

### 2.5.4.2. Mecanismos de quimiorresistencia

Los tumores primarios de hígado y colon constituyen un importante problema de salud mundial, constituyendo 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 estos tumores, 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:

1. Reducción de la concentración de fármaco dentro de las células tumorales, por una disminución de la captación o una activación del eflujo
2. Cambios en el metabolismo intracelular del fármaco
3. Cambios en la expresión de moléculas diana
4. Factores que afectan a la reparación del ADN
5. Desregulación de los mecanismos proapoptóticos/antiapoptóticos



**Figura 8.** Mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral

- **Disminución de la concentración intracelular del fármaco**

La concentración del fármaco que se alcanza dentro de la célula, determinada por el balance captación/eflujo, constituye un punto clave en la posible eficacia de la terapia antitumoral.

La sobreexpresión en células tumorales de miembros de las familias de transportadores SLC y ABC constituye uno de los principales problemas de la resistencia a la quimioterapia. Por su importancia, se tratarán en el siguiente apartado.

- **Disminución de la actividad intracelular del fármaco**

Entre los mecanismos intracelulares involucrados en la quimiorresistencia se encuentran 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.

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 de fase II, como aquellas involucradas en la conjugación de ácido glucurónico o 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) desempeñando un papel importante en la resistencia a la quimioterapia de estos tumores. Ejemplos de ello son las enzimas dihidropirimidina deshidrogenasa, implicada en el metabolismo del 5-fluorouracilo (Fakhrejehani *et al.*, 2007); glutatión-S-transferasa (GST), que conjuga glutatión con xenobióticos como los derivados de platino (Ishikawa *et al.*, 1993) provocando en muchos casos su inactivación (Meijer *et al.*, 1992). Además, los aductos resultantes de la conjugación de estos fármacos son eliminados de la célula por medio de las bombas ABC (Ishikawa *et al.*, 1993), por lo que 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 *et al.*, 1994).

La conjugación con ácido glucurónico a cargo de las enzimas UDP-glucuroniltransferasas (UGTs) desempeña también 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. 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 *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2001).

Las metalotioneínas (MT) son unas proteínas ricas en grupos sulfhidrilo, que participan en la detoxificación de compuestos electrófilos, como radicales libres, metales pesados y fármacos derivados de platino. La sobreexpresión de estas proteínas también se ha relacionado con la resistencia a la quimioterapia (Kelley *et al.*, 1988). Se ha propuesto que el secuestro de radicales libres, de los fármacos o de sus metabolitos por las MT puede inhibir la interacción directa de los agentes antineoplásicos con sus dianas intracelulares, y por lo tanto disminuir la eficacia de su efecto quimioterapéutico (Cherian *et al.*, 2003).

#### ▪ 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 interaccionar 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 *et al.*, 2002), a través 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 *et al.*, 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 doxorubicina 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 (Friche *et al.*, 1991; Deffie *et al.*, 1992). Así, en CHC se ha observado un aumento de la resistencia a doxorubicina en aquellas células tumorales con mayores niveles de expresión de topoisomerasa II (Pang *et al.*, 2005).

Otra familia de antineoplásicos de reciente aparición son los inhibidores de tirosina kinasa, cuyo miembro más representativo es el imatinib. Se considera que los receptores 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. El mecanismo que parece estar implicado en la resistencia al tratamiento con este fármaco es la aparición de mutaciones en receptores tirosina kinasa, de aparición previa al tratamiento o como consecuencia de

la exposición prolongada a este fármaco, que se traducen en una falta total de respuesta (Wardelmann *et al.*, 2005).

- **Cambios en los mecanismos de 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 *et al.*, 1993).

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.

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 (Reardon *et al.*, 1999; Furuta *et al.*, 2002). 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”), cuya sobreexpresión se ha asociado a la resistencia a cisplatino y sus derivados (Arnould *et al.*, 2003; Youn *et al.*, 2004) en varios tipos de cáncer (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). Así, la pérdida de algunos elementos de este sistema de reparación favorece la capacidad de las células con daños graves en el ADN para eludir la apoptosis.

- **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, dando como resultado un crecimiento celular no controlado, y 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 que 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 (Segal-Bendirdjian *et al.*, 1995; Bunz, 2001).

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 desempeña un papel central en el control del ciclo celular por lo que constituye un factor clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a la quimioterapia o radioterapia (Vogelstein *et al.*, 2000). 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). La actividad supresora de tumores de p53 se debe a su capacidad de unirse a Bcl-2 e inhibir así el efecto anti-apoptótico de éste. Además, p53 puede activar otros mecanismos que resultan en la eliminación de aquellas células con un mayor grado de daño en el ADN a través de la sobreexpresión de genes pro-apoptóticos, como Bax o Fas (Miyashita *et al.*, 1994; Petak *et al.*, 2000). La funcionalidad de p53 aparece alterada en muchas células tumorales resistentes a fármacos (Anthoney *et al.*, 1996), y aproximadamente en el 50% de los tumores aparecen mutaciones en el gen que la codifica (Levine, 1997).

Bcl-2 es un importante elemento anti-apoptótico, expresado en muchos tumores sólidos en los que su sobreexpresión resulta en un incremento de la resistencia a la quimioterapia (Miyashita *et al.*, 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).

RPL6 es un miembro de la familia de proteínas ribosomales L6E cuya sobreexpresión se asocia con un incremento de la resistencia a muchos fármacos antitumorales, como 5-Fluorouracilo 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, bloqueando el paso final de la vía de activación de apoptosis inducida por muchos agentes antitumorales (Notarbartolo *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2007). La inhibición por agentes farmacológicos de esta familia resulta en un incremento de la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia (Yamaguchi *et al.*, 2005).

En circunstancias normales, el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor I- $\kappa$ B. La fosforilación de I- $\kappa$ B da como resultado la separación de NF- $\kappa$ B y la translocación de este último al núcleo, donde 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- $\kappa$ B como mecanismo de defensa frente a la quimioterapia (Chuang *et al.*, 2002). Parece existir una correlación entre la activación de NF- $\kappa$ 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 implicadas en la señalización de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR) que, en respuesta a TGF-alfa o a EGF, activa vías intracelulares de supervivencia, como PI3K/Akt, ERK1/2, STAT3 y STAT5 (Blume-Jensen *et al.*, 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.*, 2002). Este hallazgo ha supuesto una vía de actuación prometedora para superar la resistencia de las células tumorales, mediante el diseño de fármacos que bloqueen la actividad de EGFR, como el gefitinib, capaz de bloquear las vías de proliferación y supervivencia celular (Okano *et al.*, 2006).

#### **2.5.4.3. Papel del transportoma en la resistencia a la quimioterapia antitumoral**

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 engloba un conjunto de proteínas que median el transporte de sustratos muy diversos, desde moléculas orgánicas hasta iones inorgánicos. 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 está formada por bombas de extrusión y 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 puede 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 anteriormente, 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) 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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.

#### ▪ Captación de fármacos

En un apartado anterior de la introducción de esta Tesis Doctoral, ya se han estudiado algunos miembros de esta familia implicados en el transporte de ABs. Sin embargo, aquí trataremos de ahondar en los fármacos citostáticos que transportan para tratar de determinar así su implicación en el 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 también determina grandes diferencias interindividuales en la captación



de fármacos (Kerb *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Fromm, 2004). 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).

Los OATPs (Hagenbuch *et al.*, 2004b) pueden transportar gran cantidad de sustratos (Sai *et al.*, 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).

OCT1 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 *et al.*, 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 derivados de pirimidina puede determinar la sensibilidad de distintos tipos de tumores a estos fármacos (Owen *et al.*, 2006). CNT3 (*SLC28A3*) es capaz de transportar una larga variedad de fármacos con actividad antitumoral, como la gemcitabina, floxuridina y zebularina (Gray *et al.*, 2004). 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 lo que se relaciona la expresión de esta proteína con la aparición de resistencia a dicho fármaco citostático (Ishida *et al.*, 2002).

#### ▪ 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 *et al.*, 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 está incrementada en líneas celulares que presentan una mayor resistencia a determinados fármacos (Laing *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2003; Wulf *et al.*, 2004).

La glicoproteína P o MDR1 es capaz de mediar el eflujo de una gran cantidad de compuestos con actividad antitumoral y también de antibióticos y antivirales (Hunter *et al.*, 1991; Evans, 2000). Entre la gran cantidad de compuestos antitumorales que reconoce como sustratos 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 el CHC se han investigado exhaustivamente, existe aún gran controversia acerca de este tema (Zollner *et al.*, 2005). La primera evidencia del papel de MDR1 como mecanismo detoxificante fue obtenida en las líneas celulares Caco-2, HT29 y T84, donde la expresión de MDR1 se acompañaba 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).

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 CHC, 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 *et al.*, 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 CHC 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 CHC 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) (Strautnieks *et al.*, 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).

MRP1 también transporta gran cantidad de fármacos antitumorales, como, antraciclinas, camptotecinas, etopósido y metotrexato (Zhou *et al.*, 2008). Experimentos “in vitro” con líneas celulares han puesto de manifiesto la capacidad de MRP1 de conferir resistencia a agentes citostáticos como la daunorrubicina, doxorubicina 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 (BR) 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 (Evers *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005b).

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 (Zeng *et al.*, 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).

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). Es capaz de transportar oxazafosforinas, análogos nucleósidos acíclicos, derivados de purinas, metotrexato y camptotecinas (Tian *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005a).

Aunque se ha detectado la expresión de otros miembros de la familia ABCC en CHC, como MRP5 (*ABCC5*) (Kool *et al.*, 1997), MRP6 (Scheffer *et al.*, 2002a) y MRP7 (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 CHC (Chan *et al.*, 2004).

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 ya que es capaz de exportar una gran variedad de fármacos antitumorales (Kusuhara *et al.*, 2007) como el metotrexato, el tamoxifeno, la doxorubicina, el irinotecan y el imatinib (Doyle *et al.*, 1998; Maliepaard *et al.*, 1999; Volk *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004).

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 CHC (Li *et al.*, 2007). Por tanto, la sensibilidad a irinotecan en líneas celulares derivadas de CHC 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). 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 CHC. 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 está 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 (Furukawa *et al.*, 2008), 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 (Moore *et al.*, 2002). El hecho de que *ATP7B* aparezca sobreexpresado en tumores con 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 CHC, ya que se ha encontrado una elevada expresión del gen *ATP7B* en CHC, lo que explicaría en parte la marcada refractariedad de estos tumores al cisplatino (Sugeno *et al.*, 2004).

Finalmente, la LRP (“Lung resistance protein”) 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 *et al.*, 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 doxorubicina, la vincristina y el etopósido (Izquierdo *et al.*, 1996; Marie, 2001).

# 3

## MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 3.1 MATERIAL

### 3.1.1. Material biológico

#### Animales

- Se utilizaron ratas macho y hembras gestantes de la raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al pienso granulado comercial (Panlab, Madrid) y se mantuvieron en habitaciones con temperatura y humedad controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.
- Para la obtención de oocitos, se utilizaron ranas hembras *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania) preparadas para la producción espontánea de oocitos. Las ranas 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:

- La línea celular silvestre CHO-K1, de ovario de hámster chino, y la sublínea establemente transfectada con OATP1B1 (CHO-OATPC) fueron generosamente cedidas por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zurich (Suiza).
- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona): líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano, LS174T (CL188) y Caco-2 (HTB-37), de hepatoblastoma humano, HepG2 (HB-8065) y células de coriocarcinoma humano Jeg-3 (HTB-36).
- La sublínea celular LS174T/R, parcialmente resistente al cisplatino había sido obtenida previamente por nuestro grupo de investigación (Briz *et al.*, 2003).

#### Bacterias

- Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.



- Las bacterias *E. coli* “One Shot Mach1 T1” y “One Shot ccdB Survival T1” competentes, de elevada eficacia de transformación fueron compradas a Invitrogen (Barcelona).

### 3.1.2. Productos

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane<sup>®</sup>), pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo primario frente a OATP1B1 (ESL) y FXR (ab56902).
- Air Liquide (Valladolid): carbógeno, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.
- Alexis Biochemicals (Lausana, Suiza): anticuerpo primario frente a MRP2 (M<sub>2</sub>III-6).
- Ambion (Applied Biosystems, Madrid): acetato de amonio, kit para transcripción “in vitro” “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” y el líquido estabilizador “RNA<sup>later</sup>”.
- American Radiolabeled Chemicals (Itisa, Madrid): [<sup>3</sup>H]-ácido taurocólico (ATC) (actividad específica 10 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-17β-D-glucurónido de estradiol (17βGE) (45,8 Ci/mmol).
- AppliChem (Madrid): ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, fenol, formamida, leche descremada liofilizada y triptona.
- Applied Biosystems (Madrid): “SYBR Green I PCR Master Mix”.
- BD Biosciences (Madrid): solución tampón FACS-Flow para citometría de flujo.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- Biomers.net (Donau, Alemania): algunos cebadores o “primers”.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas (“High range”, “Low range” y “Kaleidoscope”), membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, TEMED y rojo ponceau.
- Dako: medio de montaje.
- GE Healthcare (Barcelona): algunas enzimas de restricción, “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”, “PlasmidPrep Mini Spin Kit”, “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” y reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”) que

incluye los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.

- Invitrogen (Barcelona): 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), estándares de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), lipofectamina LTX y reactivo Plus, medios de cultivo Advanced MEM y Opti-MEM, mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II”, “Gateway LR Clonase II” y “Gateway LR Clonase II Plus”, SYBR Green I (SYBR Safe), los plásmidos pUC19, pcDNAGW47Cat y pcDNA3.1/Hygro(+), los vectores donadores y de destino para clonación Gateway, proteinasa K, kit comercial “Enhanced AMV RT-PCR Kit”, kanamicina, enzima Accuprime® Pfx ADN polimerasa
- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, etanol, formaldehído 37%, isopropanol, sacarosa, tartrato disódico, bicarbonato de amonio, tris HCl, β-mercaptoetanol.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portas Optiplus™.
- Millipore (Waters Corporation, Madrid): cartuchos de octadecilsilano (Sep-Pak C18).
- Molecular Probes (Invitrogen, Leiden, Holanda): anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón marcados con Alexa® 594 ó Alexa® 488, calceína-AM, 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.
- Packard Bioscience (Groningen, Holanda): soluene.
- Parke-Davis (Barcelona): anestésico con ketamina (Ketolar).
- 5-Prime (Hamburgo, Alemania): Phase Lock Gel para la extracción fenol-cloroformo.
- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): T4 ADN ligasa, algunas enzimas de restricción, kit comercial “CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay”, kit para medir actividad de luciferasas Dual-Glo Luciferase Assay System y plásmidos pGL4.10 [*Luc2*] y pGL4.74 [*hRLuc/TK*].
- Pronadisa (Hispalab, S.A., Madrid): agarosa normal, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes), algunas enzimas de restricción, reactivos de transfección “FuGENE HD”, proteinasa K y tripsina de páncreas porcino.

- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpos primarios frente a GAPDH (6C5), HNF1 $\alpha$  (H-140), C/EBP $\beta$  (C19), SHP (H-160), HNF3 $\beta$  (M-20), HNF4 $\alpha$  (H-171) y FLasa A2 (M-18).
- Serotec (Madrid): anticuerpo primario frente a Reca-1 (MCA970GA) y CD68 (ED1).
- Sigma-Aldrich (Madrid): albúmina bovina (fracción V), sal sódica de los ABs ácido ursodesoxicólico (AUDC), ácido dehidrocólico (ADHC), ácido desoxicólico (ADC), ATC, ácido fórmico, azul de bromofenol, azul de Tripán, ácido etilendiamino tetraacético (AEDT), ampicilina, ARNasa A, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB), butirato sódico, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), cloruro de colina, diaforasa, mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80  $\mu$ M), colagenasa, dietilfosforocianato, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), 17 $\beta$ GE, D-glucosa, D-rafinosa, eosina, faloidina, faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (faloidina-FITC), hematoxilina, 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, igepal CA-630, ioduro de propidio, isotiocianato de fluoresceína (FITC),  $\beta$ -nicotin adenin dinucleotido ( $\beta$ -NAD), probenecid, L-prolina, medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)”, “Minimum Essential Medium Eagle (MEM)”, mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B), nitrato cálcico, paraformaldehído, piruvato sódico, resazurina, rifampicina, sulfato de gentamicina, kit para transcripción reversa “Enhanced Avian RT-PCR Kit”, tetrametilbencidina (TMB), trizma base y xileno cianol.
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido): algunos cebadores o “primers”.
- T.D.I. (Madrid): suero bovino fetal.
- Tissue Tek: La mezcla de glicoles y resinas para realizar cortes en el criostato OCT.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, agua oxigenada al 30%, bicarbonato sódico, bromuro de etidio, carbonato sódico, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol absoluto, fosfato disódico, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, metanol, sulfato de magnesio, tween® 20, reactivo de Folin ciocalteu y medio de montaje entellan®.

Los derivados de ABs succinil amida del derivado 3 $\beta$  del ácido cólico (Na<sub>2</sub>SuC, llamado aquí BALU-1), adamantil amida del derivado 3 $\beta$  del ácido cólico (Na-AdC, llamado aquí BALU-2), y los *gemini* esteroides formados o por dos 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -cholan-24-amina unidas por un ácido etilendiamino tetraacético (AEDT) (*g*-2DC<sub>24</sub>-EDTA *gemini*, llamado aquí BALU-3), o por dos 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\alpha$ -cholan-24-amina unidas por un AEDT(*g*-2C<sub>24</sub>-EDTA *gemini*, llamado aquí BALU-4), fueron sintetizados y cedidos generosamente por el Dr. José Vazquez Tato del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago (Lugo, España).

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 pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper).
- Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison 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 centrifugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hucoa-Erlöss, Madrid), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Kalsberg, Alemania). 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, Madrid). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).
- Los vasos sanguíneos se canularon con catéteres Braun de tamaño 0,5 mm x 0,9 mm y de FepTeflon de 0,7 mm x 16 mm (B. Braun Sugical GMBH, Melsungen, Alemania). Para canular el conducto biliar se usaron cánulas de polietileno PE-10 (Biotrol Pharma, París, Francia).
- Las bombas peristálticas utilizadas fueron del tipo Microperpex 2132, de LKB Instruments (Pharmacia España, Madrid).
- Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador modelo RoboCycler Gradient 96 de Stratagene (La Jolla, EE.UU.). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato ABI Prism 5700 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.
- 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).

- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo GelDoc 2000 (BioRad) perteneciente al Instituto de Microbiología-Bioquímica.
- La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.
- 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).
- La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.
- El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70 (Telstar Industrial). Las células se mantenían a 37°C en una estufa en ambiente de CO<sub>2</sub> modelo New Brunswick Scientific (Pacisa+Giralt) y se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert F S (Leitz). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N<sub>2</sub> líquido.
- Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss).
- 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). El material de cultivos se esterilizaba en un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Pacisa+ Giralt).
- 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 (Salamanca).
- 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  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid).

- También 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 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro termostalizada 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 (FACStation OSX5.2) utilizando el software CELL Quest V 3.1.

- Las medidas de quimioluminiscencia se tomaban en un equipo de análisis de imagen LAS-4000. La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f0,8. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0.

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

- Además se contó con pequeño equipamiento como un agitador magnético calefactor Selecta (Duerolab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

- Todo el material de vidrio utilizado para las síntesis químicas procedía de Afora (Madrid). Cuando era utilizado en biología molecular se trataba mediante calor seco, durante un mínimo de 4h, en una estufa termostalizada a 180°C, modelo S-20 (Selecta).

### 3.2. SÍNTESIS *IN VITRO* DE ARNm DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Para la síntesis *in vitro* del ARNm de los transportadores de aniones orgánicos Oatp1a1, Oatp1a4 y Oatp1b2 de rata, OATP1B1, OATP1B3 humanos y las proteínas Asbt y Ntcp de rata y NTCP humana, se empleó el kit comercial “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” (Ambion), siguiendo las especificaciones del proveedor. En la tabla 1 se recogen los plásmidos recombinantes que contienen las ORFs de estas proteínas correctamente orientadas para la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7, así como también el tamaño del ARNm sintetizado de cada transportador.

**Tabla 1.** Plásmidos recombinantes usados en la síntesis *in vitro* de ARNm

| Plásmido recombinante | Tamaño del plásmido recombinante (pb) | Endonucleasa (Linealización) | Tamaño del ARNm sintetizado (pb) |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| pSPORT1-Oatp1a1       | 6853                                  | XbaI                         | 2744                             |
| pSPORT1-Oatp1a4       | 7728                                  | NotI                         | 3619                             |
| pSPORT1-Oatp1b2       | 6647                                  | HindIII                      | 2538                             |
| pCMV6XL4-OATP1B1-1b   | 7070                                  | XbaI                         | 2451                             |
| pCMV6XL4-OATP1B3      | 7427                                  | XbaI                         | 2763                             |
| pBSKS-Ntcp            | 4552                                  | PvuII                        | 1920                             |
| pSPORT1-NTCP          | 5676                                  | XbaI                         | 1638                             |
| pSPORT1-Asbt          | 5244                                  | HindIII                      | 1218                             |

Los plásmidos recombinantes pSPORT1-Oatp1a1, pSPORT1-Oatp1a4, pSPORT1-Oatp1b2, pCMV6XL4-OATP1B1-1b, pCMV6XL4-OATP1B3, pBSKS-Ntcp y pSPORT1-NTCP fueron cedidos generosamente por los Drs. Peter Meier, Bruno Hagenbuch y Bruno Stieger del Hospital Universitario de Zurich (Suiza). El plásmido pSPORT1-Asbt fue clonado previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Marta Vicéns (Vicéns *et al.*, 2007).

De acuerdo con las indicaciones del kit, el primer paso para la síntesis *in vitro* del ARNm a partir de ADN plasmídico fue la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la ORF con una enzima de restricción. 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 está indicada la enzima de restricción escogida en cada caso para la linealización.

Una vez libre de contaminantes, se utilizó el ADN plasmídico linealizado para la síntesis *in vitro* del ARNm con caperuza de metil-GTP en 5'. Una vez finalizada 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 y se cuantificó por el método del



RiboGreen (apartado 3.11.1). 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).

### 3.3. 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 las proteínas objeto de estudio.

#### 3.3.1. Extracción y selección de los oocitos

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de una solución de ketamina (Ketolar). El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral de 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.

Tras disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se seleccionaron los que se encontraron en el estadio 6 de maduración con ausencia de deformaciones. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18°C en medio Barth hasta que se realizó la inyección del ARN. La viabilidad de los oocitos se chequeaba mediante el test de formazán (apartado 3.11.6). En la figura 1 se muestra una imagen de oocitos de *X. laevis* en distintos estadios de maduración.

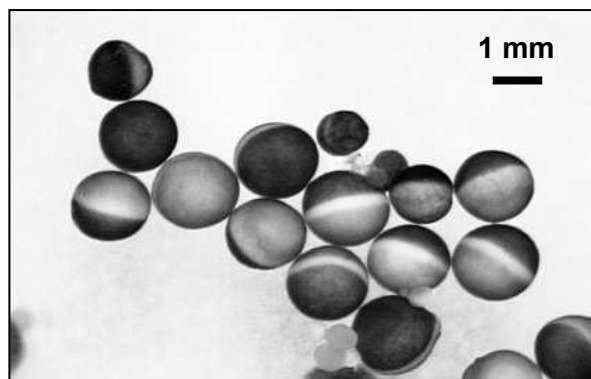


Figura 1. Imagen de oocitos de *X. laevis* extraídos y disgregados.



### 3.3.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los oocitos se inyectaron con microcapilares 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 la expresión de un transportador de membrana, cada oocito se inyectó con 9 ng del ARNm sintetizado *in vitro*. Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días, ya que en experimentos previos se comprobó que la expresión de las proteínas transportadoras era óptima.

### 3.3.3. Estudios funcionales de los transportadores de membrana en los oocitos

Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaban 3 veces con solución de captación sin sustrato y se separaban en grupos de 10 oocitos por condición experimental.

A continuación, se incubaban en grupos de 10 oocitos durante el tiempo estipulado, en un baño a 25°C, con 100 µl de la solución que contenía el sustrato a ensayar, con o sin inhibidor. Un grupo de oocitos no inyectados se incubaba también con los sustratos y se utilizaba como blanco de captación.

Para parar la captación, los oocitos se lavaban 4 veces sucesivas con solución de captación sin sustrato a 4°C. A continuación, se procesaban para la determinación de la radiactividad captada, para lo cual, los oocitos se digerían con 200 µl de SDS al 0,5% (p/v) durante al menos 2 h, antes de añadir líquido de centelleo.

Un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm de los transportadores (silvestres) se incubó en paralelo y se utilizó para determinar el transporte inespecífico.

La captación neta mediada por los 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.

Los experimentos se repitieron al menos tres veces, usando oocitos obtenidos de tres ranas diferentes.

### 3.4. CULTIVOS CELULARES

El medio de cultivo estéril para la línea celular CHO-K1 fue DMEM suplementado con: 50 g/l de L-prolina, 3,7 g/l de bicarbonato sódico y 5,96 g/l Hepes. Las células establemente transfectadas con el transportador OATP1B1 se cultivaron en presencia de geneticina G-418 a una concentración de 500 mg/l.

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares LS174T, Jeg-3, HepG2 y Caco-2 fue MEM suplementado con: 552 mg/l de piruvato sódico y 11 g/l de bicarbonato sódico. La sublínea resistente al cisplatino LS174T/R<sub>e</sub> creció en presencia de una concentración de este fármaco de 10 µM.

A todos se les añadió suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min.

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 N<sub>2</sub> 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 introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Cuando se llegaba a confluencia del cultivo se realizaba 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.

#### 3.4.1. Experimentos en células establemente transfectadas con OATP1B1

Para el estudio del transporte de faloidina por OATP1B1 se usaron células CHO silvestres y establemente transfectadas con este transportador (Gui *et al.*, 2008).

24 h antes del experimento, se cambió el medio de cultivo por medio fresco que contenía 10 mM de butirato sódico para incrementar las síntesis de proteínas (Palermo *et al.*, 1991).

Para confirmar la expresión de OATP1B1 se realizó un estudio de inmunocitoquímica acoplada a microscopía confocal en células sembradas para tal fin en cubres estériles dentro de placas de 24 pocillos (apartado 3.6). La capacidad de estas células para

captar faloidina fue confirmada por microscopía de fluorescencia usando faloidina marcada con FITC 1  $\mu$ M como sustrato y BALU-1 50  $\mu$ M como inhibidor.

Para realizar los experimentos de transporte se eliminó el medio de las placas por aspiración y se lavaron 2 veces. En cada placa se añadieron 700  $\mu$ l de medio que contenía 10  $\mu$ M de faloidina sola o en presencia de 100  $\mu$ M de BALU-1 y se incubaron en la estufa a 37°C durante 30 min. Para determinar el grado de contaminación con faloidina extracelular, se añadió al medio de captación en el minuto 0, junto con la faloidina, rafinosa 1 mM, un compuesto que apenas es captado y metabolizado por las células, y que por tanto puede usarse como marcador del medio extracelular.

A continuación, tras el tiempo de incubación, se lavaron las placas 3 veces con medio de captación enfriado en hielo y se determinó el contenido celular de faloidina por HPLC-MS/MS (apartado 3.11.8).

### **3.4.2. Experimentos de citometría de flujo**

En este trabajo hemos utilizado la técnica de citometría de flujo para cuantificar la acumulación intracelular de calceína por células LS174T silvestres o parcialmente resistentes al cisplatino (LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub>). Para la detección de la calceína 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). En todos los análisis se recogieron datos correspondientes a 5.000 eventos (células) como mínimo y se registró la fluorescencia media de la población celular.

#### **Procedimiento:**

Las células se sembraron en placas de 10 cm de diámetro, a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/placa. El experimento se inició a las 72 horas del cultivo, tiempo necesario para que se alcanzara subconfluencia. Las células, tras la tripsinización, se precipitaron y resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio de captación. Se determinó la carga celular de calceína en presencia o no de probenecid. 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 que contenía calceína-AM 1  $\mu$ M y yoduro de propidio 100  $\mu$ g/ml, incluido en el ensayo para excluir las células muertas, ya que dicho compuesto es incorporado a las células y se une al ADN celular cuando se pierde la integridad de la membrana plasmática. La captación se paró añadiendo medio a 4°C 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.

## **2.- Experimentos de captación a 15 min en presencia de un inhibidor:**

Las suspensiones de células se incubaron a 37°C, durante 15 min en la oscuridad y con agitación, en medio que contenía calceína-AM 1 µM y yoduro de propidio 100 µg/ml, en presencia o no de probenecid 500 µM, un inhibidor del transporte mediado por MRPs. La captación se paraba 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.

### **3.4.3. Transfección con lípidos catiónicos**

Las células se sembraban en placas de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células/cm<sup>2</sup> (8000 células por pocillo) en un volumen de 100 µl y se transfectaban 24 h después, añadiendo en cada pocillo diferentes cantidades de lípido y de ADN según el reactivo utilizado: lipofectamina LTX o FuGENE HD.

En trabajos previos de nuestro grupo se habían determinado las condiciones óptimas para realizar la transfección de células CHO-K1 y LS174T con lípidos catiónicos (González Sánchez, 2008). En el caso de células CHO-K1 la mezcla catiónica lipídica con la que se conseguía mayor eficacia de transfección y menor toxicidad sobre las células contenía 4,5 µl de lipofectamina por cada µg de ADN. Para las células LS174T la mezcla catiónica lipídica óptima era la formada por 2,5 µl de FuGENE y 1 µl de reactivo Plus por cada µg de ADN.

Para transfectar las células LS174T se utilizó una cantidad de plásmido de entre 100 y 500 ng por pocillo, según el diseño experimental. El ADN se diluyó con medio OptiMEM a temperatura ambiente, hasta un volumen de 25 µl por pocillo. Se añadió 1 µl de reactivo Plus por cada µg de ADN, que se une a las moléculas de ADN favoreciendo la posterior formación de liposomas. Después de 5 min de incubación, se añadieron 2,5 µl del reactivo FuGENE por cada µg de ADN. Tras agitar la solución, se añadieron 25 µl de la mezcla catiónica lipídica a cada pocillo. Al día siguiente se sustituía el medio con los complejos lípido-ADN por medio fresco.

Para transfectar las células CHO-K1 se utilizó una cantidad de plásmido de 500 ng por pocillo. El ADN se diluyó con medio OptiMEM a temperatura ambiente, hasta un volumen de 20 µl por pocillo. Se añadieron 4,5 µl del reactivo lipofectamina LTX por cada µg de ADN y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para evitar la interacción de los complejos lípido-ADN con los antibióticos y el suero bovino fetal, se sustituyó el medio de cultivo por 100 µl de medio Advanced-MEM sin suero ni antibióticos, y se añadieron 20 µl de la mezcla catiónica lipídica a cada pocillo. Las células transfectadas se incubaban a 37°C durante 6 horas, tiempo en que se aspiraba el medio para retirar los complejos lípido-ADN y a cada pocillo se añadían 100 µl de medio de cultivo fresco.

## 3.5. EXPERIMENTOS *IN VIVO* EN RATAS

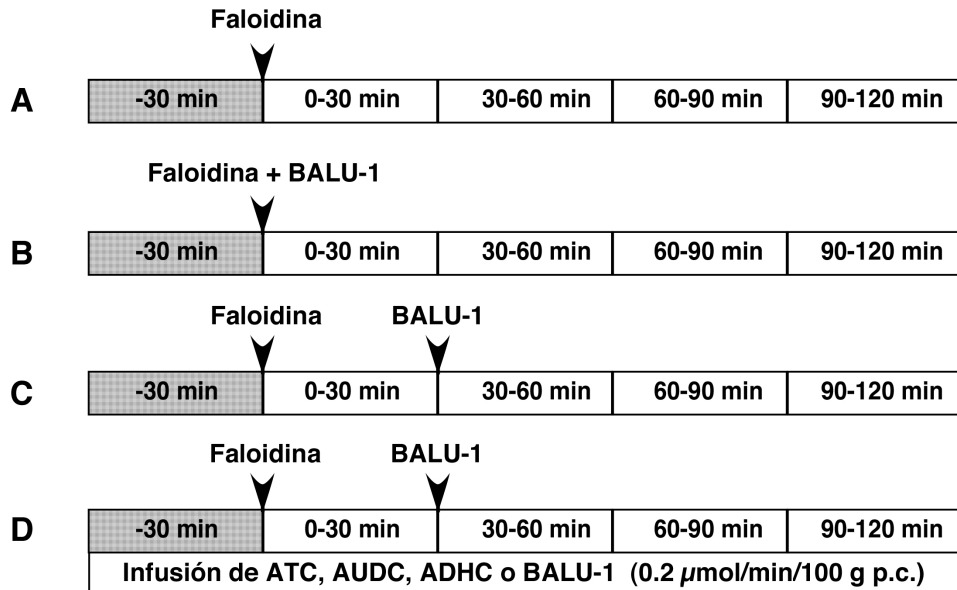
### 3.5.1. Estudios de secreción biliar

Se llevaron a cabo en ratas macho de entre 200 y 240 g, que permanecían en ayunas las 24 h previas al experimento. Tras la anestesia del animal con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/Kg p.c.) se iniciaba la intervención quirúrgica practicando una traqueotomía de rutina. A continuación, se disecaba el conducto biliar común y se introducía una cánula de polietileno. Otro catéter era implantado en la vena yugular para administrar por vía intravenosa los compuestos.

La recogida de muestras de bilis, que se iniciaba 10 min después de interrumpir la circulación enterohepática, se realizó en periodos de 10 min y en viales previamente tarados, que posteriormente se pesaban para determinar el flujo por diferencia de pesada, al considerar que la densidad relativa de la bilis es aproximadamente igual a uno (Klaassen, 1974). Los valores de flujo biliar obtenidos durante los primeros 30 min de recogida de bilis (entre los minutos -60 y -30 del periodo experimental) se consideraron como basales y se les adjudió por tanto el valor del 100%.

Todos los compuestos se disolvieron en solución salina, excepto el AUCD que fue disuelto en una solución a pH 8,3 (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM), y se administraron por vía intravenosa. Se siguieron cuatro diseños experimentales diferentes representados esquemáticamente en la figura 2:

- ⇒ **Diseño 1:** La faloidina era administrada sola a la dosis de 50 µg (63,4 nmol)/100 g p.c. en el minuto 0.
- ⇒ **Diseño 2:** La faloidina era administrada (50 µg/100 g p.c.) junto con una dosis de BALU-1 de 1,8 µmol/100 g p.c. en el minuto 0.
- ⇒ **Diseño 3:** La faloidina (50 µg/100 g p.c.) era administrada en el minuto 0 y el BALU-1 (1,8 µmol/100 g p.c. ó 3,6 µmol/100 g p.c.) en el minuto 30.
- ⇒ **Diseño 4:** La faloidina (50 µg/100 g p.c.) era administrada en el minuto 0 a animales que recibían una infusión continua de 0,2 µmol/min/100 g p.c. de ATC, BALU-1, ADHC o AUCD durante 150 min (desde el minuto -30 hasta el 120).



**Figura 2:** Representación esquemática de los diseños experimentales usados para los estudios de secreción biliar en ratas anestesiadas.

Al final del periodo experimental se recogía sangre por venopunción de la vena cava para analizar diferentes parámetros bioquímicos en el suero, mediante análisis de rutina, que se explican en el apartado 3.11.2. Además, se procedía a la obtención del hígado, aislándolo del diafragma y de las conexiones vasculares, nerviosas y biliares, y del riñón. Se lavaban con solución salina se secaban ligeramente y se pesaban. En algunos animales se recogieron biopsias hepáticas, a distintos tiempos tras la administración de la faloidina, para determinar la evolución temporal del daño tisular que induce.

Posteriormente, se determinaron los niveles de faloidina en bilis y tejido hepático, así como de BALU-1 y sus metabolitos en bilis, usando HPLC-MS/MS (apartado 3.11.8). Además se calculó la secreción de ABs mediante la determinación del flujo de bilis y la concentración de ABs siguiendo el método que se describe en el apartado 3.11.4.

Para determinar la capacidad del hígado para eliminar los compuestos en bilis, en un grupo de animales se administró, 120 min después de la inyección de faloidina sola o en presencia de una infusión continua de BALU-1, 150 nmol de FITC y se recogieron muestras de tejido 15 min después, para analizar en ellos el contenido intracelular del compuesto.

### 3.5.2. Modelo experimental de colestasis obstructiva

La colestasis obstructiva se provocó quirúrgicamente en ratas anestesiadas con isoflurano en el día 14 de la gestación, es decir, al comienzo de la tercera y última semana de gestación, mediante ligadura doble del conducto biliar común, por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos, y corte entre las dos ligaduras.

En el día 21 de gestación, tras anestesiarse a las ratas con pentobarbital sódico (i.p., 50 mg/Kg p.c.) se les realizó una incisión abdominal y se extrajo sangre de la madre por punción de la vena cava. Posteriormente se procedía a la obtención de muestras de tejido pulmonar de sus fetos que se congelaban inmediatamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido para el análisis por inmunofluorescencia, western blot, histológico y de actividad mieloperoxidasa (MPO), o bien se almacenaban en RNAlater para la determinación de los niveles de expresión de diferentes proteínas por PCR cuantitativa a tiempo real. En todos los casos se obtenía sangre fetal por sección de la vena yugular, que al igual que en caso de la de la madre se usaba para el análisis de diferentes parámetros bioquímicos en el suero mediante análisis de rutina (apartado 3.11.2).

Una vez recogidas las muestras de pulmón y sangre fetal se procedía a la recogida del pulmón de las madres en RNAlater para su posterior análisis por PCR cuantitativa a tiempo real, o bien se congelaba inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido para la determinación de actividad MPO, el análisis por WB. En algunos casos el tejido era previamente fijado con paraformaldehído al 4% y posteriormente embebido en parafina para su análisis histológico. En otros se realizaba una inyección intratraqueal de OCT, tras lo que el pulmón completo era congelado en N<sub>2</sub> líquido y almacenado a -80°C hasta llevar a cabo las criosecciones y el análisis por inmunofluorescencia. Además, en algunas madres se recogía lavado broncoalveolar (LBA).

En un grupo diferente de ratas gestantes, se obtenían crías recién nacidas (día 0) y se ajustaban las camadas a 6, para sacrificar 3 crías los días 3 y 5 de vida. Las madres se sacrificaron el día 5 post-nacimiento. De estos animales, bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/Kg p.c.), se extrajeron muestras de hígado y riñón que se sumergían inmediatamente en RNAlater para su posterior análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.

### **3.5.3. Marcaje del “pool” de ácidos biliares totales**

Para marcar el “pool” total de ABs, las ratas gestantes recibían <sup>3</sup>[H]-ATC por vía intraperitoneal el día 19 de gestación. El día 21 se recogían muestras de suero, hígado, riñón y pulmón de las madres y sus fetos. Además, se obtenía LBA de las madres. Se determinó la concentración de ABs totales en suero, así como la radiactividad en suero, LBA y tejidos.

## **3.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA**

### **3.6.1. Procesamiento de muestras**

#### **▪ Células en cultivo**

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en cubres estériles dentro de placas de cultivo de 24 pocillos con 500 µl de medio de cultivo y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaban entre el 60 y el 80% de confluencia.

#### **▪ Cortes de tejidos**

Los fragmentos de tejido pulmonar fetal se congelaron inmediatamente tras su obtención por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y a continuación, las muestras se almacenaron a -80°C.

El pulmón de las ratas gestantes se congelaba en N<sub>2</sub> líquido tras inyectarle por vía intratraqueal OCT, para mantener su estructura interna y evitar la rotura del tejido al realizar los cortes. Las muestras se almacenaban a -80°C.

Los cortes 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 utilización.

#### **▪ LBA**

Tras inyectar 10 ml de solución salina intratraquealmente a las ratas gestantes y recuperar todo el volumen, se centrifugó éste durante 5 min a 1000xg. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución salina, se colocaron en portas con ayuda de una citocentrífuga, y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

### **3.6.2. Inmunodetección**

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 3 min, y tras 3 lavados rápidos con PBS, se realizó un bloqueo con suero bovino fetal al 2% en PBS durante 30 min.

La incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La tabla 2 muestra las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio:



**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia

| Antígeno  | Nombre               | Especie de origen | Dilución utilizada | Procedencia |
|-----------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| OATP1B1   | ESL                  | ratón             | 1:100              | Abcam       |
| MRP2/Mrp2 | M <sub>2</sub> III-6 | ratón             | 1:25               | Alexis      |
| Reca-1    | MCA970GA             | ratón             | 1:20               | Serotec     |
| ED-1      | MCA341R              | ratón             | 1:50               | Serotec     |

### 3.6.3. 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 del anticuerpo secundario.
- Omisión del anticuerpo secundario marcado con fluorescencia para detectar autofluorescencia de las muestras o de los anticuerpos primarios.

## 3.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

### 3.7.1. Obtención de las muestras

#### ▪ Homogenados de tejidos

Los fragmentos de tejido pulmonar materno y fetal se homogeneizaron con un politrón durante 1 min a mínima potencia y a 4°C. Posteriormente, el homogenado se incubó durante 30 min sobre hielo y a continuación, se centrifugó dos veces a 500 xg durante 10 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (homogenado tisular) se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### ▪ Lisados de células

Una vez el cultivo alcanzó la confluencia deseada, se retiró el medio y la placa se lavó varias veces con PBS. A continuación se añadió el volumen necesario de buffer RIPA suplementado con 1% (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas para cubrir toda la superficie de la placa y se incubaron las células durante 25 min sobre hielo. Después

la superficie de la placa se raspó y el lisado celular se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó durante 20 min más sobre hielo. Ocasionalmente, se agitaba el lisado en un vortex. Finalmente, el lisado se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### 3.7.2. Inmunodetección

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T (tabla 3).

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot

| Antígeno | Nombre               | Especie de origen | Dilución utilizada | Procedencia |
|----------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| MRP2     | M <sub>2</sub> III-6 | ratón             | 1:300              | Alexis      |
| GAPDH    | 6C5                  | ratón             | 1:1000             | Santa Cruz  |
| FXR      | Ab56902              | ratón             | 1:500              | Abcam       |
| SHP      | H-160                | conejo            | 1:100              | Santa Cruz  |
| C/EBPβ   | C-19                 | conejo            | 1:250              | Santa Cruz  |
| HNF1α    | H-140                | conejo            | 1:500              | Santa Cruz  |
| HNF3β    | M-20                 | cabra             | 1:500              | Santa Cruz  |
| HNF4α    | H-171                | conejo            | 1:600              | Santa Cruz  |
| FLasa A2 | M-18                 | cabra             | 1:100              | Santa Cruz  |

La detección se realizó mediante incubación de la membrana durante 1 min, sin agitación, con los reactivos de detección ECL 1 y 2 mezclados a partes iguales (volumen requerido, 0,125 ml/cm<sup>2</sup>). Se eliminó el exceso de reactivos 1+2, se envolvió la membrana en papel de plástico y se tomaron fotografías en un equipo de análisis de imagen LAS-4000 durante el tiempo necesario para encontrar una señal detectable con el menor ruido de fondo.

## 3.8. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

### 3.8.1. Obtención de muestras

#### ▪ Cortes de tejidos

Los fragmentos de pulmón fetal se congelaron inmediatamente tras su obtención por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y a continuación, las muestras se almacenaron a -80°C. En el caso del tejido materno se realizaba una inclusión en parafina, fijando previamente el tejido con PFA al 4% durante 20 min.

Los cortes de 5  $\mu\text{m}$  se realizaron en un criostato a una temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  y se colocaron en portas, que se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### ▪ LBA

Tras inyectar 10 ml de solución salina intratraquealmente a las ratas gestantes y recuperar todo el volumen, se centrifugó éste durante 5 min a  $1000\times g$ . Las células se resuspendieron en 1 ml de solución salina y se pegaron en portas con ayuda de una citocentrífuga, que se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.8.2. Tinción de hematoxilina-eosina

Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min, y tras 3 lavados rápidos, se realizó una tinción por el método clásico de hematoxilina-eosina. Se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de alcohol y por último en xilol, y se realizó el montaje con entellán para su estudio al microscopio óptico.

### 3.8.3. Análisis del contenido celular de FITC

Los cortes se fijaron con metanol frío durante 3 min y, tras tres lavados con PBS de 10 min, se realizó el montaje con Dako Fluorescent Mounting Medium. Se colocó el cubre objetos y se selló con laca de uñas. La visualización del marcaje se realizó con un microscopio de fluorescencia.

## 3.9. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

### 3.9.1. Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras de tejidos se recogieron con material quirúrgico previamente tratado con inhibidores de RNAsas y se conservaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el agente de estabilización “RNA/ater” hasta el momento de la extracción del ARN total. Para comenzar, las muestras se lisaron y homogeneizaron en un tampón desnaturalizante que contenía tiocianato de guanidina, que inactiva las RNAsas 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. Finalmente, el ARN total se

elúa de las columnas con agua bidestilada libre de ARNasas y se cuantificaba fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.11.1).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1%. Las muestras 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. 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.

### **3.9.2. Transcripción reversa (RT)**

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc), que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT del ARN total extraído utilizando el método comercial “Enhanced Avian RT-PCR Kit” que contiene la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV-RT).

### **3.9.3. Diseño de cebadores**

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.

En las tablas 4, 5 y 6 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en este trabajo. El tamaño de los amplicones y los números de acceso de las secuencias diana para cada gen publicadas en la base de datos GenBank están detallados en cada una de las tablas.

**Tabla 4:** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

| Proteína/Gen            | Cebador Forward (5'-3')    | Cebador Reverse (5'-3')   | Amplicón (pb) | Nº de Acceso |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|--------------|
| ABCA2 ( <i>ABCA2</i> )  | CACGCGATGACTTCCTGTTTGTCA   | ATGGTCTTCATCACCTCCTTGAGC  | 58            | NM_001606    |
| ABCA3 ( <i>ABCA3</i> )  | ACTTCTCTAGCAGCACTGGGC      | ACTGAATCTTCAAGCGGAGCCAGA  | 77            | NM_001089    |
| ABCA6 ( <i>ABCA6</i> )  | CTACACCCTGCAGAAGCGGA       | ACTGAATCTTCAAGCGGAGCCAGA  | 83            | NM_080284    |
| ABCA8 ( <i>ABCA8</i> )  | GGCAGGTAAAGAGGTCTTGGGACT   | AGCTGTATGGTCCTTGTGCTCCTT  | 85            | NM_007168    |
| MDR1 ( <i>ABCB1</i> )   | GCGCGAGGTTCGGAATGGAT       | CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT  | 82            | NM_000927    |
| MDR3 ( <i>ABCB4</i> )   | CGAGGTTTCGAGGCTGAGATGGAT   | TCCTTGGCAGCTTGGACTATGTCT  | 73            | NM_000443    |
| BSEP ( <i>ABCB11</i> )  | GTGAAGGAATGGTGACCGTGGA     | GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT  | 63            | NM_003742    |
| MRP1 ( <i>ABCC1</i> )   | CCGCTCTGGGACTGGAATGT       | TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA  | 74            | NM_004996    |
| MRP2 ( <i>ABCC2</i> )   | TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA   | ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC  | 75            | NM_000392    |
| MRP3 ( <i>ABCC3</i> )   | CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG    | ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC  | 98            | Y17151       |
| MRP4 ( <i>ABCC4</i> )   | TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA     | CTTTGGCACTTTCCTCAATTAACG  | 140           | NM_005845    |
| MRP5 ( <i>ABCC5</i> )   | TTTGGGAAGTAGTCCGGATGGGCTT  | G TTCAGGAGAACTCGACCGTTGG  | 68            | NM_005688    |
| MRP6 ( <i>ABCC6</i> )   | GTGGGTTTCTGGCCTGGTCT       | ATGCTATTGCCTTGTGTGCCTCC   | 80            | NM_001171    |
| MRP7 ( <i>ABCC10</i> )  | TCATCAAATACCTGGATGCGGCCT   | TGAACACCTTGGTGGCAGTGAG    | 71            | NM_033450    |
| MRP8 ( <i>ABCC11</i> )  | CGGTCTCCTTTATTCTCCCACA     | AGCCTCTTAAACTGGCTGATGAAGT | 101           | NM_032583    |
| BCRP ( <i>ABCG2</i> )   | CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT | CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA  | 83            | NM_004827    |
| Menkes ( <i>ATP7A</i> ) | CAAACATCAAAGGCTCCTATCCAGCA | ACAATCCATACCAAGAGGGTGGCA  | 88            | NM_000052    |
| Wilson ( <i>ATP7B</i> ) | TTGAGCTGACAATCACAGGGATGAC  | ACTTAACAAGGGCTTTGCTGGTGG  | 83            | NM_000053    |
| LRP ( <i>MVP</i> )      | GCAGGACAATGAGAGGGTACTGTTT  | CCGAACTTGCCCTGTGACATCAA   | 96            | NM_017458    |

**Tabla 5:** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de factores de transcripción humanos por RT-PCR cuantitativa

| Proteína/Gen                   | Cebador Forward (5'-3')              | Cebador Reverse (5'-3')       | Amplicón (pb) | Nº de Acceso |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------|
| C/EBP $\beta$ ( <i>CEBPB</i> ) | GGCCGGTTTCGAAGTTGATGCAAT             | AGCAACAAGCCCGTAGGAACATCT      | 134           | NM_005194    |
| c-Fos ( <i>FOS</i> )           | AGGGGCAAGGTGGAACAGTTATCT             | GGTCTGTCTCCGCTTGGAGTGTAT      | 136           | NM_005252    |
| c-Jun ( <i>JUN</i> )           | GTTTGGGTATCCTGCCAGTGTT               | CGACATTCTTAACTCTTCAACTCCACCT  | 91            | NM_002228    |
| NRF2 ( <i>NFE2L2</i> )         | CGTCCCAGCAGGACATGGAT                 | AGCTCATACTCTTCCGTCGCTGA       | 75            | NM_006164    |
| c-Myc ( <i>MYC</i> )           | CAGCGACTCTGAGGAGGAACAA               | ACTCTGACACTGTCCAATTGACC       | 87            | NM_002467    |
| RAR $\alpha$ ( <i>NR1B1</i> )  | ACCGGGACAAGAAGTGCATC                 | TTGGACATGCCCACTTCAA           | 91            | NM_000964    |
| FXR ( <i>NR1H4</i> )           | GCAATTGTTATCCTGTCTCCAGATAGACAATACATA | GAGCTAGACCCCTCCCCTGTAA        | 288           | NM_005123    |
| PXR ( <i>NR1I2</i> )           | GCCCAGTGTCAACGCAGAT                  | GGCCCTCCTGAAAAAGCC            | 127           | NM_003889    |
| CAR ( <i>NR1I3</i> )           | TGGCATGAGGAAAGACATGATACTGT           | GGAGGCCTAAACTGCACAACT         | 192           | BC069651     |
| HNF4 $\alpha$ ( <i>NR2A1</i> ) | AAGAGGAACCAGTGCCGCTA                 | CGCATTGATGGAGGGCAG            | 141           | X87870       |
| SHP ( <i>NR0B2</i> )           | TGGCTTCAATGCTGTCTGGAGT               | CTGGCACATCGGGGTTGAAGA         | 100           | NM_021969    |
| HNF1 $\alpha$ ( <i>HNF1A</i> ) | CCTGTCCCAACACCTCAACAA                | TTGAAACGGTTCCTCCGC            | 175           | NM_000545    |
| HNF3 $\beta$ ( <i>FOXA2</i> )  | TATGCAGAGCCCGAGGGCTA                 | GCCGACATGCTCATGTACGTGTT       | 89            | NM_021784    |
| p53 ( <i>TP53</i> )            | CCTGGATTGGCAGCCAGACT                 | AAATCATCCATTGCTTGGGACGGC      | 72            | M14694       |
| YB-1 ( <i>YBX1</i> )           | GGACAAGAAGGTCATCGCAACGAA             | GGGGTTATTCTTCTTTATGGCAGTCTGGT | 139           | NM_004559    |

**Tabla 6:** Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-PCR cuantitativa.

| Proteína/Gen                | Cebador Forward (5'-3')     | Cebador Reverse (5'-3')  | Amplicón (pb) | Nº de Acceso |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| <i>Abca1 (Abca1)</i>        | GCTGATGTCAGTCTCCAGAAGGT     | CTGGTGCATCTAGCTTCTCCCT   | 154           | NM_178095    |
| <i>Abca3 (Abca3)</i>        | TATACTCTGAAGAAACGGAAGGTCCTA | TCTCCGACTGGATCTTCAAGC    | 106           | BC088202     |
| <i>Bcrp (Abcg2)</i>         | TTATGTGGTTCAAGATGACGTTGTG   | TTCCAACCTTGAATCTGCTACTTT | 173           | NM_181381    |
| <i>Erythropoietin (Epo)</i> | TTGCTACTGATTCTCTGGGCCT      | CTTCTGCACAGCCCATTGTGACAT | 130           | NM_017001    |
| <i>Fic1 (Atp8b1)</i>        | TGCCATTGGTCACGCGTA          | CGGATCACTTCCACACTGACATA  | 171           | NM_001106140 |
| <i>FLasa A2 (Pla2g2a)</i>   | CATCCCATCCAAGAGAGCTGACA     | GACCTGAATTGAACCAAAGGCCA  | 86            | NM_031598    |
| <i>Ftf (Nr5a2)</i>          | TGTGAAAGCTGCAAGGGTTTCT      | AACCGACAGTAAGGACATCGTTTT | 122           | NM_021742    |
| <i>Fxr (Nr1h4)</i>          | TGTTGGCTGAATGTTTGTTAACTGA   | CATAGCTTGGTCGTGGAGGTC    | 142           | NM_021745    |
| <i>Hnf4α (Hnf4a)</i>        | ACATGTA CTCTGCAGGTTTAGCA    | ATTTTGGACGGCTTCTTTCTTCAT | 122           | NM_022180    |
| <i>Il6 (Il6)</i>            | AGACTTCCAGCCAGTTGCCT        | GGCAGTGGCTGTCAACAACA     | 52            | NM_012589    |
| <i>Il1α (Il1alpha)</i>      | GATGACCTGGAGGCCATAGC        | TCTGGGTTGGATGGTCTCTTG    | 51            | NM_017019    |
| <i>Il1β (Il1beta)</i>       | AGACAGCTGCACTGCAGGCT        | CAGCACGAGGCATTTTTGTT     | 51            | NM_031512    |
| <i>Lxr (Lr1h2)</i>          | CTCCTGACTCTGCAACGGAGTT      | GGCTCGGATGACTCCAACC      | 145           | NM_031627    |
| <i>Mdr2 (Abcb4)</i>         | GGAAC TTTTCTTGCCAGTGAA      | CCACCACCTAGTCCCGAATAGTAG | 109           | NM_012690    |
| <i>Mrp1 (Abcc1)</i>         | ATCCGCTCTGGGATTGGAAT        | AGAGGTAGAAACAAGGCACCCA   | 102           | NM_022281    |
| <i>Mrp2 (Abcc2)</i>         | TTCTACCTTGCCAAGCAGGTGTT     | AGCCATGTGCACAGGTAGAGGATT | 146           | NM_012833    |
| <i>Mrp3 (Abcc3)</i>         | AAGGAGTCTTGCAACATGCAAAT     | CAAGGAGCTCATCTCTCATGAA   | 134           | NM_080581    |
| <i>Mrp4 (Abcc4)</i>         | TGTCAATCATACTCAGGAACCTGT    | TGTACCTCCTCTAGGGCTTTCCA  | 112           | NM_133411    |
| <i>Oatp1a1 (Slco1a1)</i>    | CTACTGCCCTGTTCAAGGCC        | ATTGTATCTCTCAGGATTCCGAGG | 69            | L19031       |
| <i>Oatp1a4 (Slco1a4)</i>    | AGACGTTCCCATCACAAACCAC      | GCCTCTGCAGCTTTTCTTGA     | 68            | AJ271682     |
| <i>Shp (Nr0b2)</i>          | TCTTCAACCCAGATGTGCCAG       | GAAGCCATGAGGAGGATTCTG    | 145           | NM_057133    |
| <i>Svct1 (Slc23a1)</i>      | TGTTCCAGGCCAGTGCCTT         | ACCACGCTGGACACCATGATT    | 181           | NM_017315    |
| <i>Svct2 (Slc23a2)</i>      | GAGGTATATTGACCCTTGACCATC    | GCATGGCAATGCCCCAGT       | 107           | NM_017316    |
| <i>Tgr5 (Gpbar1)</i>        | CACCTGCTGGCTGCTTCTTT        | GACCAGTACCCCTGATGGCTC    | 109           | NM_177936    |
| <i>Tnfα (Tnf)</i>           | TGATCGGTCCCAACAAGGAG        | TGATGAGAGGGAGCCCATT      | 51            | NM_012675    |
| <i>Hprt1 (Hprt1)</i>        | TGCTCGAGATGTCATGAAGGA       | CAGAGGGCCACAATGTGATG     | 51            | NM_012583    |





### 3.9.4. Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron las mismas en todos los casos. 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% 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).

La abundancia del ADN problema se corrigió por la GAPDH o Hprt1, determinado paralelamente en cada muestra. 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.

### 3.9.5. Cuantificación de los resultados

#### ▪ Cuantificación Relativa

En la cuantificación relativa los resultados, normalizados por la GAPDH o Hprt1, se expresaron como porcentaje respecto a la abundancia determinada en tejidos donde su expresión fue alta y fácilmente detectable (calibrador) y cuyos niveles se consideraron del 100%. Para calcular el porcentaje de abundancia del ARNm de una muestra respecto al calibrador, se usa la siguiente fórmula:

$$(\%) = 2^{-n}, \text{ donde } n = \Delta\Delta Ct \text{ siendo } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_c$$

$$\Delta Ct_m = Ct \text{ del gen diana en la muestra} - Ct \text{ del gen normalizador en la muestra}$$

$$\Delta Ct_c = Ct \text{ del gen diana en el calibrador} - Ct \text{ del gen normalizador en el calibrador}$$

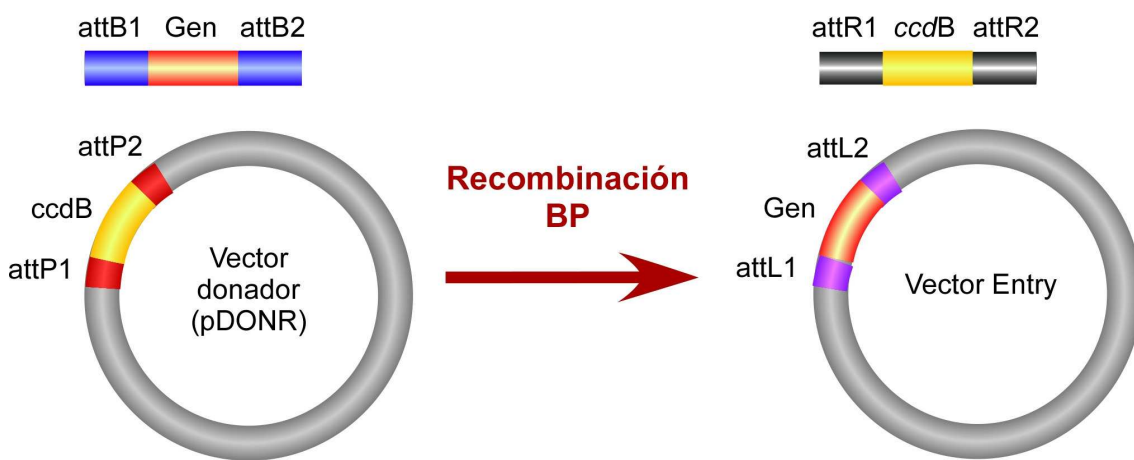
## 3.10. CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN GATEWAY

### 3.10.1. Fundamento

Es una tecnología de clonación altamente eficaz para clonar de manera direccional fragmentos de ADN (Hartley *et al.*, 2000). Está basada en el sistema de recombinación del fago lambda y permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes

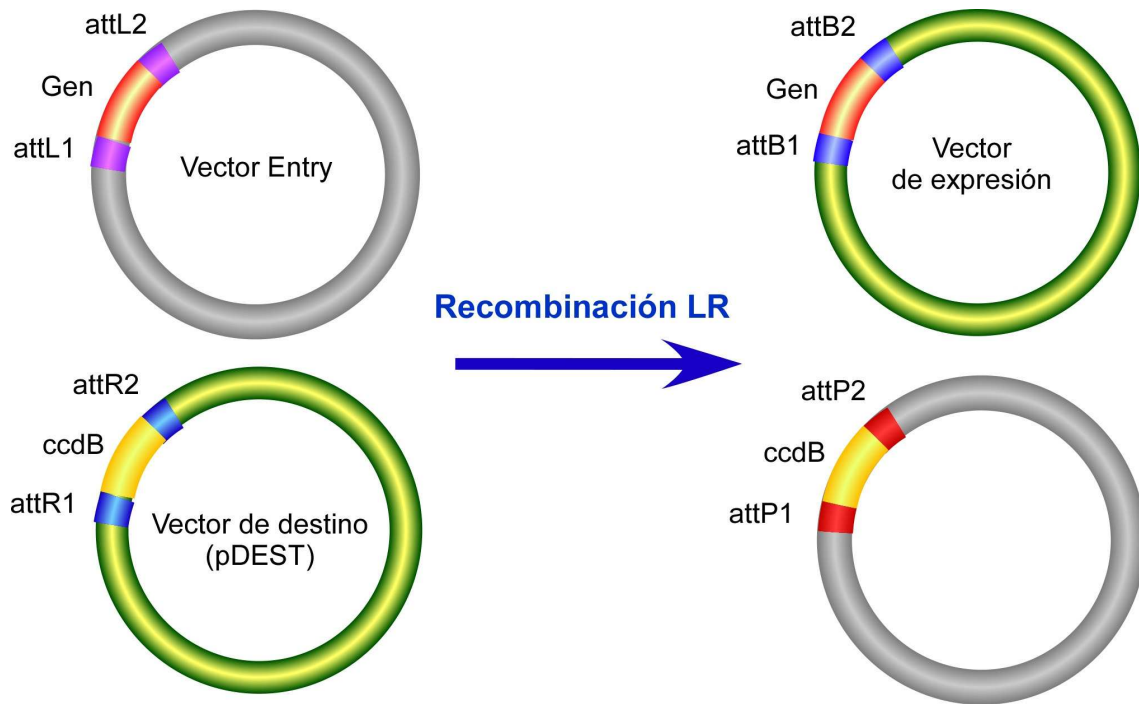
vectores manteniendo la orientación y la secuencia de lectura con respecto a los tripletes. Las reacciones de recombinación Gateway son versiones “in vitro” de las reacciones de integración y escisión del fago lambda. Es un método de clonación más rápido y eficaz que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción.

La reacción BP (Figura 3) es aquella en la que un vector donador (pDONR), con sitios attP, reacciona con un fragmento de ADN flanqueado por sitios attB, para dar lugar a un vector denominado “Entry”, con sitios attL, y un producto secundario con sitios attR. Los sitios att confieren direccionalidad y especificidad a la reacción (Hartley *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Esquema de la reacción de recombinación BP.

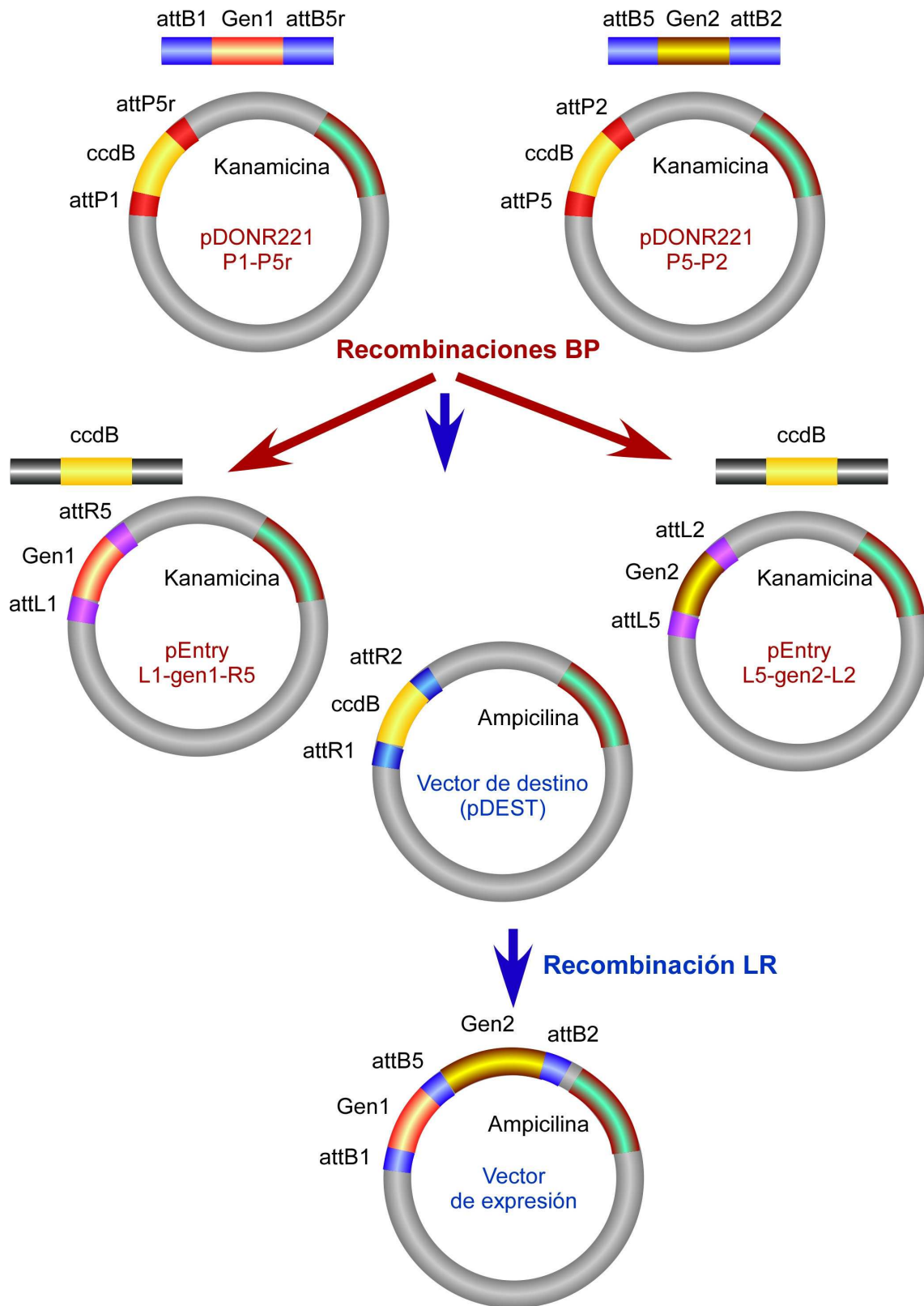
La reacción LR (Figura 4) es aquella en la que un vector “Entry”, con el ADN de interés flanqueado por sitios attL, reacciona con un vector de destino para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente (Hartley *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Esquema de la reacción LR.

El gen *ccdB* que contienen algunos vectores intermedios impide el crecimiento de las bacterias que posean un vector donador o de destino no recombinado, o un producto secundario. El producto del gen *ccdB* interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen dichos vectores, que se desean eliminar del proceso de selección. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* pueden llevarse a cabo en la cepa de bacterias One Shot *ccdB* Survival T1, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

La clonación Gateway permite incluso la transferencia de varios fragmentos de ADN entre diferentes vectores en un único ensayo (Figura 5) (Magnani *et al.*, 2006). A este tipo de recombinación se le denomina "Multisite Gateway".



**Figura 5.** Esquema de la clonación de dos genes en un mismo vector de expresión por recombinación "Multisite Gateway".

### 3.10.2. Obtención de ADN genómico humano

Se partió de células Jeg-3 de coriocarcinoma humano. Los ácidos nucleicos se aislaron por extracción fenol-cloroformo, utilizando las columnas Phase Lock Gel para separar la fase acuosa con los ácidos nucleicos de la fase orgánica, y se precipitaron con etanol.

### 3.10.3. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR de alta fidelidad

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR del promotor de MRP2 se diseñaron en base a la secuencia AF144630 de la base de datos GenBank, y para la de la ORF de luciferasa de luciérnaga, a partir de la secuencia del vector comercial pGL4.10[Luc2].

Un producto de PCR adecuado para ser usado en una reacción de recombinación BP Gateway con un vector donador debe tener secuencias attB en los extremos (Tabla 7). En el caso de la clonación de una sola secuencia (Z1-prMRP2, Luc2), se añadió en los extremos de los oligonucleótidos la secuencia attB1 para el “primer forward” y attB2 para el “primer reverse”. En el caso de la clonación de dos fragmentos de ADN (en cabeza Z1, Z2 ó Z3-prMRP2) y en cola la ORF de luciferasa de luciérnaga), para clonar el primer pEntry se añadió la secuencia attB1 en el “primer forward” y la secuencia attB5r en el “primer reverse”. La PCR se llevó a cabo con la enzima AccuPrime Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad. Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN el gel de agarosa.

**Tabla 7.** Secuencia de los adaptadores attB añadidos en el extremo de los oligonucleótidos.

| Adaptador | Secuencia                       |
|-----------|---------------------------------|
| attB1     | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC |
| attB2     | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG  |
| attB5r    | GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGT     |
| attB5     | GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGGC    |

### 3.10.4. Clonación del producto de PCR por recombinación BP

Cada producto de PCR se clonó en el vector donador adecuado (pDONR207 P1-P2, pDONR221 P1-P5r o pDONR221 P5-P2), según los sitios attB que lo flanqueaban, mediante una reacción de recombinación con la enzima clonasa BP II.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico. Se sembraron en placas de medio LB con agar, suplementado con el antibiótico

correspondiente, según el vector donador elegido. Algunas de las colonias que aparecieron en la placa de agar se crecieron en medio LB líquido suplementado con antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico. La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción.

### **3.10.5. Recombinación LR con un único vector Entry**

Consistió en la recombinación de un vector Entry con un vector de destino para dar un vector de expresión. Fue el caso de la clonación de Z1-prMRP2 en un vector de expresión que contenía la ORF de GFP, o de la ORF de luciferasa de luciérnaga en un vector de expresión que carecía de promotores, para ser utilizado en los experimentos de transfección de células como control negativo.

### **3.10.6. Recombinación LR “Multisite Gateway”**

Consistió en la recombinación de dos vectores Entry, uno que contenía Z1, Z2 ó Z3-prMRP2 y otro la ORF de luciferasa de luciérnaga, con un vector de destino, para dar un vector de expresión en el que clonaron de forma direccional ambos fragmentos de ADN.

## **3.11. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **3.11.1. Valoración del ARN y ADN por fluorimetría**

El ARN total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial “RiboGreen RNA Quantification kit”. Para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena se utilizó el método comercial “Pico-Green DNA-Quantitation Kit”.

### **3.11.2. Determinación de la concentración sérica de marcadores de funcionalidad hepática**

Se determinaron marcadores de daño hepático y renal en muestras de suero en un Vitros 5,1 FS Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostics, Barcelona) y un Analizador Modular DPP (Roche Diagnostics, Barcelona). Se determinaron los siguientes parámetros: aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (GPT), gamma glutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenada (LDH) y fosfatasa alcalina (ALP).

### **3.11.3. Determinación de la actividad MPO**

Se determinó la actividad MPO en muestras de tejido hepático y pulmonar de ratas gestantes a término y sus fetos siguiendo un método colorimétrico basado en el uso de tetrametilbencinida (TMB), un sustrato de la mieloperoxidasa, que al reaccionar con ella da lugar a un producto de color azul (Bhatia *et al.*, 1998).

### **3.11.4. Determinación de la concentración de ácidos biliares en bilis**

Los ABs totales en bilis se determinaron siguiendo el método de Talalay (1960) (Talalay, 1960) en el cual se aprovecha la existencia de un grupo hidroxilo en posición  $3\alpha$  del núcleo esteroideo de los ABs, para oxidarlo a grupos ceto en presencia de NAD por acción de la enzima  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que convierte el NAD en NADH.

### **3.11.5. Determinación de ácidos biliares totales en suero**

La extracción de los ácidos biliares del suero, para su posterior determinación por fluorescencia requería la separación por cromatografía en cartuchos Sep-Pak con relleno C18. Los ácidos biliares totales en suero se determinaron fluorimétricamente siguiendo el método de Talalay (1960) modificado por Mashige (1976).

### **3.11.6. Determinación de la viabilidad celular**

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. 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). En este estudio se utilizó el kit comercial "CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay" que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

### **3.11.7. Determinación de proteínas totales**

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), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

### 3.11.8. Determinación de compuestos por LC-MS-MS

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS-MS) combina las propiedades de separación física del 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.

En el equipo utilizado en este estudio, el analizador de masas es un triple cuadrupolo. Un cuadrupolo está formado por cuatro rodillos paralelos sobre los que se aplican potenciales eléctricos de corriente continua y radiofrecuencias, 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.

#### ▪ Análisis de faloidina por LC-MS-MS

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Zorbax C18 (30 mm x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) termostata a 35°C, y como fase móvil una mezcla de metanol:agua (55:45), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,01% ácido fórmico, pH 4,6. Utilizando este método cromatográfico el tiempo de retención de la faloidina fue de 0,73 min.

Para la medida del contenido de faloidina en bilis y tejido hepático se modificó el método de separación cromatográfica, utilizando para esas muestras como fase móvil una mezcla de metanol:agua (45:55). El tiempo de retención de la faloidina para este método fue de 0,99 min.

La determinación de la faloidina, la rafinosa y el ATC en el triple cuadrupolo se llevó a cabo en ionización negativa para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizadas. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas ( $N_2$ ) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V. Para medir la abundancia de los tres compuestos se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ion molecular -  $H^+$ ) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso de la faloidina se siguió la transición específica de 787,3  $m/z$  a 743,2  $m/z$ , para la rafinosa se siguió la transición del ion precursor 503,3  $m/z$  los iones producto 179,0  $m/z$  y 221,0  $m/z$ , y para el ATC se siguió la transición 514,3  $m/z$  a 80,2  $m/z$ .

Se construyeron rectas patrón para cada uno de los tres compuestos mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,05 a 5  $\mu$ M.

En los experimentos con células CHO se corrigió la concentración de faloidina, calculada a partir de su recta patrón, por la contaminación con medio extracelular, cuantificada a partir de los niveles de rafinosa detectados (<0,8% del contenido



celular), y por la recuperación obtenida para el estándar interno ATC ( $94,8 \pm 8,6\%$ ). En el método cromatográfico utilizado, el tiempo de retención del ATC fue de 2,5 min y el de la rafinosa de 0,56 min.

#### ▪ Análisis del metabolismo de BALU-1 por LC-MS-MS

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Zorbax C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) termostaticada a 35°C, y como fase móvil una mezcla de metanol:agua (70:30), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,01% ácido fórmico, pH 4,6. El tiempo del análisis fue de 10 min. Utilizando este método cromatográfico el tiempo de retención del BALU-1 fue de 6,2 min.

Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas ( $N_2$ ) 350°C, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V. Para buscar la presencia de posibles metabolitos de BALU-1 en la bilis se empleó el modo de trabajo MS2-scan, y se compararon los cromatogramas que recogen los iones totales (*Total Ion Chromatogram = TIC*) obtenidos para la bilis basal con los de la bilis recogida durante una infusión intravenosa continua del compuesto.

La presencia de BALU-1 en la bilis se confirmó en el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica del ion precursor (ion molecular -  $H^+$ ) 506,3 *m/z* al ion producto 488,2 *m/z*.

#### 3.11.9. Determinación de la actividad luciferasa

Para generar luz, la luciferasa de luciérnaga requiere luciferina, ATP,  $Mg^{2+}$  y oxígeno molecular, mientras que la de *Renilla* sólo requiere celenterazina y oxígeno molecular. El sistema Dual-Glo de luciferasa permite analizar la actividad luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* expresadas en células de mamífero. El kit incluye un reactivo para lisar las células que contiene también sustrato para la luciferasa de luciérnaga, produciendo luz, cuya intensidad se estabiliza después de un tiempo. El segundo reactivo "Dual-Glo Stop&GLO", de manera simultánea, inactiva la luciferasa de luciérnaga y contiene los reactivos para que se produzca la reacción en la que la luciferasa de *Renilla* genera luz.

La luz se medía en el equipo de análisis de imagen LAS-4000. La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f0,8. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0.

Para determinar la actividad de la luciferasa de *Renilla*, se añadían a continuación 50  $\mu$ l de otra solución que contenía celenterazina. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se medía la luz.

Para corregir diferencias en la luminiscencia causadas por variaciones en el número de células o la viabilidad celular, previamente a la adición de los reactivos de luciferasa se realizaba el test de formazán.

### **3.11.10. Determinación de la expresión de GFP**

La fluorescencia de las células que expresaban GFP se visualizó en un microscopio de fluorescencia, con una cámara fotográfica y un sistema de análisis de imagen. Se utilizó un filtro de emisión de paso de banda estrecho (450 a 490 nm).

Partiendo de células cultivadas en placas de 24 pocillos y transfectadas por el método de los lípidos catiónicos, se obtenía una suspensión de células individualizadas que se analizaba en el citómetro de flujo, utilizando un láser de argón de 488 nm como fuente de excitación. Para el estudio de las características celulares se analizaron los parámetros FSC y SSC, que indicaban tamaño y complejidad celular, respectivamente y la emisión de fluorescencia medida con el detector FL1.

### **3.12. 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 o el test de *t* de Student de valores apareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las correlaciones lineales se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados.

El análisis estadístico se realizó en un ordenador Macintosh G5 (Apple Computer, Inc., Cupertino, EE.UU.).

# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



#### 4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE NUEVOS DERIVADOS DE ABs PARA INHIBIR LA CAPTACIÓN HEPÁTICA DE TOXINAS MEDIADA POR OATPs

La recolección y consumo de setas silvestres produce un notable número de intoxicaciones cada año por la ingestión accidental de setas venenosas. La ingestión de *Amanita phalloides* es la causa la muerte del 20% de los adultos intoxicados por consumo de setas venenosas y llega al 50% de los casos en niños (Jander *et al.*, 2000a; Jander *et al.*, 2000b).

La toxicidad de esta seta se debe, principalmente, a las amatoxinas, que pueden provocar la muerte a los pocos días de la ingestión de la seta. Otras toxinas presentes en esta seta, como las virotoxinas, falolisina y falotoxinas, parece que juegan un papel menos importante, cuantitativamente, en las intoxicaciones mortales (Wieland, 1983).

Las toxinas contenidas en estas setas producen un daño en dos fases; primero aparecen trastornos gastrointestinales y, a continuación, fallo hepático. (Cappell *et al.*, 1992). Además, pueden aparecer síntomas indicativos de daño renal (Beaudreuil *et al.*, 1998).

La principal falotoxina presente en *Amanita phalloides* es la faloidina (Wieland *et al.*, 1959), un heptapéptido bicíclico cuyos efectos tóxicos están limitados por su escasa absorción intestinal, que ocurre por mecanismos diferentes a los que median el transporte de ácidos biliares (ABs) (Petzinger *et al.*, 1982a). Sin embargo, se ha demostrado que, si llega al hígado, provoca un daño muy severo (Dubin *et al.*, 1978) debido a la gran eficacia de los hepatocitos para captarla (Petzinger *et al.*, 1982b; Petzinger *et al.*, 1984). La acumulación en el interior de las células induce la polimerización irreversible de los filamentos de actina, observándose acúmulos de microfilamentos en la región citoplasmática próxima a la membrana canalicular (Gabbiani *et al.*, 1975; Cooper, 1987). Las consecuencias de esta alteración son: reducción de la contractibilidad canalicular, pérdida de la integridad de las “tight-junctions”, alteraciones del tráfico vesicular e incremento de la permeabilidad paracelular. Todo ello produce una reducción del flujo de bilis (Elias *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1983; Dumont *et al.*, 1994), acumulación de componentes de la misma y necrosis de las células hepáticas (Mengs *et al.*, 1981), lo que se manifiesta por una elevación de los marcadores séricos de daño hepático, tales como la fosfatasa alcalina, las transaminasas o la bilirrubina (Ishizaki *et al.*, 1997).

A pesar del evidente interés en prevenir el efecto dañino de esta toxina, no existe un antídoto eficaz frente a la intoxicación con faloidina. Los tratamientos disponibles incluyen la plasmaféresis o el uso de penicilina o silibinina (Jander *et al.*, 2000a; Jander *et al.*, 2000b). Por otro lado, algunos compuestos que se han investigado para prevenir el daño hepático y que han demostrado tener moderados efectos protectores, parece que actúan a través de un mecanismo no relacionado con la estimulación del

metabolismo hepático (Zanoli, 1979). Sin embargo, en muchos casos el trasplante hepático es el único tratamiento eficaz.

Con todos estos antecedentes se ha propuesto como estrategia farmacológica la prevención de la captación de las toxinas por los hepatocitos mediante el uso de inhibidores competitivos o no competitivos, seguida de la estimulación de la eliminación en orina por diuresis forzada. En este sentido, se ha propuesto el uso de rifampicina y otros compuestos como posibles antidotos en el tratamiento de las intoxicaciones por amatoxinas, dada su capacidad para inhibir la captación hepática de las mismas (Letschert *et al.*, 2006).

Recientemente, se han identificado las proteínas transportadoras implicadas en la captación de la faloidina por los hepatocitos. Se trata de varios miembros de la familia de OATPs que, junto con los transportadores sodio-dependientes NTCP y ASBT, juegan un papel clave en la captación de ABs y otros aniones orgánicos por los hepatocitos y las células del epitelio ileal. Así, las proteínas OATP1B1 humana y Oatp1b2 de rata parecen ser la principal ruta de captación de faloidina por los hepatocitos, mientras que las isoformas OATP1B3 humana y Oatp1a1 y Oatp1a4 de rata probablemente jueguen un papel mucho menos importante en este proceso (Fehrenbach *et al.*, 2003; Meier-Abt *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008). Esto parece ser consistente con estudios previos en los que la presencia en el medio extracelular de sustratos típicos de estos transportadores, como los ABs, reducen la captación de faloidina por los hepatocitos (Frimmer *et al.*, 1977; Petzinger, 1981). En cuanto al transporte de faloidina a través de la membrana canalicular de los hepatocitos, estudios *in vivo* (Gavrilova *et al.*, 2007) e *in vitro* (Fehrenbach *et al.*, 2003) sugieren que la proteína MRP2 podría estar implicada en la excreción biliar de la toxina.

Por esta razón, nuestro objetivo fue evaluar la utilidad de inhibidores de OATP1B1 como antidotos usados en casos de consumo accidental de setas venenosas, como la *Amanita phalloides*.

## 4.1.1. NUEVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE ÁCIDOS BILIARES: BALUs

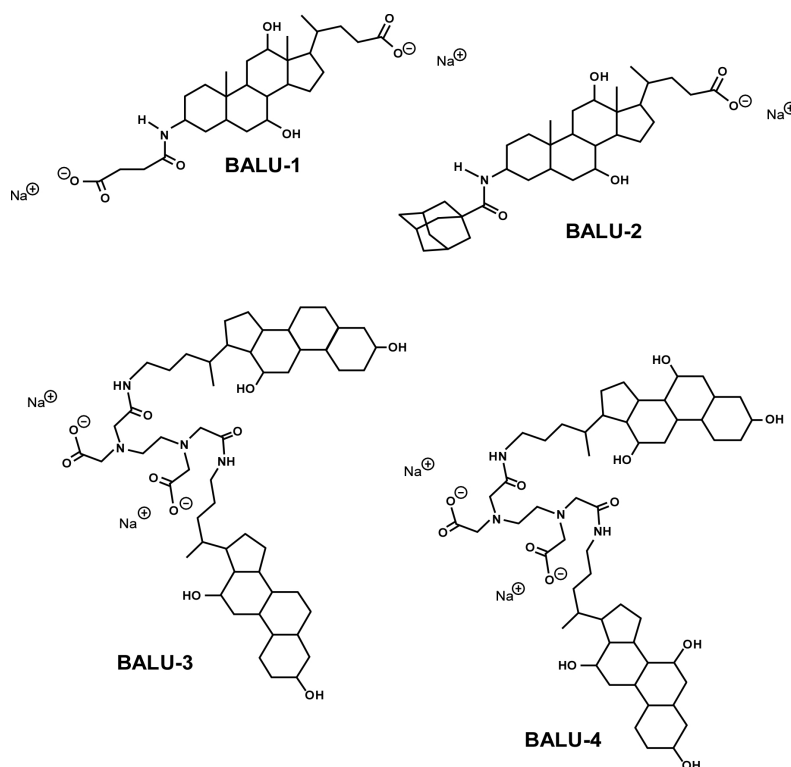
### 4.1.1.1. Estructura química

La síntesis y caracterización de los compuestos, que hemos denominado genéricamente BALUs, cuyas estructuras están representadas en la figura 1, fueron llevadas a cabo por el Dr. José Vázquez Tato del Departamento de Química Física, de la Universidad de Santiago de Compostela.

El compuesto BALU-1 ( $\text{Na}_2\text{-SuC}$ ) ( $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_1\text{Na}_2\text{O}_7$ , Pm= 551,62) consta de una molécula de ácido cólico (AC) a la que se ha unido un grupo succinilo en la posición  $3\alpha$ .

La molécula de BALU-2 ( $\text{Na-AdC}$ ) ( $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_1\text{Na}_1\text{O}_5$ , Pm= 591,80) posee en su estructura, además de un AC, una molécula de amantadina, un compuesto con propiedades antivirales utilizado en el tratamiento de la gripe (Jefferson *et al.*, 2006) y del que recientemente se ha sugerido que también podría ser útil en el tratamiento de la hepatitis B crónica (Joo *et al.*, 2006).

El compuesto denominado BALU-3 ( $\text{g-2DC}_{24}\text{-EDTA gemini}$ ) ( $\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{10}$ , Pm= 1055,38) está formado por dos moléculas de ácido desoxicólico (ADC) unidas a través de los carboxilos a un grupo espaciador. De manera análoga, el BALU-4 ( $\text{g-2C}_{24}\text{-EDTA gemini}$ ) ( $\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{12}$ , Pm= 1087,38) se compone de dos moléculas de AC unidas por un grupo espaciador.



**Figura 1:** Representación esquemática de la estructura molecular de BALU-1 ( $\text{Na}_2\text{-SuC}$ ), BALU-2 ( $\text{Na-AdC}$ ), BALU-3 ( $\text{g-2DC}_{24}\text{-EDTA gemini}$ ) y BALU-4 ( $\text{g-2C}_{24}\text{-EDTA gemini}$ ).

## 4.1.2. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

### 4.1.2.1. Efecto de los BALUs sobre transportadores expresados en oocitos de *Xenopus laevis*

Como hemos visto en el apartado anterior, los BALUs presentan como característica estructural común el contener en su molécula al menos un AB, lo que, en principio, podría favorecer la captación intestinal y hepática así como su secreción biliar por mecanismos similares a los de los ABs.

Por ello, nuestro primer objetivo fue investigar el efecto de estos compuestos sobre la captación de ABs mediada por transportadores localizados en la membrana basolateral de los hepatocitos.

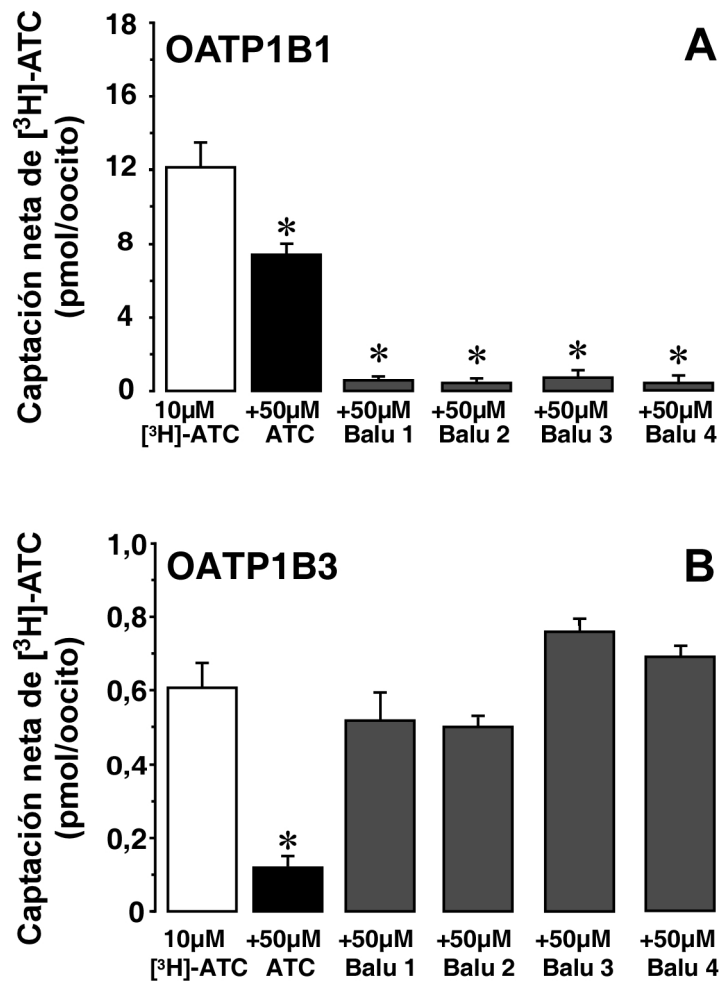
Así, medimos la captación de ácido taurocólico (ATC) por las principales proteínas transportadoras humanas implicadas en la captación hepática de aniones orgánicos, incluyendo ABs, desde la sangre sinusoidal hacia el interior del hepatocito, en presencia o ausencia de estos compuestos. El modelo experimental elegido para el estudio fue el de expresión heteróloga de proteínas transportadoras de membrana en oocitos de rana *Xenopus laevis*.

Se realizaron experimentos 48h después de la inyección del ARNm, ya que, según resultados preliminares de puesta a punto del modelo, en ese momento la expresión de las proteínas transportadoras era máxima. Los oocitos se distribuían en 6 grupos y eran incubados durante 60 min con una solución que contenía 10  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-ATC (grupo control) solo o en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de ATC no radiactivo, BALU-1, BALU-2, BALU-3 ó BALU-4.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos para las proteínas OATPs investigadas, OATP1B1 y OATP1B3. Como era de esperar, ambos transportadores captaron el ácido biliar ATC, aunque el OATP1B1 fue mucho más eficaz. Cuando los oocitos que expresaban OATP1B1 fueron incubados con una cantidad de ATC no marcado 5 veces superior a la de [ $^3\text{H}$ ]-ATC, la captación disminuyó un 38%, mientras que a la misma concentración, todos los BALUs indujeron una fuerte inhibición del transporte mediado por esta proteína (figura 2A) reduciendo en más de un 90% la captación de [ $^3\text{H}$ ]-ATC. Sin embargo, ninguno de ellos fue capaz de inhibir significativamente la captación mediada por OATP1B3 (figura 2B), mientras que el transporte se redujo un 83% en presencia de ATC 50  $\mu\text{M}$ .

La radiactividad captada por los oocitos no inyectados fue siempre inferior al 1% de la captación de los inyectados.



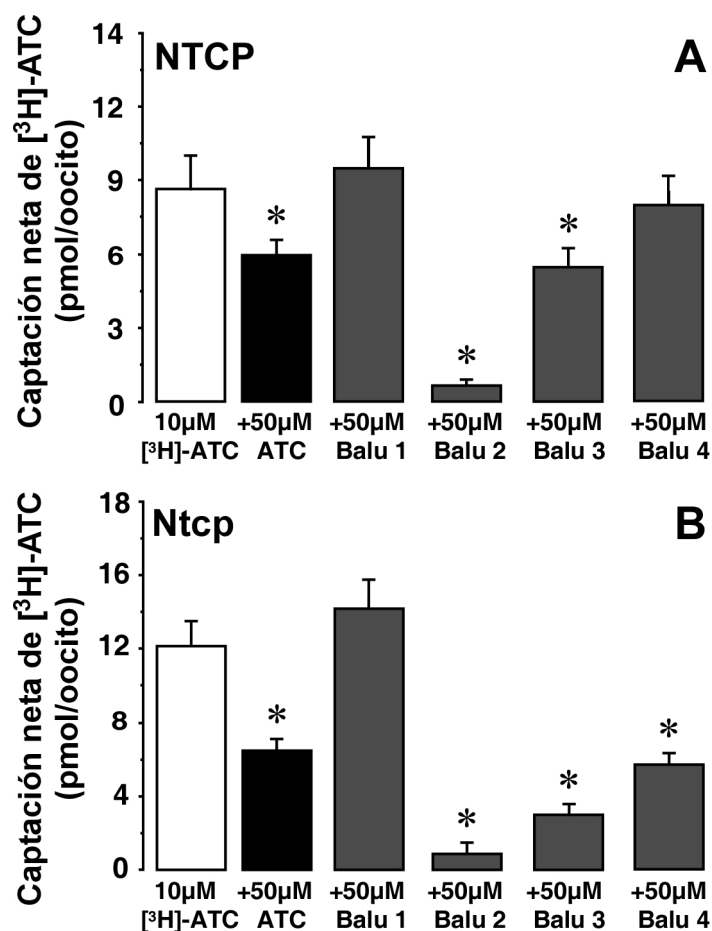


**Figura 2.** Captación neta de [<sup>3</sup>H]-ATC por oocitos inyectados con 9 ng de ARNm de OATP1B1 (A) u OATP1B3 (B). Los oocitos fueron incubados en presencia de 10 μM de [<sup>3</sup>H]-ATC durante 60 min a 25°C con o sin ATC, BALU-1, BALU-2, BALU-3 y BALU-4 a una concentración de 50 μM. Los valores representan la media ± EEM de 3 grupos de 10 oocitos obtenidos de 3 ranas diferentes. \*, p<0,05, comparado con los oocitos incubados sin inhibidor mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

La NTCP es la principal ruta de captación de ABs por el hígado. Los cuatro compuestos mostraron marcadas diferencias en su capacidad para inhibir la captación de [<sup>3</sup>H]-ATC mediada tanto por la proteína NTCP humana, como por la Ntcp de rata (figura 3) a las concentraciones utilizadas. El compuesto BALU-2 resultó ser el más potente como inhibidor, seguido por BALU-3 y BALU-4. BALU-1 no mostró ningún efecto sobre la captación del AB mediada por la NTCP humana o de rata.

Parece, por tanto, que el efecto de estos compuestos sobre NTCP/Ntcp es marcadamente dependiente de su estructura. Varias de sus características moleculares podrían estar implicadas en las diferencias de comportamiento observadas. Así, por ejemplo, la presencia de una cadena lateral cargada negativamente en la molécula de un AB parece ser importante para la interacción con los transportadores sodio-dependientes (Baringhaus *et al.*, 1999). Además, incluso en

las moléculas en las que la cadena lateral se conjuga, la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 permite una captación eficaz de las mismas por las células hepáticas, a través de la proteína OATP1B1 (Briz *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Captación neta de [<sup>3</sup>H]-ATC por oocitos inyectados con 9 ng de ARNm de NTCP (A) o Ntcp (B). Los oocitos fueron incubados en presencia de 10 µM de [<sup>3</sup>H]-ATC durante 60 min a 25°C con o sin ATC, BALU-1, BALU-2, BALU-3 y BALU-4 a una concentración de 50 µM. Los valores representan la media ± EEM de 3 grupos de 10 oocitos obtenidos de 3 ranas diferentes. \*, p<0,05, comparado con los oocitos incubados sin inhibidor mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El análisis de las características físico-químicas de los cuatro compuestos evidencia varios factores adicionales que probablemente pueden influir en el transporte mediado por NTCP/Ntcp. El balance hidrofóbico/hidrofílico de los ABs naturales ha sido modificado en BALU-1 para el que la hidrofiliidad ha aumentado al incorporar en su estructura dos grupos carboxilato cargados negativamente, mientras que, por el contrario, la presencia de un grupo adamantilo en BALU-2 incrementa enormemente su área hidrofóbica. De hecho, el compuesto BALU-2 posee una concentración micelar crítica inferior a la del AC (Soto Tellini *et al.*, 2006). Esto explicaría la potente inhibición

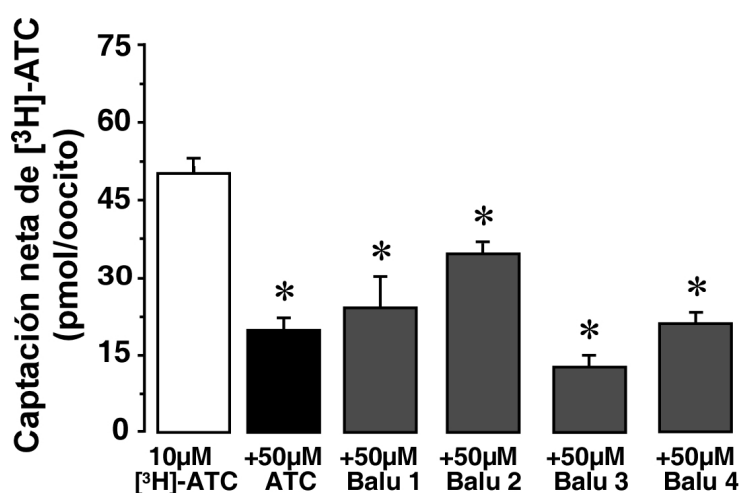
de BALU-2 sobre el transporte de ATC por las proteínas NTCP humana o de rata, a diferencia de BALU-1 que no tuvo ningún efecto.

El comportamiento de BALU-3 y BALU-4 podría estar relacionado, sin embargo, con el incremento de la superficie total de estos dímeros, ya que sus valores de concentración micelar crítica son menores que los de los ABs naturales (Alvarez Alcalde *et al.*, 2008). Además, cada una de las dos unidades esteroideas de estos compuestos, de ADC en BALU-3 y AC en BALU-4, podría interactuar con el transportador afectando al transporte de ATC por el mismo, de igual modo que lo haría el AB natural. De hecho, el efecto de ambos compuestos sobre la captación de [<sup>3</sup>H]-ATC por NTCP/Ntcp es similar a la autoinhibición por ATC.

Las proteínas Ntcp y Asbt pertenecen a la misma familia de transportadores conocida como SLC10A. Comparten una homología en su estructura primaria del 35%, una similitud en la secuencia de aminoácidos del 63%, y se han descrito el mismo número de dominios trans-membrana para ambas proteínas (Dawson *et al.*, 1995). Se sabe que transportan sustratos similares y es lógico pensar que también los inhibidores les afecten de igual modo. Por ello, quisimos comparar la sensibilidad de las proteínas NTCP/Ntcp a los BALUs con la de este otro transportador sodio dependiente, ASBT, principal responsable de la captación ileal de ABs.

Como puede verse en la figura 4 todos los compuestos, incluyendo el BALU-1, inhibieron la captación de [<sup>3</sup>H]-ATC mediada por Asbt. Dicha captación se vio reducida en más de un 60% respecto al grupo control cuando el medio de incubación contenía 50  $\mu$ M de ATC no radiactivo, en un 53% en presencia de BALU-1, en un 35% por BALU-2, en un 75% por BALU-3 y en un 59% cuando se trataba de BALU-4.

Por tanto, todos los BALUs inhiben de forma significativa el transporte de ATC por la proteína Asbt, siendo el BALU-3 el inhibidor más potente del transporte en este modelo "in vitro".



**Figura 4.** Captación neta de [<sup>3</sup>H]-ATC por oocitos inyectados con 9 ng de ARNm de Asbt. Los oocitos fueron incubados en presencia de 10 µM de [<sup>3</sup>H]-ATC durante 60 min a 25°C con o sin ATC, BALU-1, BALU-2, BALU-3 y BALU-4 a una concentración de 50 µM. Los valores representan la media ± EEM de 3 grupos de 10 oocitos obtenidos de 3 ranas diferentes. \*, p<0,05, comparado con los oocitos incubados sin inhibidor mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El hecho de que los compuestos BALUs inhiban el transporte de ATC mediado por las proteínas NTCP/Ntcp, OATP1B3 y OATP1B1 con una eficacia tan diferente presenta un enorme interés, ya que muchos tóxicos que afectan específicamente a los hepatocitos como la faloidina deben entrar en estas células utilizando la proteína OATP1B1 (Meier-Abt *et al.*, 2004). Se ha propuesto que los compuestos capaces de inhibir esta captación podrían ser utilizados como antídotos en casos de intoxicaciones agudas (Meier-Abt *et al.*, 2004).

Algunos trabajos han apuntado que las proteínas humanas OATP1B1, OATP1B3 y de rata Oatp1b2 transportan faloidina desde la sangre sinusoidal al interior de los hepatocitos con valores de Km en torno a 40 µM (Fehrenbach *et al.*, 2003; Meier-Abt *et al.*, 2004). En este estudio, usando una concentración de los derivados de ABs BALUs ligeramente superior a este valor (50 µM) hemos observado una fuerte inhibición del transporte de ATC por la proteína OATP1B1, lo que sugiere que también podrían inhibir la captación de faloidina por los hepatocitos. Además, puesto que todos ellos resultaron ser débiles inhibidores del transporte mediado por OATP1B3, la ruta de captación hepática de aniones orgánicos desde la sangre sinusoidal no se vería afectada por el tratamiento con estos compuestos.

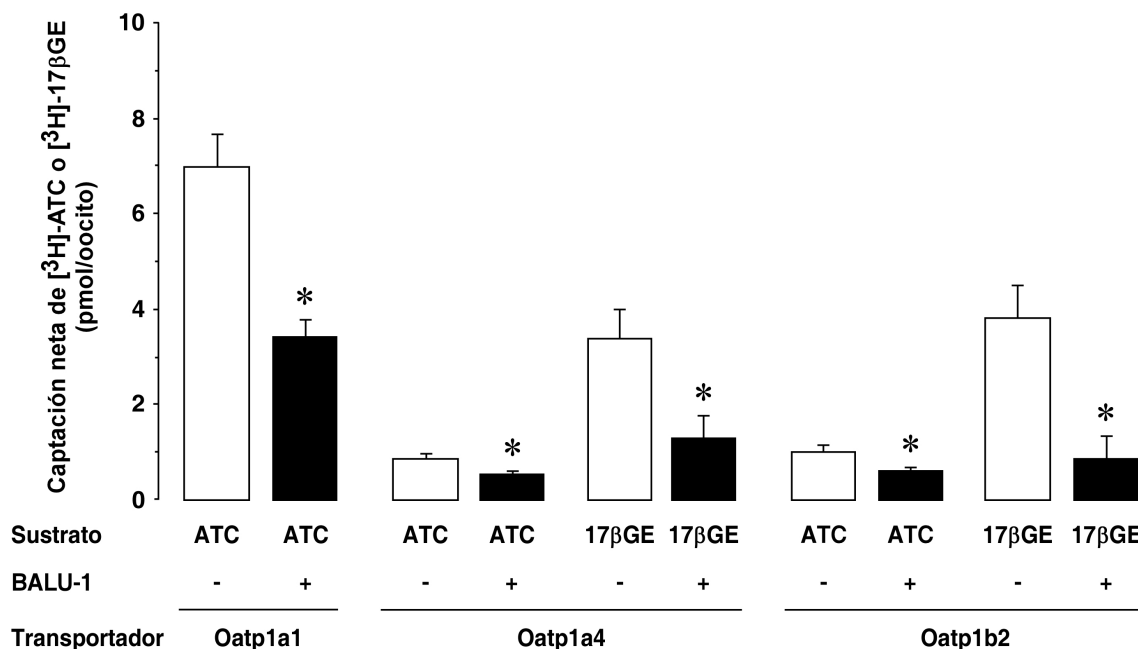
De todos los BALUs, el BALU-1 parece un buen candidato para poder ser utilizado en esta estrategia farmacológica, ya que permitiría la captación de ABs endógenos a través de NTCP/Ntcp y OATP1B3, a la vez que reduciría la entrada de tóxicos que requieran el funcionamiento de OATP1B1.

Sin embargo, para que esta estrategia pueda ser utilizada en el desarrollo de un tratamiento frente a la intoxicación por *A. phalloides* hay que tener en cuenta que otros transportadores hepáticos sodio independientes (OATP1B3), y sodio dependientes (NTCP), están implicados en la captación de otras toxinas presentes en la seta, como por ejemplo la amanitina (Gundala *et al.*, 2004). Por tanto, la prevención completa de los efectos nocivos causados por *A. phalloides* debería incluir una intervención adicional para neutralizar estas toxinas.

Por todo ello, de entre los compuestos estudiados inicialmente, decidimos restringir el diseño experimental a desarrollar a continuación al BALU-1, ya que presentaba el patrón de inhibición de los transportadores hepáticos más interesante.

Decidimos completar el estudio de la capacidad del BALU-1 de inhibir el transporte de ABs, investigando su capacidad para inhibir diferentes Oatps de rata.

Injectamos oocitos con el ARNm de Oatp1a1, Oatp1a4 o Oatp1b2, y, como en experimentos anteriores, 48 h después de la inyección con cada una de las proteínas en estudio, los oocitos se distribuyeron en 6 grupos que fueron incubados durante 60 min con una solución que contenía 10  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-ATC, como sustrato típico de Oatp1a1, o [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ GE (ambos usados como sustratos para Oatp1a4 y Oatp1b2), o con esta misma solución suplementada con 50  $\mu\text{M}$  de ATC, 17 $\beta$ GE o BALU-1. La radiactividad de los oocitos no inyectados osciló entre el 1% y el 7%.



**Figura 5.** Captación neta de [ $^3\text{H}$ ]-ATC por oocitos inyectados con 9 ng de ARNm de Oatp1a1, Oatp1a4 o Oatp1b2. Los oocitos fueron incubados en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-ATC o [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ GE durante 60 min a 25°C. La inhibición por BALU-1 se determinó incluyendo este compuesto en el medio de incubación a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Los valores representan la media  $\pm$  EEM de 3 grupos de 10 oocitos obtenidos de 3 ranas diferentes. \*,  $p < 0,05$ , comparando con los oocitos incubados sin inhibidor mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como puede observarse en la figura 5, el compuesto BALU-1 produjo una inhibición significativa de la captación de [ $^3\text{H}$ ]-ATC o [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ GE por las proteínas estudiadas, aunque la inhibición era menos marcada que la ejercida sobre la OATP1B1 humana.

Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que, dada la participación de estos tres transportadores en la captación de faloidina por el hígado de rata, se podría esperar que el derivado BALU-1 inhiba este proceso en esta especie.

#### **4.1.2.2. Estudios cinéticos de la inhibición por BALU-1 del transporte de ATC mediado por OATP1B1**

Dado su posible interés como antídoto frente a tóxicos que sean captados por este transportador, y una vez comprobada la capacidad del BALU-1 para inhibir la captación de ATC por la proteína OATP1B1, se decidió caracterizar el tipo de inhibición que llevaba a cabo, utilizando el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*.

Para ello, en un primer lugar se realizó un estudio de la evolución temporal de la captación de ATC con objeto de llevar a cabo los posteriores análisis cinéticos en condiciones de velocidad inicial. Se observó que el proceso era lineal hasta 15 min de exposición al sustrato, por lo que elegimos 10 min de incubación (figura 6A).

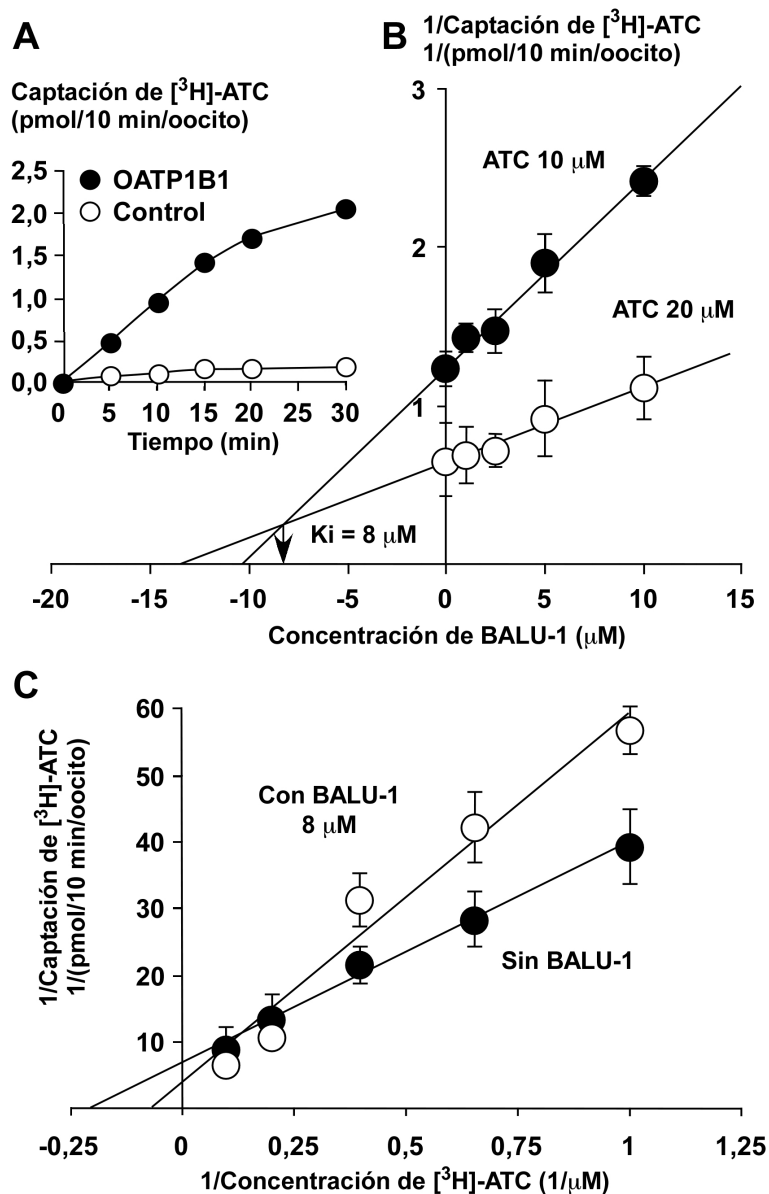
Posteriormente, realizamos estudios de cinética para conocer la  $K_i$  (concentración de inhibidor necesaria para disminuir la  $K_m$  un 50%) del compuesto BALU-1 sobre el transporte de ATC, y establecer así la potencia inhibidora del mismo. Para ello, se determinó la captación de ATC ( $v$ ) a concentraciones fijas de sustrato de 10 y 20  $\mu\text{M}$  en oocitos que expresaban OATP1B1 incubados en presencia de un rango de concentraciones de BALU-1 entre 0 y 10  $\mu\text{M}$ . Los datos se analizaron utilizando el método cinético de Dixon representando los valores de  $1/v$  frente a la concentración de BALU-1 (figura 6B).

El valor de  $K_i$  indica la afinidad de la proteína transportadora por el inhibidor. Puesto que cuanto menor sea el valor de la  $K_i$ , mayor es la eficacia del inhibidor, podemos decir que el compuesto BALU-1, para el que se observó una  $K_i=8 \mu\text{M}$ , es un potente inhibidor de la captación de ABs por la proteína OATP1B1, lo que le hace más interesante a nivel farmacológico. Estos resultados apoyan los descritos en la figura 2A, donde se observa una fuerte inhibición del transporte de ATC mediado por OATP1B1.

Por último, y para concluir con la caracterización del tipo de inhibición que ejerce el BALU-1, se realizaron experimentos para conocer la  $K_m$ . Los oocitos inyectados con el ARNm de OATP1B1, eran incubados con concentraciones crecientes de [ $^3\text{H}$ ]-ATC solo o en presencia de 8  $\mu\text{M}$  de BALU-1. Los valores de captación de [ $^3\text{H}$ ]-ATC fueron usados para generar un diagrama de dobles recíprocos (figura 6C). El análisis de los

resultados obtenidos nos indicó que el mecanismo más probable de inhibición era el de tipo competitivo, puesto que la  $K_m$  del transporte, calculada a partir del punto de corte de la gráfica con el eje de abscisas, se modificó en presencia del BALU-1 ( $K_m=5,3 \mu\text{M}$ ,  $K_m'=20,1 \mu\text{M}$ ).

Este resultado, junto con el hecho de que BALU-1 fue el único de los cuatro compuestos ensayados que no tuvo ningún efecto sobre el transporte mediado por NTCP, y las consideraciones respecto a las relaciones estructura-actividad que ya han sido comentadas, hacen de BALU-1 un buen candidato para ser empleado en terapias basadas en la inhibición de OATP1B1.



**Figura 6.** (A) Evolución temporal de la captación durante 30 min de  $[^3\text{H}]\text{-ATC}$  por oocitos inyectados o no inyectados con 9 ng de ARNm de OATP1B1. (B) Efecto de la concentración de BALU-1 sobre la captación neta de ATC por OATP1B1. (C) Representación de dobles recíprocos de la captación neta de ATC por OATP1B1 por oocitos incubados con varias concentraciones de ATC a 25 °C durante 10 min, en presencia ( $y=55,9x + 2,9$ ;  $R^2=0,974$ ;  $p<0,001$ ) o ausencia ( $y=33,3x + 6,4$ ;  $R^2=0,996$ ;  $p<0,001$ ) de BALU-1.

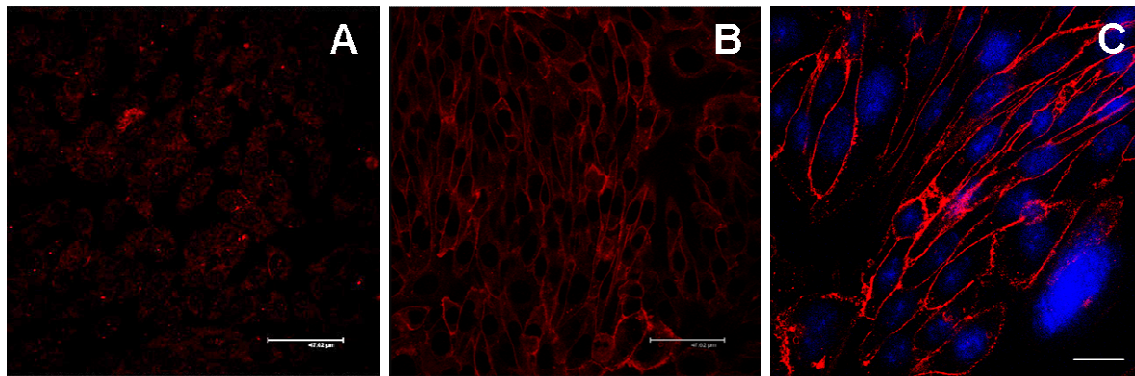


### 4.1.3. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS ESTABLEMENTE TRANSFECTADAS CON OATP1B1

#### 4.1.3.1. Efecto de BALU-1 sobre la captación de faloidina por células que expresan OATP1B1

El siguiente paso fue investigar la capacidad de BALU-1 para inhibir la captación de faloidina por OATP1B1 utilizando células CHO establemente transfectadas con esta proteína.

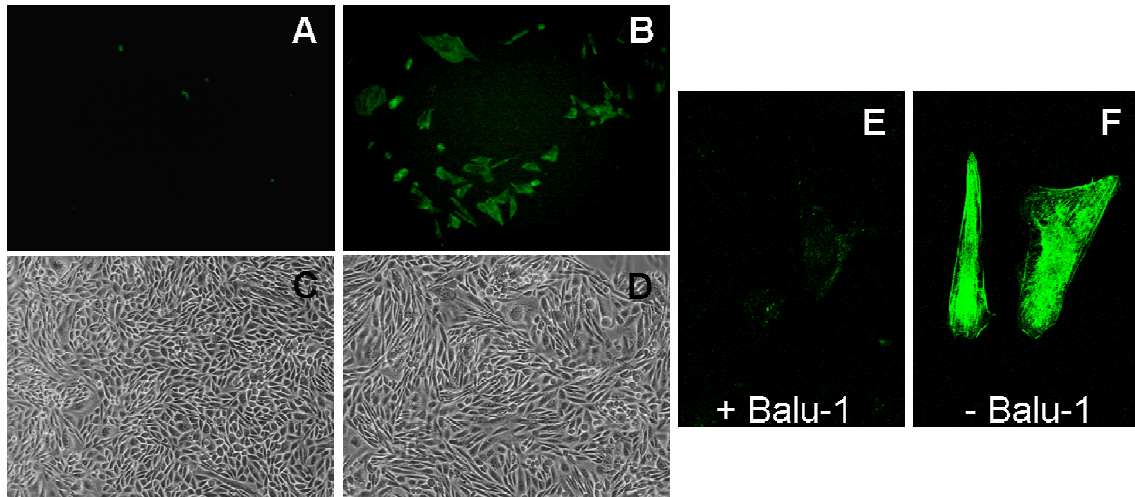
En primer lugar, confirmamos la presencia del transportador en la membrana de las células transfectadas mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico frente a la OATP1B1. En la figura 7B, y más claramente en la magnificación 7C se observa que la proteína se localiza en la membrana, mientras que las células silvestres (CHO-K1) no muestran inmunorreactividad (figura 7A).



**Figura 7.** Localización por inmunofluorescencia del transportador OATP1B1 en células CHO silvestres (A) y establemente transfectadas (B, C). En rojo se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color azul (C), se tiñeron con Dapi.

Usando un derivado de faloidina marcado con FITC que nos permitiera visualizar su captación celular mediante microscopía de fluorescencia, fue posible observar cómo ésta era eficazmente captada por las células que expresaban OATP1B1 (figura 8B), pero no por las células silvestres CHO-K1 (figura 8A). Las figuras 8C y 8D son imágenes de microscopía óptica correspondientes a las figuras 8A y 8B, respectivamente. Además, pudimos demostrar que la captación de faloidina por las células establemente transfectadas (figura 8F) disminuía significativamente en presencia de BALU-1 (figura 8E).



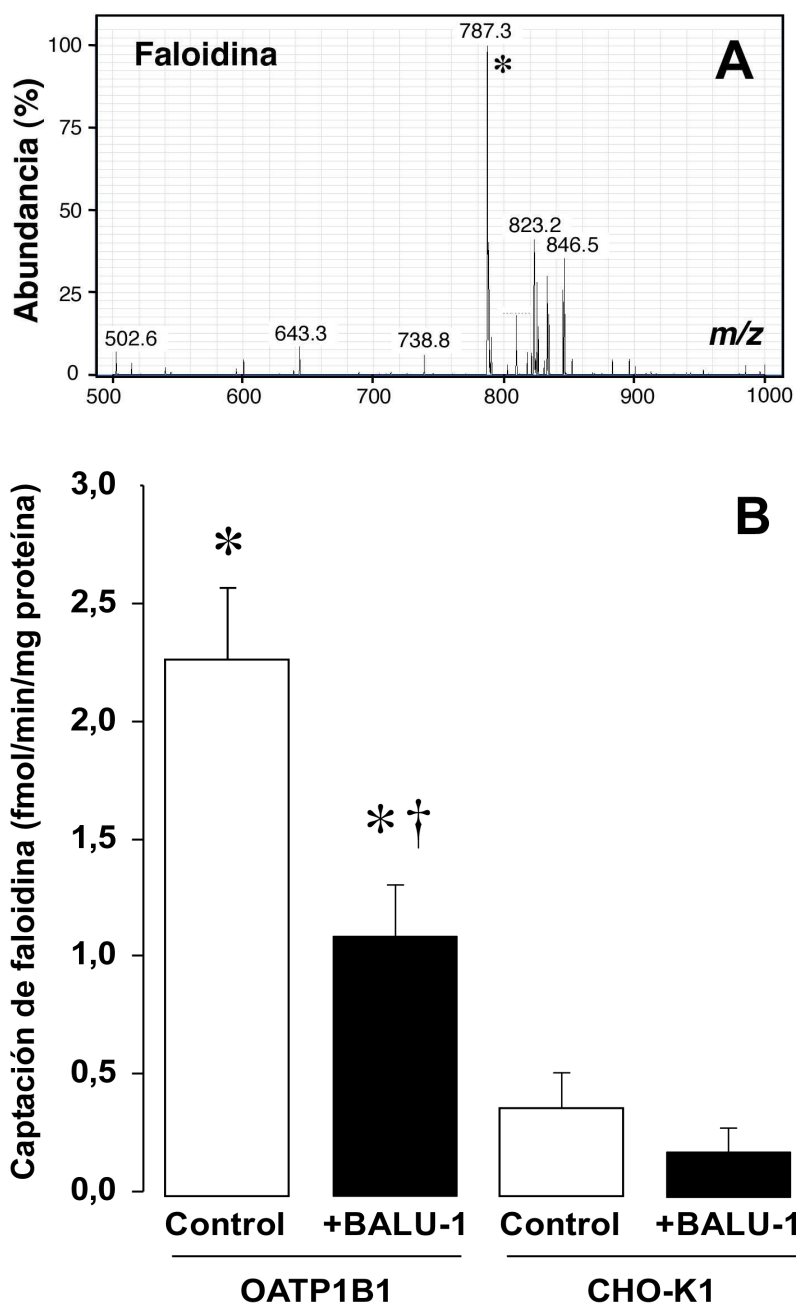


**Figura 8.** Imágenes representativas que ilustran la capacidad de las células CHO que expresan OATP1B1 para captar faloidina-FITC. Células CHO silvestres (A,C) y establemente transfectadas con OATP1B1 (B,D) fueron incubadas con 1  $\mu\text{M}$  de faloidina marcada con FITC durante 5 min a 37°C . (C,D) Imágenes de microscopía en contraste de fases de los cultivos celulares mostrados en A y B, respectivamente. (E,F) Magnificación de células CHO que expresan OATP1B1 incubadas con 1  $\mu\text{M}$  de faloidina-FITC durante 5 min a 37°C en presencia (E) o ausencia (F) de 50  $\mu\text{M}$  de BALU-1.

Para determinar la cantidad de faloidina captada por las células CHO que expresaban la proteína OATP1B1 se realizaron experimentos de transporte en los que las células silvestres y transfectadas eran incubadas en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de faloidina no marcada, sola o en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de BALU-1, durante 30 min. Tras poner a punto un método para la detección de faloidina por HPLC-MS/MS, fue posible determinar el contenido intracelular de faloidina en las células CHO, que se detectó siguiendo la transición específica de 787,3  $m/z$  a 743,2  $m/z$  (figura 9A).

Como puede observarse en la figura 9B, la captación de faloidina por las células establemente transfectadas con OATP1B1 era mucho mayor que en las células silvestres. Además, el compuesto BALU-1 inhibía significativamente esta captación, a diferencia de lo que ocurría en las células CHO-K1, en las que el pequeño contenido en faloidina detectado no era modificado por la presencia de BALU-1 en el medio de incubación.

Sin embargo, el efecto inhibitorio del BALU-1 sobre la captación de faloidina fue menor que para el transporte de ATC. Este hecho junto con el efecto diferente observado para ATC y 17 $\beta$ GE en cuanto a su transporte por la isoforma de rata Oatp1b2 nos permite deducir que la inhibición es dependiente del sustrato transportado. Además, podrían existir interacciones entre BALU-1 y los diferentes sustratos de OATP1B1 a nivel del transportador, como ha sido ya sugerido para algunos miembros de la familia OATP (Gui *et al.*, 2008).



**Figura 9.** (A) Espectro de masas representativo correspondiente a la faloidina, obtenido por HPLC-MS/MS en el modo de trabajo MS2Scan. El asterisco muestra el ion precursor (787,3  $m/z$ ), filtrado en modo MRM para obtener el ion producto (743,2  $m/z$ ), usado para el análisis cuantitativo. (B) Efecto del compuesto BALU-1 sobre la captación de faloidina mediada por OATP1B1 en células CHO establemente transfectadas con la proteína. Las células fueron incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de faloidina en presencia o ausencia de 100  $\mu\text{M}$  de BALU-1 a 37°C durante 30 min. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de tres cultivos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con las células silvestres CHO-K1 mediante el test  $t$  de Student; †,  $p < 0,05$  comparando con el mismo tipo celular en presencia de BALU-1 mediante el test de valores apareados.

#### 4.1.4. EXPERIMENTOS *IN VIVO* EN RATAS

##### 4.1.4.1. Efecto de BALU-1 sobre el flujo biliar y la secreción de ácidos biliares y faloidina

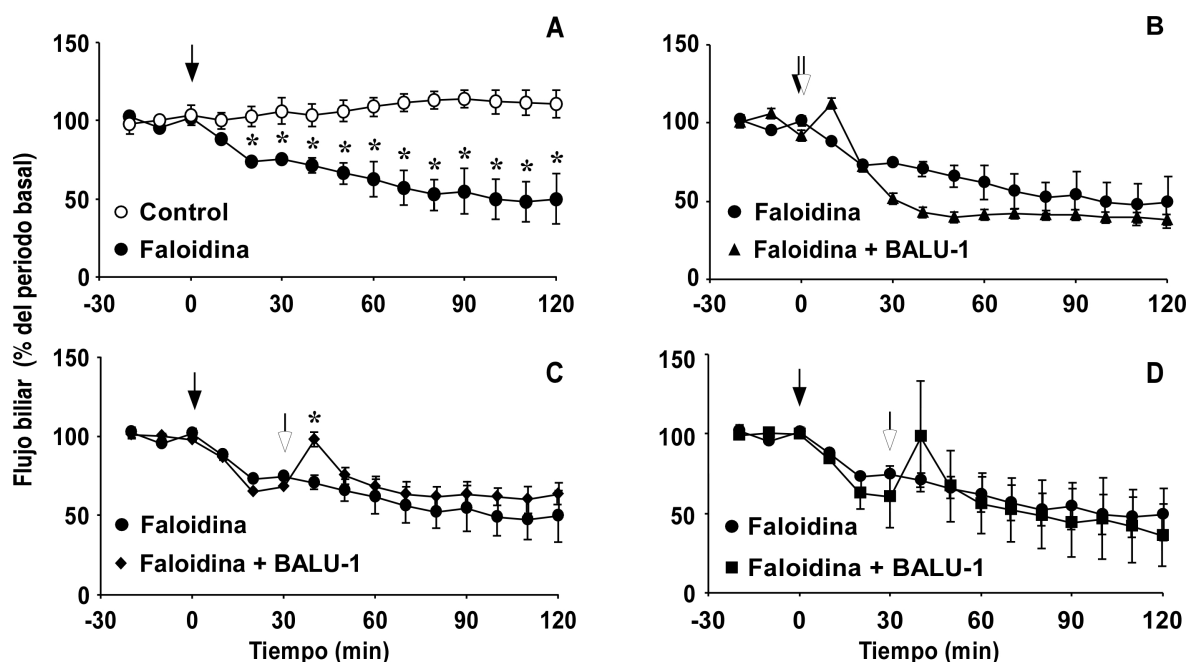
Como hemos visto, el compuesto BALU-1 es capaz de inhibir marcadamente el transporte de faloidina mediado por la proteína OATP1B1. Por ello, nos planteamos investigar su capacidad para inhibir o reducir la captación de la toxina por los hepatocitos y prevenir así el daño hepático que provoca.

Para ello, se realizaron experimentos “in vivo” utilizando ratas macho a las que se administró faloidina siguiendo cuatro diseños experimentales distintos que se detallan en el apartado 3.5.1 de Material y Métodos.

La figura 10 muestra el perfil de evolución del flujo biliar tras la administración de faloidina sola o con una dosis del compuesto BALU-1. Como cabía esperar, la administración intravenosa de faloidina a la dosis de 50 µg/100 g p.c. (diseño 1) produjo en las ratas una rápida y progresiva disminución del flujo de bilis, mientras que en el grupo control el flujo se mantiene constante a lo largo del periodo experimental (figura 10A).

Cuando los animales recibieron, junto con la faloidina, un bolo de BALU-1 a la dosis de 1,8 µmol/100 g p.c. (diseño 2) no observamos diferencias en los niveles de flujo biliar con respecto a los animales que sólo eran tratados con la toxina (figura 10B). Aunque tras la administración del BALU-1 se producía un rápido incremento en el flujo biliar, este efecto desaparecía rápidamente y el flujo de bilis caía de nuevo por debajo de los valores basales.

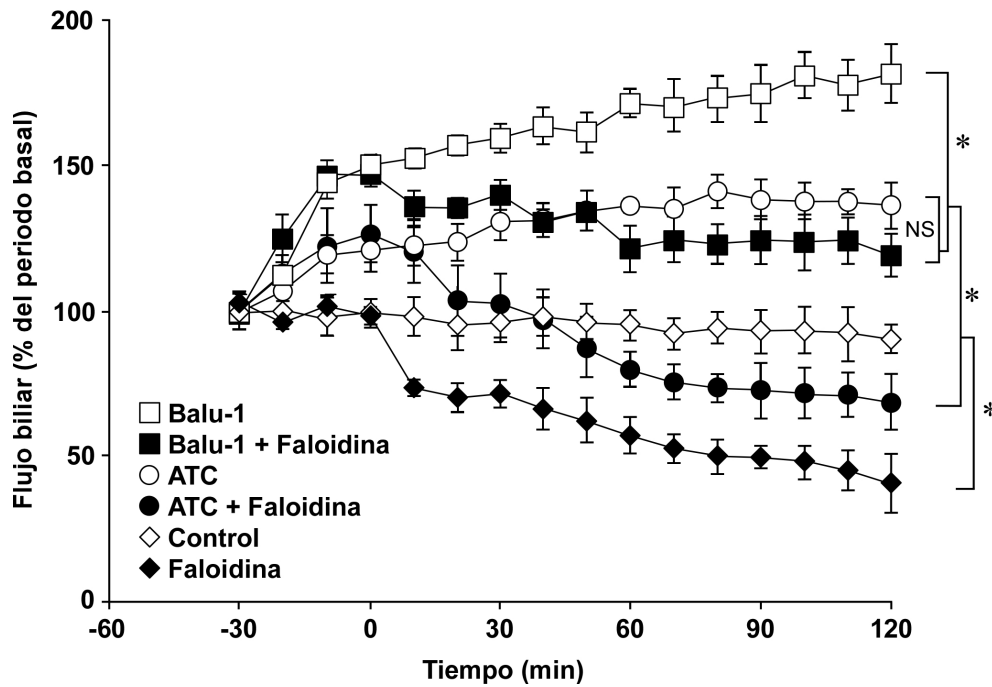
Se obtuvieron resultados similares cuando se administraba el BALU-1 a la dosis de 1,8 (figura 10C) o de 3,6 µmol/100 g p.c. (figura 10D) 30 min después de la inyección de faloidina (diseño 3).



**Figura 10.** Evolución temporal del flujo de bilis en ratas control (círculos blanco) y en ratas que recibieron una única dosis de faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) inyectada en la vena yugular tras 30 minutos de recogida de bilis basal, sola (círculos negros) (diseño 1) (A) o en combinación con una dosis de BALU-1 (1,8  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.) en el minuto 0 (triángulos negros) (diseño 2) (B) o en el minuto 30 (rombos negros) (diseño 3) (C). Un grupo diferente de animales recibió una dosis mayor de BALU-1 (3,6  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.) en el minuto 30 del periodo experimental (diseño 3) (D). Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$ , comparando con el grupo control mediante el test de  $t$  de Student.

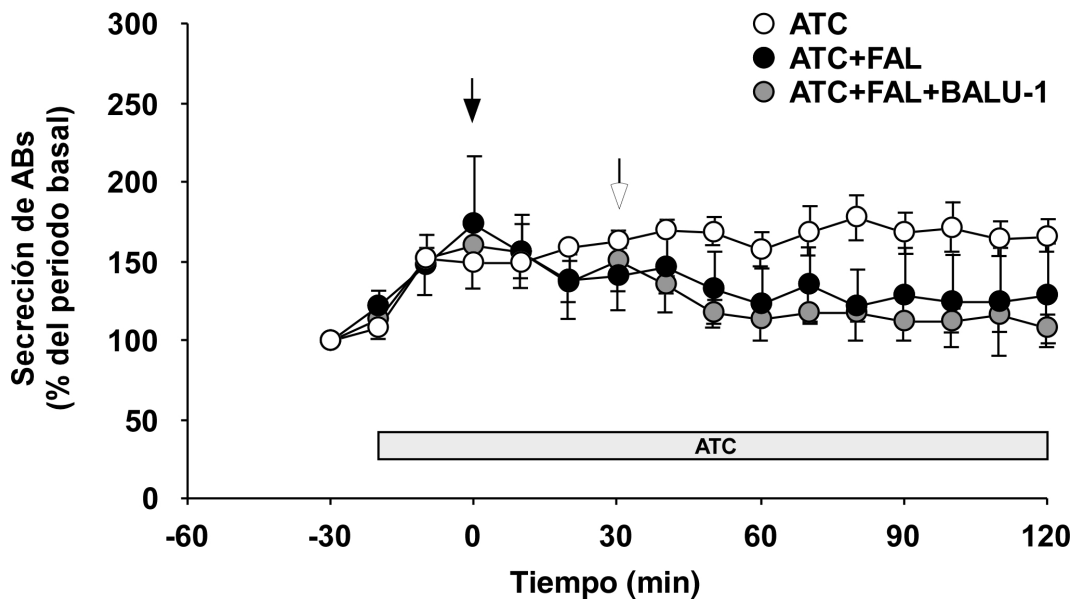
Para estimular el flujo de bilis, en otro grupo de animales administramos ATC (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) mediante una infusión endovenosa a una dosis continua durante 2,5 h. Como esperábamos, el flujo de bilis se estabilizó tras 30 min de infusión, manteniéndose en el mismo nivel durante todo el periodo experimental. La inyección de faloidina (50  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.) 30 min después de comenzar la infusión con el AB (diseño 4) indujo un significativo descenso en el flujo de bilis estimulado por el ATC, hasta alcanzar valores inferiores a los basales (figura 11).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, y que formaron parte de mi Trabajo de Grado (Herráez, 2006) mostraron que el derivado de AB, BALU-1, es marcadamente colerético, incluso más que el ATC, por lo que, en un grupo diferente de animales, administramos una infusión endovenosa continua de BALU-1 (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) como estimulador del flujo de bilis. Observamos un importante incremento del flujo biliar (+81%), mayor que el inducido por el ATC (+45%), confirmando así los resultados obtenidos en los trabajos previos. Cuando además inyectamos un bolo de faloidina (50  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.) 30 min después de comenzar la infusión, al igual que ocurría en el caso anterior, observamos una caída del flujo biliar, aunque en este caso no llegó a alcanzar los valores basales (figura 11), por lo que parecía que el compuesto BALU-1 tenía un efecto beneficioso sobre la colestasis inducida por la faloidina.



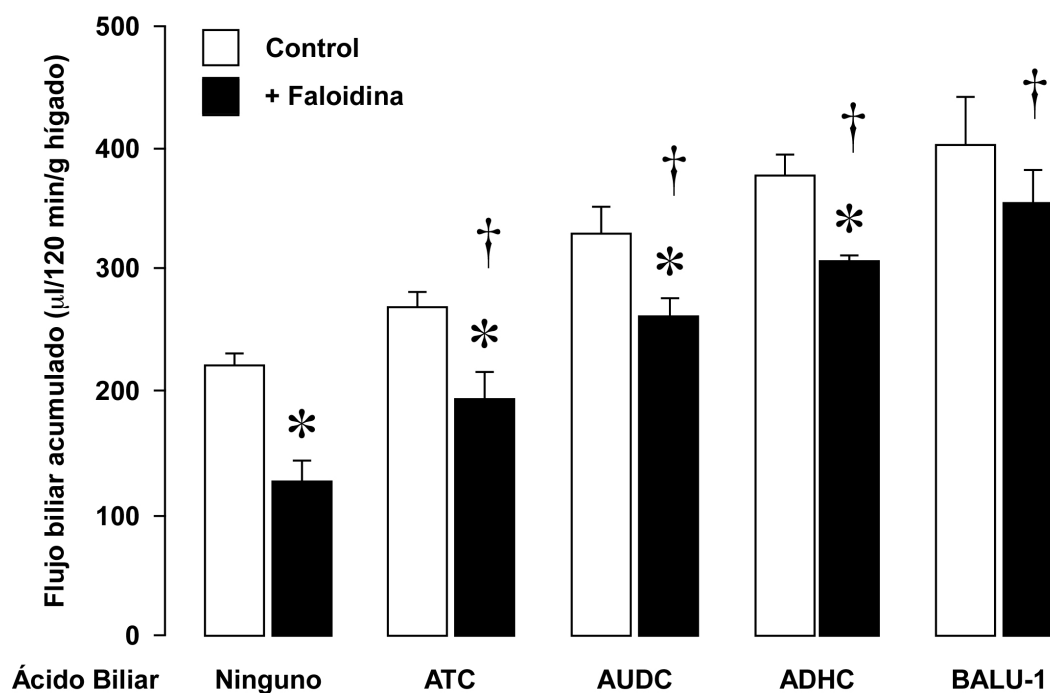
**Figura 11.** Evolución temporal del flujo de bilis en ratas control (rombos blancos), y en ratas que recibieron una única dosis de faloidina ( $50 \mu\text{g}/100 \text{ g p.c.}$ ) inyectada en la vena yugular tras 30 min de recogida de bilis basal, sola (rombos negros), o en combinación con una infusión endovenosa continua ( $0,2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$ ) de ATC (círculos blancos), o BALU-1 (cuadrados blancos) sin faloidina. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de medidas realizadas en  $\geq 5$  ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$ , NS, no significativo, comparando los grupos indicados por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Cuando analizamos la secreción de ABs en el grupo de ratas a las que habíamos administrado una infusión de ATC ( $0,2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$ ), observamos que, de manera muy similar a lo que ocurría en el flujo biliar, ésta se estabilizaba 30 min después de iniciar la infusión, y que tras el tratamiento con una única dosis de faloidina ( $50 \mu\text{g}/100 \text{ g p.c.}$ ) se producía un moderado descenso en dicha secreción, que no llegaba a alcanzar significación estadística. La administración de un bolo de BALU-1 ( $1,8 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$ ) junto con la faloidina no tuvo efecto sobre la secreción de ABs (figura 12).



**Figura 12:** Evolución temporal de la secreción de faloidina en ratas anestesiadas que recibieron una infusión intravenosa de ATC ( $0,2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$ ) a través de la vena yugular desde el minuto  $-30$  hasta el min  $120$  del periodo experimental (círculos blancos), o además un bolo de faloidina (FAL) ( $50 \mu\text{g}/100 \text{ g p.c.}$ ) sólo (círculos negros) o con BALU-1 ( $1,8 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$ ) (círculos grises) en el minuto cero. Los valores representan la media  $\pm$ EEM de medida realizadas en  $\geq 5$  ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando la secreción de ABs en los animales que recibieron la toxina con los que únicamente recibieron la infusión de ATC, por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para investigar si este efecto se debía a su capacidad para formar micelas (Coello *et al.*, 1996), capaces de incluir la toxina, y/o a su capacidad para estimular el flujo biliar, comparamos el efecto de este compuesto con el de un AB incapaz de formar micelas, el ácido dehidrocólico (ADHC), y con el ácido ursodesoxicólico (AUDC), un AB capaz de inducir hipercoleresis. Para ello, se administraron infusiones endovenosas continuas ( $0,2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$ ) de cada uno de los ABs en grupos diferentes de animales. Ambos estimularon el flujo de bilis, aún más que el ATC, pero en menor medida que el BALU-1 (BALU-1 > ADHC > AUDC > ATC) (figura 13). La administración de faloidina redujo una vez más el flujo biliar, que se mantuvo en valores próximos a los basales, siempre por debajo de los observados en las ratas que habían sido tratadas con una infusión de BALU-1.



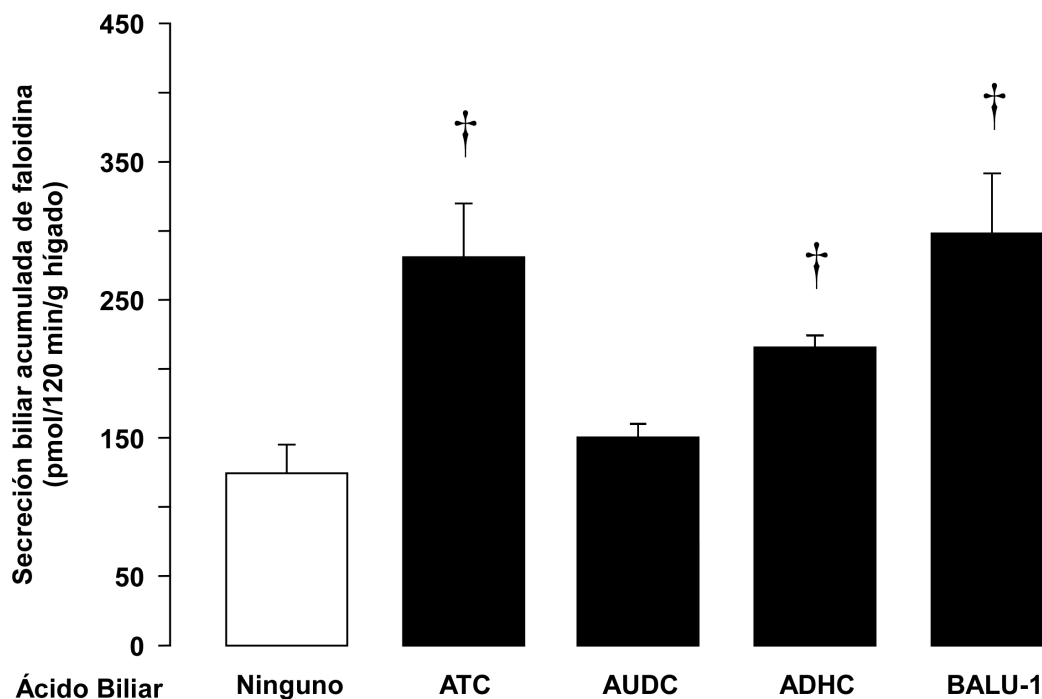
**Figura 13.** Flujo biliar acumulado durante 2 h (desde el minuto 0 al 120) en ratas que recibieron (barras negras) o no (barras blancas) una única dosis de faloidina (50 µg/100 g p.c.) a través de la vena yugular en el minuto 0 del periodo experimental, sola o en combinación con una infusión endovenosa (0,2 µmol/min/100 g p.c.), desde el minuto -30 hasta el minuto 120) de ATC, AUDC, ADHC, o BALU-1. Los valores representan la media ± EEM de medidas realizadas en ≥5 ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$ , comparando las ratas que recibieron el mismo AB o derivado solo o en combinación con un bolo de faloidina. †,  $p < 0,05$ , comparando las ratas que recibieron faloidina en presencia o ausencia de un estimulador del flujo biliar por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

A la vista de estos resultados, podemos decir que, ni la capacidad de formar micelas, ni la hipercolecresis, explican completamente el efecto beneficioso del BALU-1 sobre la hepatotoxicidad inducida por la faloidina.

Por un lado, el ATC, un AB con gran capacidad detergente, no mostró una protección más eficaz que nuestro compuesto. El incremento en el flujo de bilis parece ser más importante que la capacidad de formar micelas, puesto que el ADHC, un AB con escasa capacidad para formar micelas (Gerolami *et al.*, 1972), y por tanto para estimular la secreción biliar de aniones orgánicos, tales como la bilirrubina (García-Marín *et al.*, 1986), ejerció una protección importante frente a la faloidina. Por el contrario, el AUDC, un AB muy colerético (Dumont *et al.*, 1980) y con un buen efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por la acumulación de otras especies de ABs durante la colestasis (Pérez *et al.*, 2005), mostró un efecto intermedio entre el ATC y el ADHC.

Utilizando la técnica de HPLC-MS/MS que se describe con detalle en el apartado 3.11.8 de Material y Métodos, analizamos la secreción biliar de faloidina en los diferentes grupos experimentales.

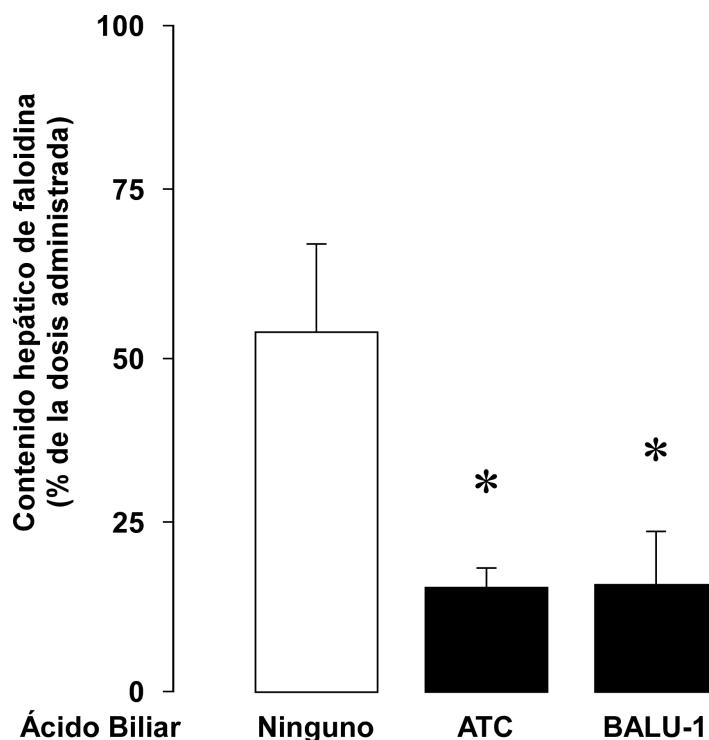
Cuando calculamos la secreción biliar acumulada de faloidina vimos que en los animales del grupo control, ésta era muy baja, de manera que 120 min después de la inyección de la toxina, sólo se secretaba aproximadamente el 0,7% de la dosis administrada. Sin embargo, cuando los animales recibían una infusión continua de BALU-1, la secreción aumentaba 2,5 veces, lo que representa todavía sólo el 1,7% de la dosis administrada. Cuando se comparó la capacidad de los diferentes ABs y derivados utilizados en los experimentos previos, para estimular la secreción biliar de faloidina, observamos que el más eficaz era el BALU-1 seguido del ATC, el ADHC y el AUDC (figura 14).



**Figura 14.** Secreción acumulada de faloidina durante 2 h (desde el minuto 0 al 120) en ratas que recibieron una única dosis de faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) inyectada en la vena yugular en el minuto 0 del periodo experimental, sola (barra blanca) o en combinación con una infusión endovenosa (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.), desde el minuto -30 hasta el minuto 120) de ATC, AUDC, ADHC, o BALU-1 (barras negras). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de medidas realizadas en  $\geq 5$  ratas por grupo. †,  $p < 0,05$ , comparado con las ratas que recibieron faloidina sola por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

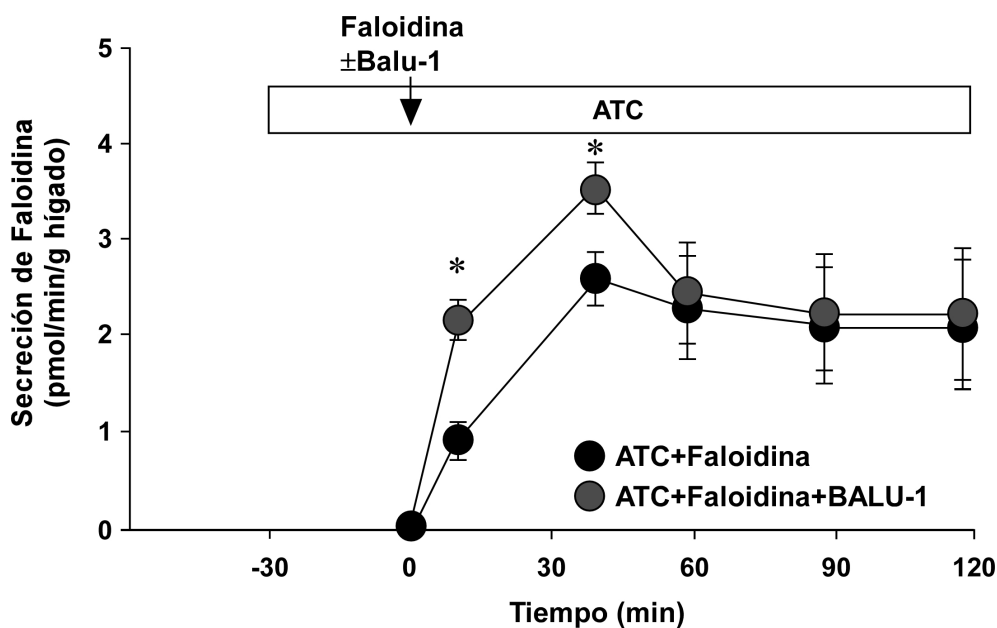
Al finalizar el periodo experimental, extrajimos el hígado de los animales que habían recibido, además del bolo de faloidina, la infusión de BALU-1 o ATC (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) para determinar su contenido en faloidina. La figura 15 muestra los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de la dosis administrada. A las 2h de la administración del bolo de faloidina, un 55% de la toxina se encontraba en el tejido hepático. Tanto el ATC como el BALU-1 redujeron en más de un 70% la acumulación de la toxina en el tejido hepático.





**Figura 15.** Evolución temporal de la secreción de faloidina en ratas anestesiadas que recibieron una infusión intravenosa de ATC (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) a través de la vena yugular desde el minuto -30 hasta el minuto 120 del periodo experimental, y un bolo de faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) solo (círculos negros) o con BALU-1 (1,8  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.) (círculos blancos) en el minuto 0. Los valores representan la media  $\pm$ EEM de medidas realizadas en  $\geq 5$  ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando la secreción biliar de faloidina en los animales que recibieron la toxina con o sin BALU-1 por el test de la  $t$  de Student.

Cuando medimos la secreción de faloidina en el grupo de animales que recibían una dosis continua de ATC, y un bolo de faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.), 30 min después de iniciar la infusión, sólo o en combinación con un bolo de BALU-1 (1,8  $\mu\text{mol}/100$  g p.c.), pudimos comprobar que, a diferencia de lo que ocurría con la secreción de ABs (figura 12), el compuesto BALU-1 incrementaba significativamente la secreción de faloidina a bilis (figura 16).

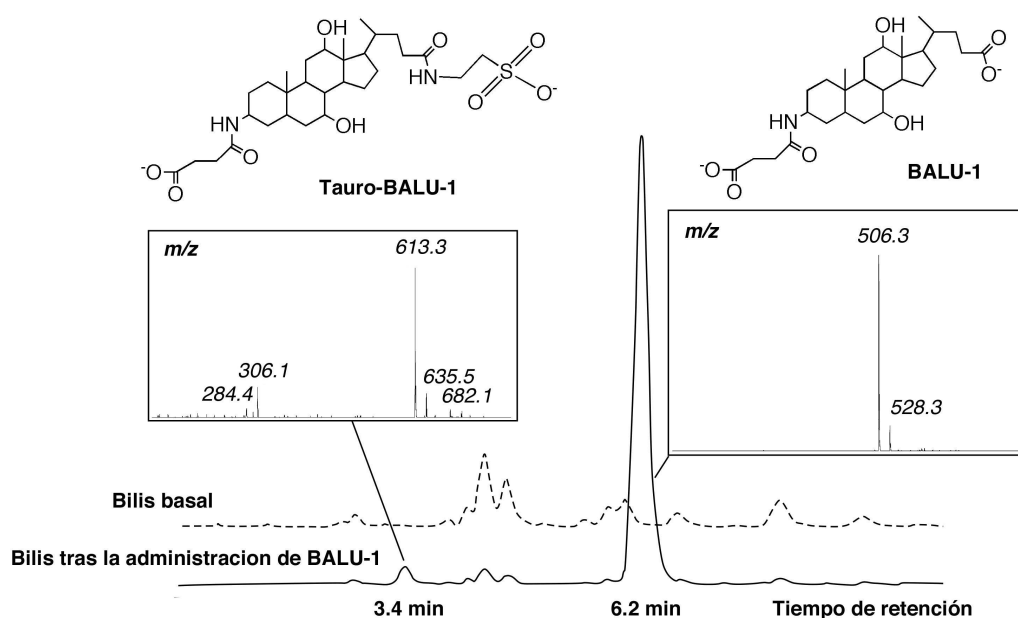


**Figura 16.** Contenido de faloidina al final del periodo experimental en el hígado de ratas que recibieron una única dosis de faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) inyectada en la vena yugular en el minuto 0, sola (barra blanca) o en combinación con una infusión (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) de ATC o BALU-1 (barras negras). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de medidas realizadas en  $\geq 5$  ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparado con las ratas que recibieron faloidina únicamente, por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Todos estos resultados sugieren que la diferencia en el comportamiento de los diferentes ABs y derivados está relacionada con su capacidad para estimular el flujo biliar. Sin embargo, otros mecanismos, como la inhibición de la captación basolateral de la toxina, deben jugar también un papel clave, al menos en el caso del BALU-1. Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* con oocitos de rana *Xenopus laevis*, apoyan esta hipótesis. Este efecto junto con el incremento de su secreción en bilis da lugar a una reducción en el contenido hepático de faloidina. En relación a esto, y teniendo en cuenta el uso potencial de este compuesto en la práctica clínica, habría que recordar que la situación en humanos es diferente a lo que ocurre en el modelo experimental en ratas, puesto que la eficacia de BALU-1 para inhibir los transportadores de rata (Oatp1a1, Oatp1b2 y Oatp1a4) es mucho menor que para la proteína humana OATP1B1.

En cuanto a la secreción biliar de faloidina, es importante remarcar que aunque BALU-1 es capaz de incrementarla 2,5 veces, no podemos concluir que este aumento sea cuantitativamente relevante en el efecto protector del compuesto. Además, parece que éste efecto no va asociado a la estimulación del flujo biliar, puesto que un AB hipercolerético como es el AUDC, apenas estimula la secreción de faloidina, y es sólo moderadamente inducida por el ADHC. En contraste, el ATC, con menor capacidad para estimular el flujo de bilis que éstos, muestra una capacidad similar que el BALU-1 para incrementar la secreción de la toxina.

Finalmente, decidimos investigar si el propio BALU-1 se secretaba a bilis y era metabolizado a su paso por el hígado. Para ello, pusimos a punto un método para la detección y cuantificación del BALU-1 por HPLC-MS/MS (apartado 3.11.8) así como la búsqueda de sus posibles metabolitos. Los resultados obtenidos indicaban que la mayoría del compuesto era secretado a bilis sin sufrir ningún tipo de biotransformación. Al comparar el TIC (Total Ion Chromatogram) de las muestras de bilis basal (figura 17, línea discontinua) y de las recogidas tras el tratamiento con BALU-1 (figura 17, línea continua), encontramos el pico correspondiente al derivado de AB a un tiempo de retención de 6,2 min, y además, un pequeño pico adicional a un tiempo de retención de 3,4 min que suponía aproximadamente el 5% del compuesto secretado. Los resultados obtenidos del análisis de los espectros de masas y el comportamiento cromatográfico eran compatibles con la formación de un derivado tauroconjugado del BALU-1 (figura 17).



**Figura 17.** TIC representativo obtenido en el modo de trabajo MS2-scan, al inyectar en el sistema HPLC muestras de bilis basal (línea punteada) y bilis recogida durante una infusión endovenosa continua de BALU-1 (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c.) (línea continua). Espectro de masas y estructura molecular propuesta de los picos indicados. Los espectros de masas muestran el ion molecular del BALU-1  $[\text{M}-\text{H}]^- = 506,3$   $m/z$  (tiempo de retención = 6,2 min), y los iones  $[\text{M}-\text{H}]^- = 613,3$   $m/z$  y  $[\text{M}-\text{H}]^{2-} = 306,1$   $m/z$ , del metabolito propuesto tauro-BALU-1 (tiempo de retención = 3,4 min).

La pequeña cantidad de tauro-BALU-1 secretada, junto con la incapacidad del compuesto y la toxina para estimular la secreción de ABs, indica que tanto la ruta de captación sinusoidal de ABs endógenos (principalmente por NTCP), como la de secreción canalicular (principalmente por BSEP) no son específicamente afectadas por la toxina, BALU-1 o su metabolito.

#### 4.1.4.2. Efectos del BALU-1 sobre la hepatotoxicidad inducida por faloidina.

Las muestras de sangre obtenidas al final de los periodos experimentales de los animales tratados con faloidina sola (50 µg/100 g p.c.), o en combinación con una infusión continua de BALU-1 (0,2 µmol/min/100 g p.c.), se utilizaron para la determinación de diferentes parámetros séricos que se utilizan en clínica como marcadores de funcionalidad hepática.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. El análisis de éstos demuestra que la faloidina produjo un incremento muy importante de los niveles séricos de los diferentes marcadores de hepatotoxicidad medidos (fosfatasa alcalina, transaminasas, γ-GT, bilirrubina total). Vemos, asimismo, que el tratamiento con el compuesto BALU-1 palió ligeramente el aumento de estos marcadores.

La observación macroscópica del hígado y el riñón de estos animales reveló claros signos de necrosis en el grupo de tratamiento con faloidina, que no aparecían en los que además recibían la infusión de BALU-1 (datos no mostrados). Además, observamos hematuria en ambos grupos de animales.

**Tabla 1.** Efecto de la faloidina sobre marcadores séricos de funcionalidad hepática

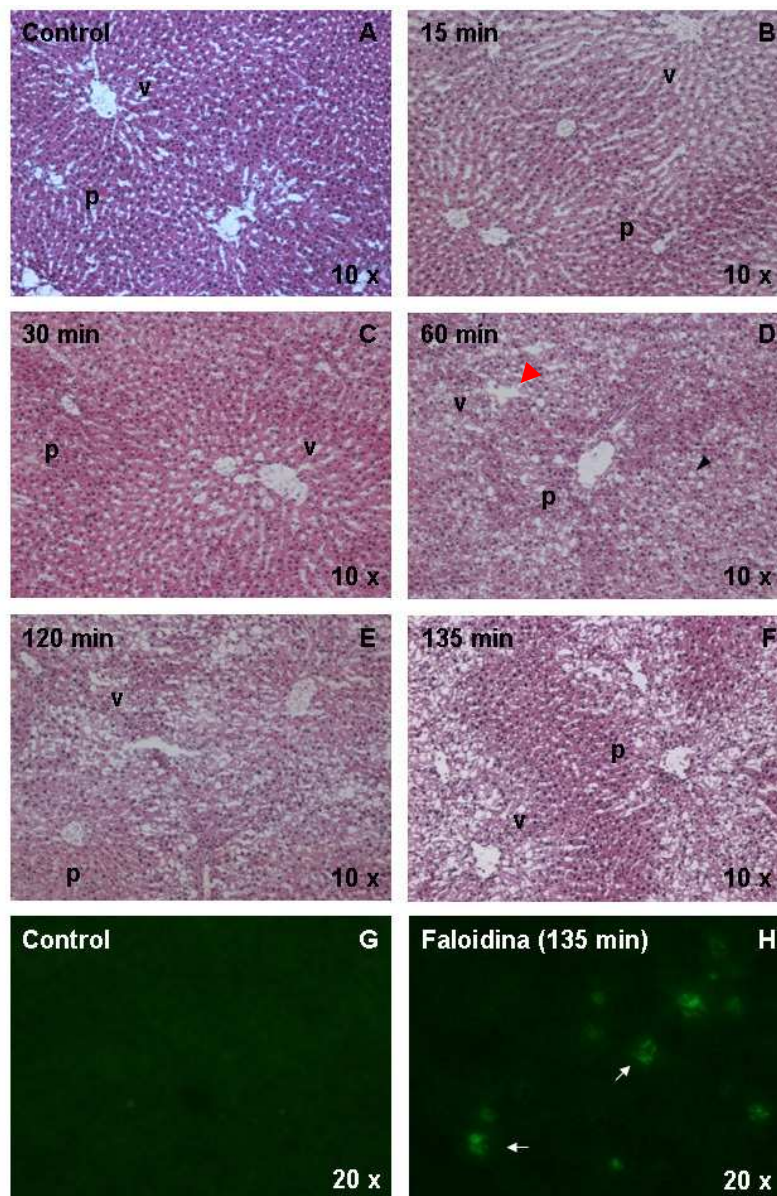
| Parámetros bioquímicos    | Control (n=8) | Faloidina (n=6)        | Faloidina+BALU-1(n=5)  |
|---------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| GOT (U/l)                 | 74±17         | 170±18 <sup>a</sup>    | 130±24 <sup>b</sup>    |
| GPT (U/l)                 | 56±4          | 90±11 <sup>a</sup>     | 68±9 <sup>b</sup>      |
| GGT (U/l)                 | <5            | 20±2                   | <5                     |
| Fosfatasa alcalina (U/l)  | 174±4         | 330±110 <sup>a</sup>   | 226±53 <sup>b</sup>    |
| Bilirrubina total (mg/dl) | <0,1          | 0,66±0,14 <sup>a</sup> | 0,23±0,13 <sup>b</sup> |

Parámetros bioquímicos determinados en muestras suero recogidas 120 min después de la administración i.v. de faloidina (50 µg/100 g p.c.) sola o en combinación con una infusión continua de BALU-1 (0,2 µmol/min/100 g p.c., desde el minuto -30 hasta el minuto 120), o en animales control. Los valores representan la media ± E.E.M. de ≥5 ratas por grupo. <sup>a</sup> p<0,05 comparando las ratas tratadas con faloidina con los animales control. <sup>b</sup> p<0,05, comparando las ratas tratadas con faloidina con los animales que recibieron la infusión de BALU-1, mediante el test *t* de Student. GOT, transaminasa glutámico oxalacética ; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; GGT, γ-glutamyl transferasa.

Los resultados de estos análisis son consistentes con la disminución del contenido hepático de faloidina en los animales tratados con BALU-1 (figura 15), y apoyan por tanto la hipótesis de la capacidad del compuesto para prevenir el daño hepático producido por la toxina.

En un siguiente paso, decidimos estudiar la evolución temporal de los cambios histológicos producidos tras el tratamiento con la faloidina. Para ello, recogimos en algunos animales, biopsias a diferentes tiempos tras la administración del tóxico. El

estudio reveló una desorganización histológica progresiva del hígado, que era más evidente 60 min después del tratamiento (figura 18 A-F).



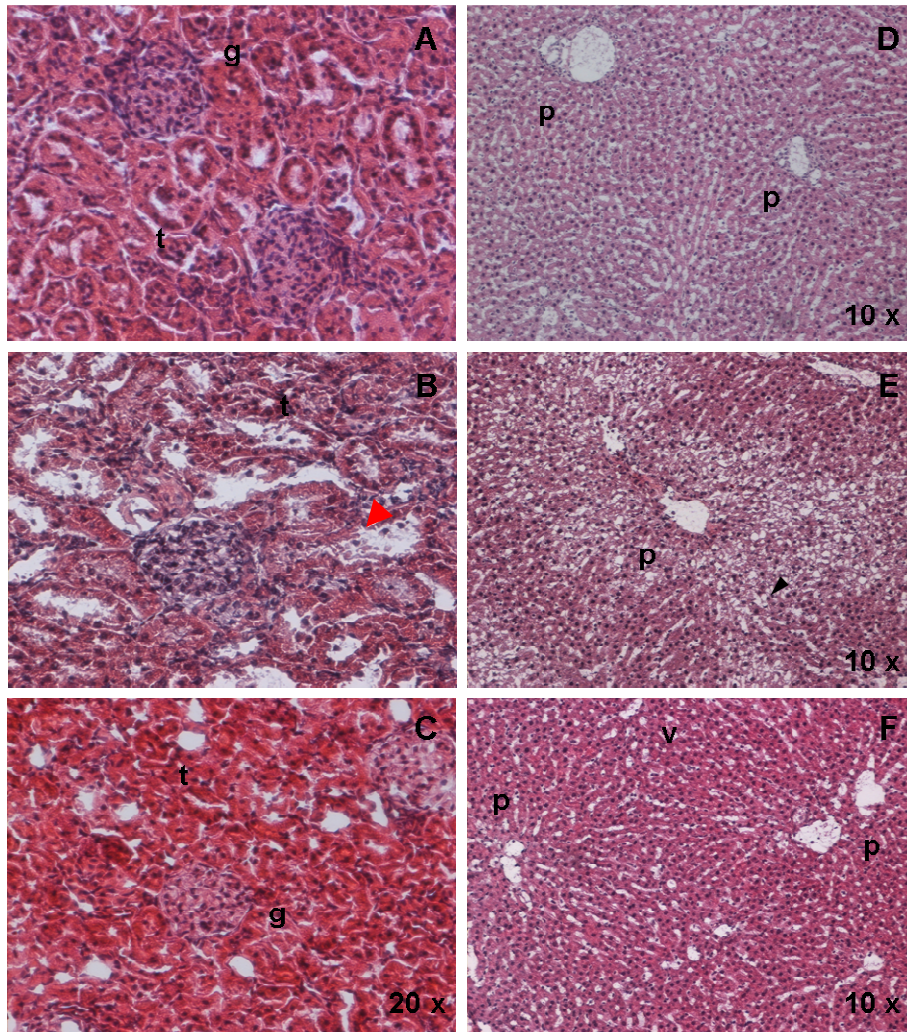
**Figura 18.** Imágenes representativas que ilustran la evolución temporal del daño (vacuolización, puntas de flecha negras; necrosis y desorganización de la estructura tisular, punta de flecha roja; acumulación de componentes de la bilis, flechas blancas) inducido por faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) en el hígado de las ratas. La faloidina era inyectada en la vena yugular en el minuto 0 del periodo experimental, y se recogieron biopsias seriadas a los tiempos indicados (B-F) o en animales control (A). Los cortes de tejido hepático se tiñeron con hematoxilina eosina. En el minuto 120 del periodo experimental las ratas control y tratadas con faloidina recibieron una inyección intravenosa de FITC. G y H muestran la fluorescencia verde de este compuesto en biopsias recogidas 15 min después de su administración. Espacios porta (p), espacios perivenosos (v).

En el tejido se observaba una clara pérdida de la estructura típica del parénquima hepático, una intensa vacuolización de sus células (puntas de flecha) y necrosis.

Para comprobar este último dato, establecimos un grupo experimental de animales control y tratados con faloidina (50 µg/100 g p.c.) sola o en presencia de una infusión continua de BALU-1 (0,2 µmol/min/100 g p.c.) a los que en el minuto 120 del periodo experimental se les administró por vía i.v. 150 nmol de FITC, un compuesto fluorescente capaz de ser secretado a bilis. El análisis histológico de las muestras de tejido hepático recogidas 15 minutos después de la administración del compuesto, mostró la presencia de una fluorescencia difusa extendida por todas las áreas del tejido (figura 18 G). Sin embargo, en los animales que previamente a la inyección del FITC habían sido tratados con faloidina, encontramos acumulaciones del compuesto (figura 18 H, flechas blancas), que no aparecían en las muestras de las ratas tratadas con faloidina y BALU-1.

Finalmente decidimos realizar un estudio histológico de las muestras de hígado y riñón recogidas al final del periodo experimental de los animales control y tratados con faloidina sola (50 µg/100 g p.c.) o en presencia de una infusión continua de BALU-1 (0,2 µmol/min/100 g p.c.). Como cabía esperar, encontramos signos de daño tisular inducido por la toxina en ambos órganos, más severos en el hígado (figuras 19 D, E y F) que en el riñón (figuras 19 A, B y C), donde observamos hipertrofia glomerular, dilatación de los túbulos renales y disminución de la pared epitelial. Además encontramos evidencias de un efecto beneficioso de la administración del BALU-1 sobre tales alteraciones (figura 19 A-F).

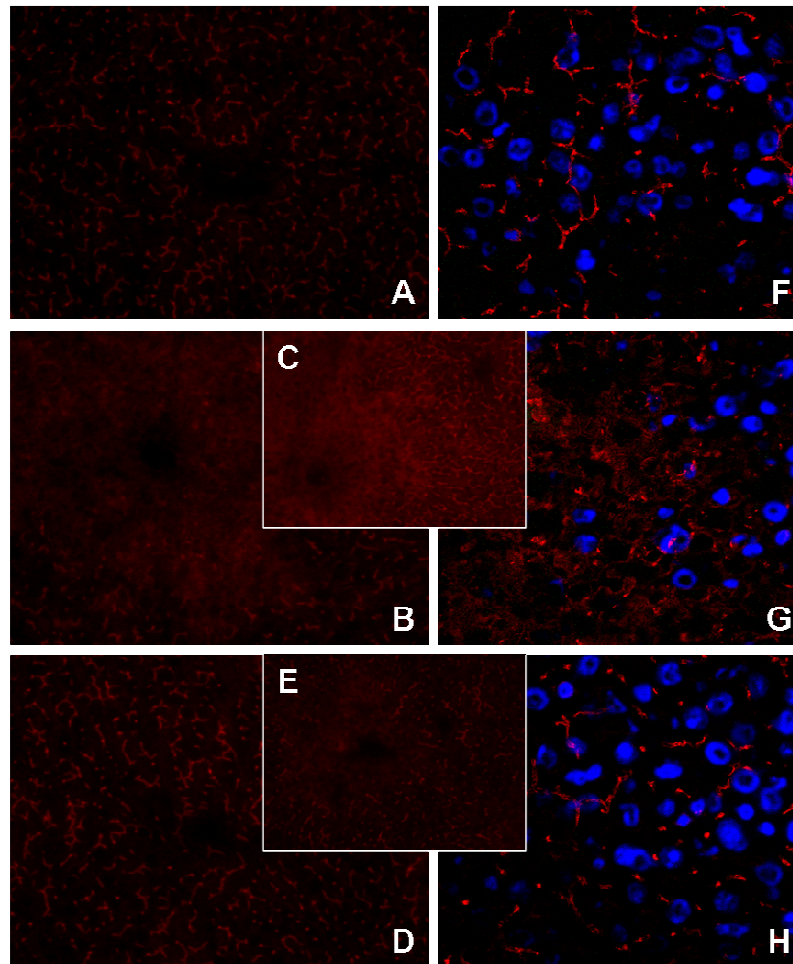




**Figura 19.** Imágenes representativas de cortes histológicos de riñón (A-C) e hígado (D-F) teñidos con hematoxilina y eosina (A-F) en ratas control (A,D), y animales que recibieron faloidina (50  $\mu\text{g}/100\text{ g p.c.}$ ) intravenosa 120 min antes de la recogida de muestras, sola (B, E) o en combinación con una infusión continua de BALU-1 (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ g p.c.}$ , desde el minuto -30 hasta el minuto 120) (C, F). Glomérulo renal (g), túbulos renales (t), espacios porta (p), espacios perivenosos (v). Vacuolización (puntas de flecha negras). Dilatación de túbulos renales (punta de flecha roja).

Para completar el estudio a nivel subcelular, investigamos mediante inmunolocalización, la distribución hepática del transportador canalicular Mrp2, del que se ha sugerido que podría estar implicado en la excreción biliar de la toxina (Fehrenbach *et al.*, 2003; Meier-Abt *et al.*, 2004; Gavrilova *et al.*, 2007). Como muestra la figura 20, la localización de la proteína observada en el hígado de los animales control (figuras 20A y F) se veía alterada en la mayor parte del parénquima hepático de los animales tratados con faloidina (figuras 20B, C y G). Esto parecía debido principalmente a la internalización del transportador (figura 20G), si bien es cierto que algunas regiones mantenían la estructura tisular intacta (figura 20C). En los animales que además fueron tratados con el compuesto BALU-1, la mayor parte del parénquima

hepático mostraba un patrón de expresión de Mrp2 similar al observado en los animales del grupo control (figura 20D), con la Mrp2 bien localizada en la membrana canalicular (figura 20H). Sin embargo, todavía podían observarse pequeñas áreas con una distribución anormal de la proteína (figura 20E).



**Figura 20.** Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado por inmunofluorescencia para Mrp2 en ratas control (A,F), y animales que recibieron faloidina (50  $\mu\text{g}/100$  g p.c.) intravenosa 120 min antes de la recogida de muestras, sola (B, C y G) o en combinación con una infusión continua de BALU-1 (0,2  $\mu\text{mol}/\text{min}/100$  g p.c., desde el minuto -30 hasta el minuto 120) (D, E y H). Las imágenes A-E fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia y las imágenes F-H con un microscopio confocal. Núcleos teñidos de azul con dapi.

Estos resultados confirman hallazgos previos que indican que la faloidina induce la pérdida de la proteína Mrp2 de la membrana canalicular de los hepatocitos de rata, detectándose predominantemente en estructuras intracelulares junto con otras proteínas canaliculares (Rost *et al.*, 1999).

Además, todas estas alteraciones son consistentes con la presencia de acúmulos de FITC en el parénquima hepático de las ratas tratadas con faloidina, mientras que este



compuesto es rápidamente eliminado a la bilis en las ratas control, como previamente han demostrado algunos estudios (Villanueva *et al.*, 1995).

Por tanto, todos los resultados que hemos obtenido indican que el compuesto BALU-1 tiene un efecto beneficioso en las ratas tratadas con faloidina, aunque el mecanismo puede ser más complejo de lo esperado. Así, hemos observado que además de la disminución de la captación de la toxina, estimula su secreción biliar, lo que, en conjunto, da lugar a una reducción del contenido hepático de faloidina en los animales que eran tratados conjuntamente con esta toxina y el derivado de AB. Además, esto ocurre sin afectar la captación hepática de los ABs endógenos. El resultado global es una disminución del efecto colestático de la faloidina y una marcada prevención del daño hepático y renal que ocasiona, caracterizado por una vacuolización y desorganización de la estructura del tejido (Loranger *et al.*, 1996).

Esto sugiere que la administración de un derivado de ABs, como el BALU-1, que en el modelo experimental usado no muestra efectos tóxicos, capaz de inhibir la captación de faloidina y estimular su excreción biliar sin afectar a la captación y secreción de ABs endógenos por las principales rutas de transporte (NTCP/BSEP) y con elevada capacidad colerética, podría ser interesante en el tratamiento farmacológico de intoxicaciones agudas por setas venenosas, como la *Amanita phalloides*, como componentes de los antídotos usados en estos casos, que deberían incluir además agentes frente a la toxicidad de las otras toxinas presentes en las setas, principalmente las amatoxinas, así como para prevenir o disminuir la captación hepática de otras toxinas o fármacos. Sin embargo, la extrapolación de estos resultados a la práctica clínica, requeriría de estudios adicionales de toxicidad

Además, al considerar el desarrollo de una nueva estrategia farmacológica basada en la manipulación molecular de los sistemas de transporte, es necesario tener en cuenta la existencia de variaciones genéticas interindividuales que pueden tener importantes repercusiones tanto en la eficacia del transporte, como en la especificidad por un sustrato, un inhibidor o un activador (Maeda *et al.*, 2008).

## 4.2. Papel de la hipercolanemia materna en la etiopatogenia del síndrome de distrés respiratorio de neonatos de rata

El sistema respiratorio está continuamente expuesto a una gran variedad de sustancias presentes en el aire inhalado, algunas de las cuales son potencialmente tóxicas. Aunque muchas de estas partículas son eliminadas en la parte superior del tracto respiratorio gracias a la secreción de moco y al movimiento de los cilios de las células del epitelio que recubre el árbol bronquial/bronquiolar, también existen sistemas de protección localizados en la parte más distal de las vías aéreas para proteger al tejido frente a sustancias dañinas que puedan alcanzar los alveolos.

El surfactante pulmonar, con actividad bactericida, y los macrófagos alveolares, juegan un papel crucial en la defensa del sistema respiratorio. Además, se ha demostrado que varias proteínas transportadoras expresadas en el hígado, el intestino, o el riñón, implicadas en la captación y eflujo de sustancias en estos órganos, están también presentes en el pulmón (Scheffer *et al.*, 2002; van der Deen *et al.*, 2005; Bosquillon), y parece que, además de encargarse del transporte de moléculas endógenas a través del epitelio respiratorio, podrían contribuir a su protección frente a tóxicos.

En el pulmón se encuentran expresados fundamentalmente transportadores de captación de aniones y cationes orgánicos pertenecientes a las familias OCT, OAT y OATP y bombas de eflujo de la superfamilia de transportadores ABC (Scheffer *et al.*, 2002; van der Deen *et al.*, 2005; Bosquillon, 2010).

Estudios recientes han demostrado que existe una asociación entre la colestasis gravídica y el distrés respiratorio del neonato (Zecca *et al.*, 2006), y que el riesgo de que el neonato desarrolle la enfermedad se relaciona directamente con los niveles de ABs alcanzados en el suero de la madre, que determinan su presencia en el pulmón de los neonatos. Sin embargo, aún no se sabe si el efecto de la hipercolanemia materna sobre el pulmón neonatal se debe a la aspiración de los ABs desde el líquido amniótico o a su captación desde la circulación, ni cómo éstos esteroides pueden contribuir a la aparición del distrés respiratorio.

La enzima fosfolipasa A2 (FLasa A2) juega un papel crucial en la síntesis del surfactante, aunque también puede catalizar la reacción en sentido inverso, degradando fosfolípidos a lisofosfolípidos. Parece que elevados niveles de ABs podrían producir una pérdida de actividad del surfactante al favorecer la degradación de los fosfolípidos por la enzima FLasa A2 (De Luca *et al.*, 2009). Además, no hay que perder de vista que los ácidos biliares son moléculas con capacidad detergente que podrían neutralizar el efecto surfactante de los fosfolípidos y emulsionarlos, favoreciendo así el ataque por la FLasa A2 (Monte *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes, nos planteamos como segundo objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral investigar la presencia de proteínas transportadoras y receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs en el tejido pulmonar materno y fetal, y su posible implicación en la etiopatogenia del síndrome de distrés respiratorio del neonato por afectar a la acumulación de ABs en el tejido pulmonar secundaria a la hipercolanemia materna asociada a la colestasis durante la gestación.

#### 4.2.1. Modelo de colestasis materna

Para realizar este trabajo de investigación se ha utilizado un modelo experimental de colestasis obstructiva en ratas por ligadura del conducto biliar común al comienzo de la tercera y última semana de gestación, que ha sido caracterizado y utilizado con anterioridad en varios estudios llevados a cabo por nuestro grupo (Monte *et al.*, 1996; Macias *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003; Macias *et al.*, 2005). En estos animales se elimina la ruta de secreción de ABs en bilis, lo que ocasiona un desequilibrio en la homeostasis materno-fetal de los mismos. Se selecciona este momento de la gestación debido a que esta tercera semana podría ser comparable al último trimestre de la misma en la mujer, periodo en el que la incidencia de la colestasis intrahepática gestacional es más elevada.

Como se ha descrito en trabajos anteriores, la colestasis experimental durante el último tercio de la gestación produjo un descenso significativo en la capacidad de ganar peso tanto en las madres como en los fetos (tabla 2), de manera que las gestantes del grupo de las colestáticas (CM) llegaban al final de la gestación pesando un 20% menos que las ratas gestantes control (C), y sus fetos con un peso ligeramente menor (-17%) que los de los fetos de madres control.

Otro parámetro determinado fue el número de fetos viables por gestación, ya que en estudios previos se había observado que éste era inferior en gestaciones que cursaban con colestasis obstructiva. Para el grupo de las madres colestáticas el número fue un 20 % menor que en el grupo de las madres control (tabla 2).

Se sabe que durante la gestación se produce una ligera hepatomegalia transitoria debida a una adaptación del hígado al aumento de los requerimientos funcionales. Este aumento de masa hepática fue menor en el grupo con colestasis (tabla 2).

No observamos cambios significativos en el peso hepático fetal del grupo CM comparando con el grupo control. Sorprendentemente si encontramos diferencias significativas en el peso pulmonar de los fetos de ambos grupos (tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de la colestasis obstructiva durante el último tercio de la gestación (CM) sobre distintos parámetros bioquímicos y morfológicos en ratas a término y sus fetos

|                                | MADRES      |                         | FETOS       |                            |
|--------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|----------------------------|
|                                | Control     | CM                      | Control     | CM                         |
| <b>Parámetros morfológicos</b> |             |                         |             |                            |
| Peso corporal (g)              | 314 ± 7,7   | 255 ± 6,1 <sup>a</sup>  | 5,2 ± 0,09  | 4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>     |
| Peso hepático (g)              | 7,4 ± 0,2   | 9,4 ± 0,4 <sup>a</sup>  | 0,25 ± 0,02 | 0,24 ± 0,01                |
| Peso pulmonar (g)              | 1,9 ± 0,12  | 2,3 ± 0,04              | 0,14 ± 0,12 | 0,097 ± 0,003 <sup>a</sup> |
| Número de fetos por gestación  | 10,5 ± 0,8  | 8,8 ± 0,4 <sup>a</sup>  |             |                            |
| <b>Parámetros bioquímicos</b>  |             |                         |             |                            |
| Ácidos biliares totales (µM)   | 34,9 ± 10,5 | 282 ± 39,7 <sup>b</sup> | 38,2 ± 10,6 | 88,6 ± 19,2 <sup>a</sup>   |
| Bilirrubina total (mg/dl)      | 0,1 ± 0,01  | 357 ± 0,3 <sup>b</sup>  | 0,29 ± 0,01 | 0,6 ± 0,02 <sup>b</sup>    |
| GOT (U/l)                      | 71 ± 8,6    | 537 ± 72,4 <sup>b</sup> | 337 ± 5,8   | 355 ± 7,2 <sup>a</sup>     |
| GPT (U/l)                      | 49 ± 2,2    | 74,6 ± 8,7 <sup>b</sup> | 22,3 ± 2,6  | 27,2 ± 1,5                 |
| GGT (U/l)                      | 9 ± 0,5     | 33,9 ± 5,6 <sup>b</sup> | 6,3 ± 0,24  | 7,5 ± 0,26                 |
| Fosfatasa alcalina (U/l)       | 61,2 ± 6,4  | 114 ± 25,2 <sup>a</sup> | 989 ± 24,6  | 1230 ± 22 <sup>b</sup>     |
| LDH (U/l)                      | 1242 ± 238  | 2474 ± 439 <sup>b</sup> | 3313 ± 218  | 3121 ± 664                 |

La colestasis obstructiva se indujo quirúrgicamente en las ratas el día 14 de gestación. Los valores se representan como media±EEM. <sup>a</sup>, p<0,05, <sup>b</sup>, p<0,01 comparando con su correspondiente control mediante el test *t* de Student.

Como cabía esperar, en las madres encontramos un incremento significativo de la concentración sérica de ABs en el grupo CM respecto al grupo control (tabla 2), al no poder la bilis alcanzar el intestino en el grupo de las gestantes con ligadura del conducto biliar y refluir los ABs desde los hepatocitos a la sangre. La concentración de ABs determinada en las madres pertenecientes al grupo CM fue casi 10 veces superior a la que se encontró en el grupo control.

También observamos un aumento significativo en la concentración sérica de bilirrubina, así como en la actividad de las enzimas GOT, GPT, GGT, fosfatasa alcalina (marcador de colestasis biliar obstructiva por excelencia) y LDH en las madres del grupo CM (tabla 2).

A pesar de la hipercolanemia, de las alteraciones en la funcionalidad hepática y de la menor ganancia de peso de las madres, más del 90 % de las gestaciones fueron viables y llegaron espontáneamente a término.

Al analizar los marcadores de funcionalidad hepática en el suero fetal encontramos cambios menos importantes que los observados en el suero de las madres colestáticas.

Encontramos un aumento significativo de la concentración sérica de ABs totales en el grupo CM respecto a los fetos de las madres control (tabla 2). Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que en situaciones de colestasis la acumulación de ABs en la sangre materna invierte el gradiente de estas moléculas (Monte *et al.*, 1995), y altera la capacidad de la placenta de llevar a cabo su transporte vectorial, lo que explica el aumento de los niveles de ABs en la circulación fetal.

La existencia de una barrera placentaria hace que la magnitud de la hipercolanemia sea mucho menor que en la madre, no llegando al doble de los valores detectados en condiciones control, sin embargo las consecuencias para el feto pueden ser graves debido a que sus tejidos son más frágiles al no estar completamente desarrollados.

Por otra parte, durante la etapa perinatal el aparato secretor biliar es inmaduro, ya que, entre otras causas, el canalículo biliar de los hepatocitos carece de microvellosidades bien definidas, típicas de los adultos, hasta el día 10 después del nacimiento. Existe pues una fase de hipercolanemia fisiológica perinatal en el desarrollo hepático, como lo demuestra la elevación de los niveles séricos de ABs encontrada en los fetos controles, respecto a los niveles de las madres control.

Del resto de parámetros bioquímicos estudiados sólo encontramos diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en la concentración sérica de fosfatasa alcalina y de bilirrubina total, cuyos valores prácticamente duplicaban a los encontrados en el suero de los fetos pertenecientes al grupo control (tabla 2), lo que puede resultar peligroso debido a la elevada toxicidad de la bilirrubina, cuando se acumula en el sistema nervioso en desarrollo.

#### **4.2.2. Efecto de la colestasis materna sobre la distribución corporal de ácidos biliares**

Los resultados que hemos descrito hasta ahora ilustran algunos de los aspectos de la alteración que provoca la colestasis materna en la función hepatobiliar. Sin embargo, la hipercolanemia también afecta a otros órganos como la placenta o el riñón (Bomzon *et al.*, 1997; Macias *et al.*, 2000). Como ya hemos comentado, recientemente se ha demostrado que la colestasis intrahepática gestacional se asocia al síndrome de distrés respiratorio del neonato (SDRN) que aparece en bebés prematuros o a término (Zecca *et al.*, 2004; Zecca *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que la hipercolanemia materna puede inducir distrés respiratorio neonatal.

Varios estudios indican que la presencia de ABs en el tracto respiratorio produce una alteración de la estructura del tejido (Kaneko *et al.*, 1982; Kaneko *et al.*, 1990;

Porembka *et al.*, 1993). Así, se ha observado que la aspiración de ABs en determinadas patologías como el reflujo gastroesofágico, pancreatitis o cáncer de esófago, induce distrés respiratorio agudo (Blondeau *et al.*, ; Zhou *et al.*, ; Mertens *et al.*). Por esta razón, nos preguntamos si los ABs elevados en la sangre materna y fetal durante la colestasis gestacional podrían acumularse en el pulmón alterando su estructura y función.

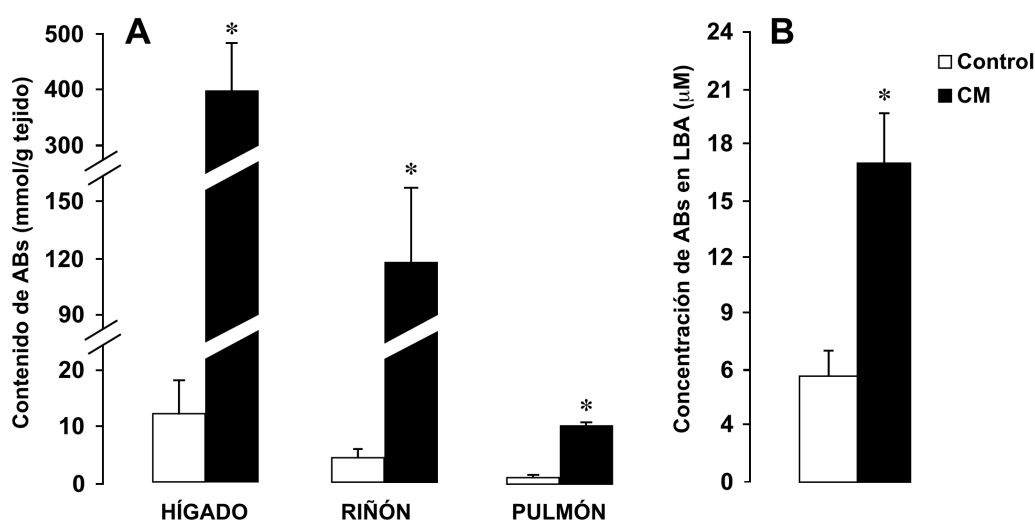
Para contestar a esta pregunta marcamos el “pool” total de ABs con [<sup>3</sup>H]-ATC, administrado a las madres dos días antes del parto por vía intraperitoneal, de manera que pudiéramos seguir su distribución y acumulación en diferentes tejidos maternos y fetales en ambos grupos experimentales, C y CM. Decidimos determinar los niveles de ABs en pulmón, en hígado y en riñón.

La figura 21A muestra el contenido de ABs en los tejidos de las ratas gestantes a término. Los mayores niveles de ABs los encontramos en el tejido hepático, seguido del renal, ya que los ABs que en su circulación enterohepática no son captados por el hígado, son filtrados por los glomérulos renales y posteriormente reabsorbidos en el túbulo contorneado proximal (Wilson *et al.*, 1981).

En condiciones normales la pérdida de ABs por orina es mínima. Sin embargo, durante la colestasis la excreción renal puede convertirse en la principal ruta para la eliminación de los ABs (Raedsch *et al.*, 1981), lo que explica el aumento en casi 30 veces de sus niveles en este tejido en el grupo de las madres colestáticas. Aún mayor fue la acumulación de ABs en el hígado durante la colestasis, alcanzándose valores más de 30 veces superiores a los detectados en el grupo control.

La cantidad de ABs en el tejido pulmonar de las gestantes control era muy pequeña. Sin embargo, los niveles aumentaron 10 veces tras una semana de colestasis, demostrando que el aumento de los niveles de ABs circulantes provocaba una acumulación de los mismos en el tejido pulmonar.

Además, la determinación de los niveles de ABs en el lavado broncoalveolar (LBA) de las madres mostró valores 5 veces superiores en el grupo de las colestáticas que los detectados en el control (figura 21B), lo que parecía indicar que éstos eran transportados hacia el espacio alveolar, desde el interior de las células del epitelio.

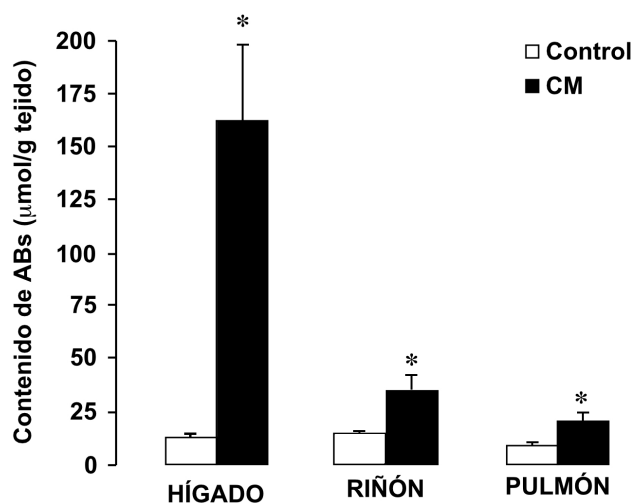


**Figura 21.** Distribución de ABs en diferentes tejidos (A) y lavado broncoalveolar (LBA) (B) en ratas gestantes a término control (barras blancas) o con colestasis obstructiva (CM) (barras negras), tras la administración intraperitoneal de  $[H^3]$ -ATC ( $50 \times 10^6$  dpm) el día 19 de gestación. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de medidas realizadas en 4 ratas por grupo. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control por el test  $t$  de Student

Cuando determinamos niveles de ABs en los tejidos fetales (figura 22) encontramos, en todos los casos, mayores niveles en el grupo CM que en el control. Nuevamente los niveles más altos se observaron en el tejido hepático de los fetos hijos de madres colestáticas, alcanzándose en este tejido valores 10 veces superiores a los encontrados en el grupo control. En el caso del pulmón la cantidad de ABs detectada en los fetos pertenecientes al grupo CM fue el doble que en los controles, al igual que ocurrió para el riñón.

En todos los tejidos encontramos que en el grupo control los niveles de ABs fueron superiores a los detectados en los correspondientes tejidos de las madres, probablemente debido a la hipercolanemia fisiológica fetal que, como ya hemos comentado, se debe a la inmadurez del aparato secretor biliar del feto, y que determina la existencia de un gradiente de ABs en dirección feto-madre (Monte *et al.*, 1995). Sin embargo, en los fetos del grupo CM la acumulación de estas moléculas fue menor que la encontrada en las madres.

Estos resultados sugieren que el aumento de ABs en el tejido pulmonar y en el líquido alveolar es un reflejo del aumento de los niveles séricos de estas moléculas. Así una subida de la colanemia de 8 veces en las madres supone un aumento de 3 veces en los niveles de ABs en el líquido alveolar. Un fenómeno similar puede sugerirse para el pulmón fetal, donde debido a la fragilidad de los tejidos no ha sido posible obtener muestras de contenido alveolar.



**Figura 22.** Distribución de ABs en diferentes tejidos de fetos hijos de gestantes a término control (n=8) o con colestasis obstructiva (CM) (n=8), tras la administración intraperitoneal de ATC-[H<sup>3</sup>] (50 x 10<sup>6</sup> dpm) a las madres el día 19 de gestación. Los valores representan la media±EEM. \*, p<0,05 comparando con el grupo control por test t de Student.

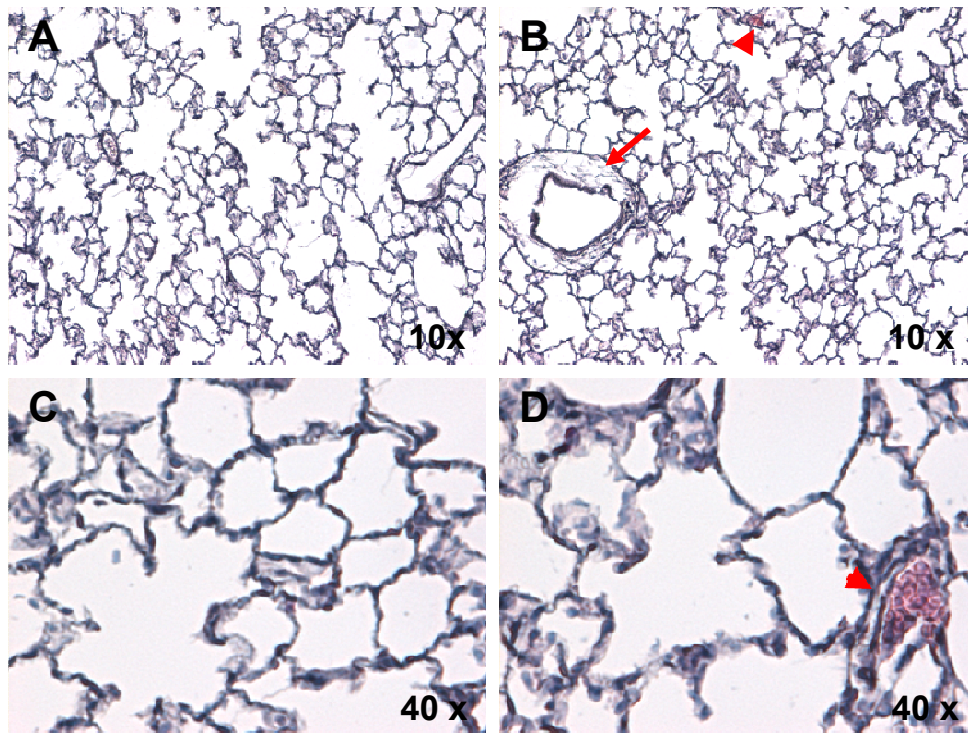
#### 4.2.3. Efecto de la colestasis materna sobre la estructura del tejido pulmonar

Puesto que los ABs tienen propiedades detergentes pudiendo ser tóxicos para las células a elevadas concentraciones, especialmente para los tejidos en desarrollo, y, como hemos demostrado en trabajos previos de nuestro grupo, la colestasis materna produce un retraso en la maduración de la función hepatobiliar de los neonatos (Monte *et al.*, 1996; El-Mir *et al.*, 1997) nos preguntamos si la acumulación de ABs en el tejido pulmonar durante la colestasis materna podría alterar su estructura, y si la maduración del pulmón fetal podía verse comprometida. Puesto que ésta se produce en las últimas semanas de gestación, podemos descartar efectos de la hipercolanemia sobre la organogénesis, que se podrían producir si se impusiera la colestasis materna en etapas anteriores del desarrollo intrauterino.

Para contestar a estas preguntas, en primer lugar, investigamos si la colestasis materna producía cambios estructurales en pulmón, realizando para ello un análisis histológico del tejido pulmonar materno y fetal de los dos grupos experimentales.

La figura 23 muestra cortes histológicos de pulmón materno teñidos con hematoxilina-eosina observados con el microscopio óptico.

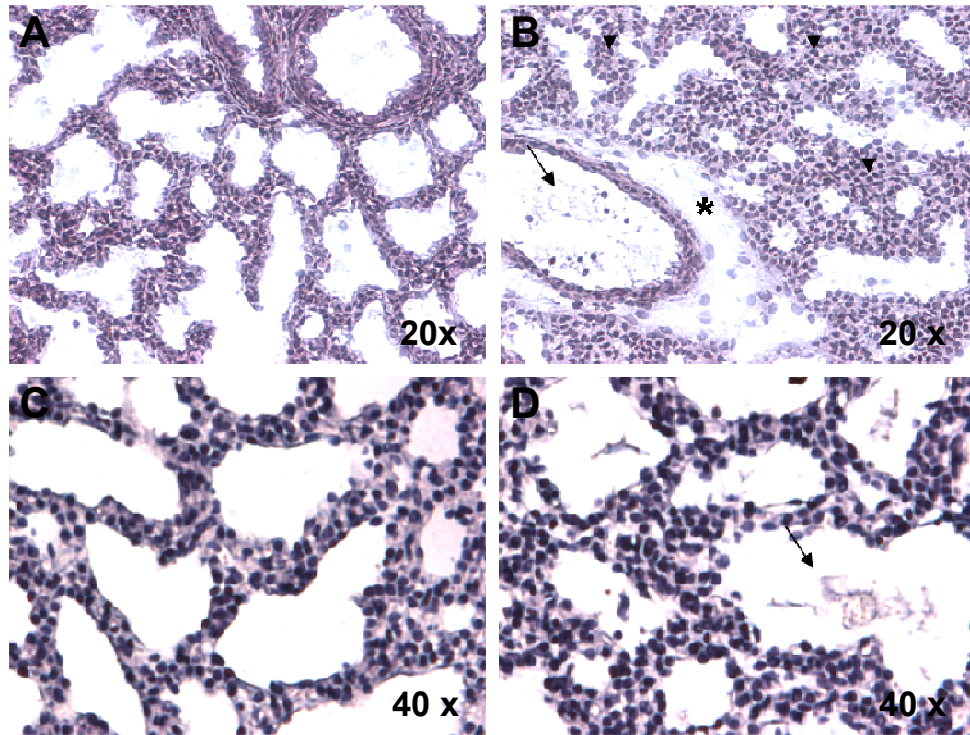




**Figura 23.** Imágenes representativas de cortes histológicos de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina en ratas gestantes a término control (A y C) o con colestasis obstructiva (B y D). Edema peribronquiolar (flechas); infiltración de células inflamatorias (puntas de flecha).

A pesar de la marcada hipercolanemia materna, observamos que en el grupo CM la estructura general del pulmón de las madres colestáticas (figuras 23B y 23D) no difería en gran medida de las controles (figuras 23A y 23C), aunque sí aparecían signos de edema peribronquiolar (flechas) y acúmulo de células en distintas áreas del epitelio alveolar (puntas de flecha), que podría deberse a infiltración de células inflamatorias.

Sin embargo, el análisis morfológico del parénquima pulmonar fetal, que se muestra en la figura 24, reveló alteraciones estructurales evidentes en el grupo de los fetos hijos de madres con colestasis. Encontramos un aumento en el espesor de las paredes alveolares, así como una reducción del tamaño de los espacios alveolares y del número de alveolos en los fetos del grupo CM (figuras 24B y 24D) comparando con el grupo control (figuras 24 A y 24C). También observamos edema peribronquiolar y, en algunos casos, depósitos de membrana hialina, característicos del SDR (flechas).



**Figura 24.** Imágenes representativas de cortes histológicos de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina en fetos hijos de madres control (A y C) o con colestasis obstructiva (B y D). Edema peribronquiolar (asterisco); depósitos de membrana hialina (flechas); colapso alveolar (puntas de flecha).

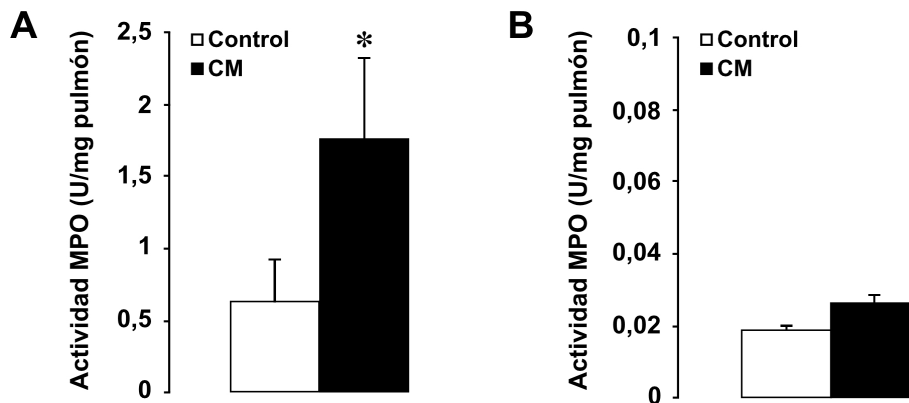
#### 4.2.4. Efecto de la colestasis materna sobre la inmunidad pulmonar

Para investigar si las células acumuladas en el tejido pulmonar de las ratas con colestasis eran células inflamatorias, llevamos a cabo varias aproximaciones experimentales.

Se ha descrito que en colestasis obstructiva en la rata se produce un aumento de neutrófilos en el pulmón (Manso *et al.*, 2007), por lo que decidimos medir la infiltración de neutrófilos en el tejido pulmonar materno y fetal evaluando la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), una enzima altamente expresada en neutrófilos, usada como índice de migración leucocitaria, ya que su actividad es directamente proporcional al número de neutrófilos infiltrados en el tejido.

Nuestros resultados mostraron que la colestasis obstructiva produjo un aumento significativo de la actividad MPO en el tejido pulmonar materno respecto al control (figura 25A). La actividad MPO fue mucho más baja en el tejido pulmonar fetal y no se encontraron diferencias en esta actividad enzimática entre los dos grupos experimentales (figura 25B).

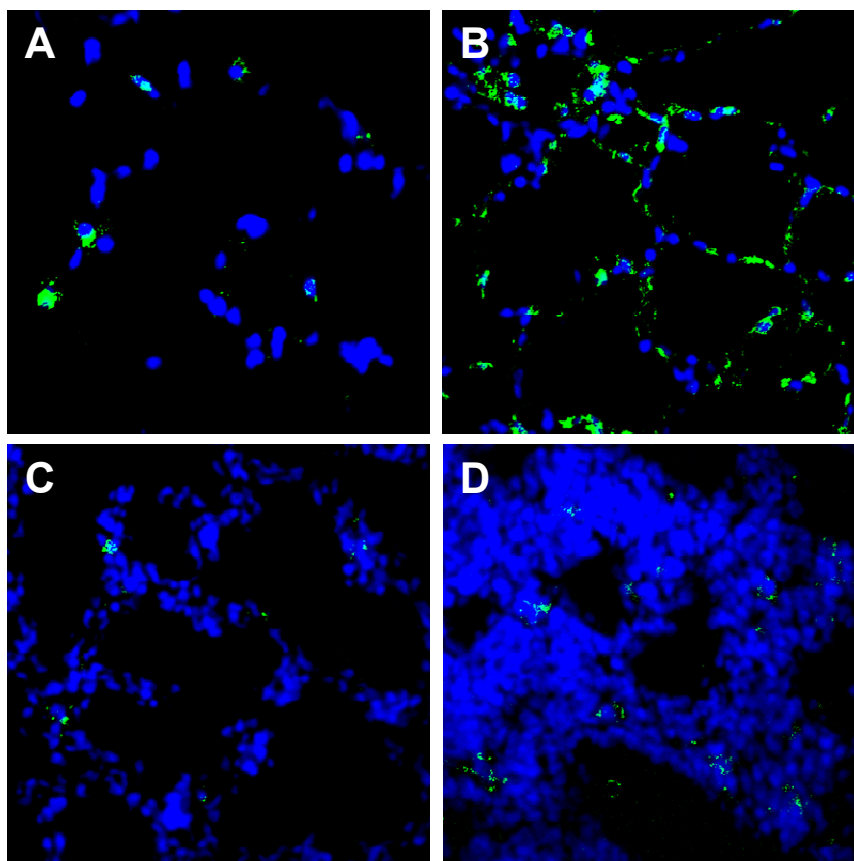
Tampoco encontramos diferencias en la actividad MPO en el tejido hepático tras una semana de colestasis materna (datos no mostrados), probablemente porque las células de Kupffer son capaces por sí mismas de desarrollar una respuesta inmune inicial, de manera que no se requiere el reclutamiento de neutrófilos en el hígado.



**Figura 25.** Actividad MPO en pulmón de ratas gestantes a término (n=6) (A) y sus fetos (n=18) (B) controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras), determinada espectrofotométricamente. Los valores representan la media  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Para investigar si había un aumento de macrófagos en el pulmón, llevamos a cabo un estudio de inmunofluorescencia en cortes de tejido materno y fetal utilizando un anticuerpo específico frente a macrófagos alveolares (anti-ED1). La figura 26 muestra imágenes representativas de microscopía confocal del marcaje, en verde, de los macrófagos alveolares, y en azul los núcleos teñidos con Dapi. Pudimos observar cómo en el pulmón de las madres colestáticas (figura 26B) había un mayor número de macrófagos que en el pulmón control (figura 26A).

En el caso del tejido pulmonar fetal, en el grupo CM encontramos indicios de una reacción inflamatoria moderada, ya que sólo había un ligero aumento de macrófagos (figura 26D), comparado con el pulmón fetal control (figura 26C).



**Figura 26.** Inmunolocalización de ED1 como marcador de macrófagos alveolares en pulmón de ratas gestantes a término (A y B) y sus fetos (C y D), control (A y C) o con colestasis gestacional (B y D). En verde se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color azul, se tiñeron con Dapi.

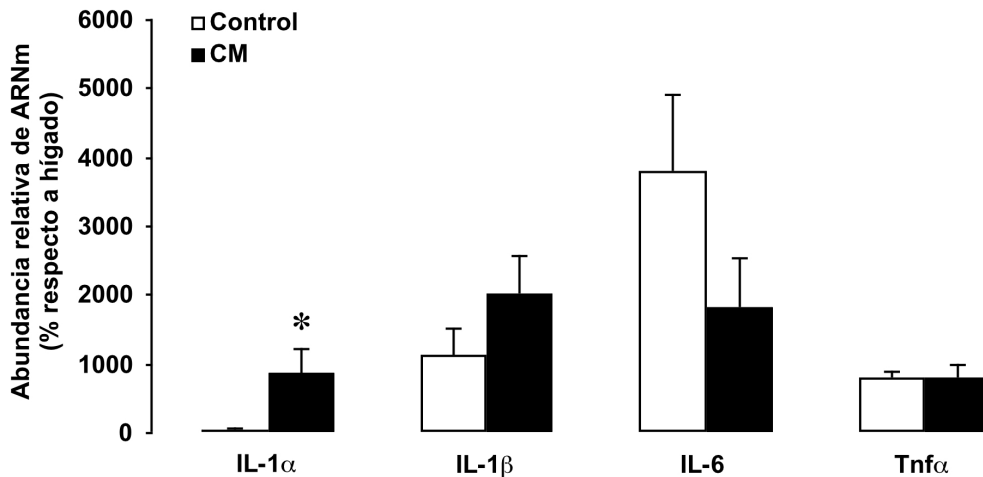
Los macrófagos constituyen una importante y rápida línea de defensa ante una gran variedad de agresiones químicas y biológicas. Cuando se activan en respuesta a un estímulo adecuado comienzan a sintetizar y liberar citoquinas, que actúan como mensajeros químicos, regulando la función de las células del sistema inmune. Por esta razón decidimos medir los niveles de expresión de varias de estas citoquinas que se utilizan como medida de la activación de los macrófagos alveolares.

La figura 27 muestra los niveles de ARNm de cuatro de las principales citoquinas producidas por los macrófagos en el tejido pulmonar materno medidos por PCR cuantitativa a tiempo real.

Observamos un aumento significativo de la expresión de IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$  en el grupo de las gestantes colestáticas, ambas con conocidas propiedades pro-inflamatorias y quimiotácticas para los neutrófilos. No encontramos, sin embargo, ningún cambio en

los niveles de ARNm de  $TNF\alpha$ , principal mediador de la respuesta inflamatoria. Sorprendentemente, la expresión de la IL-6 caía tras una semana de colestasis.

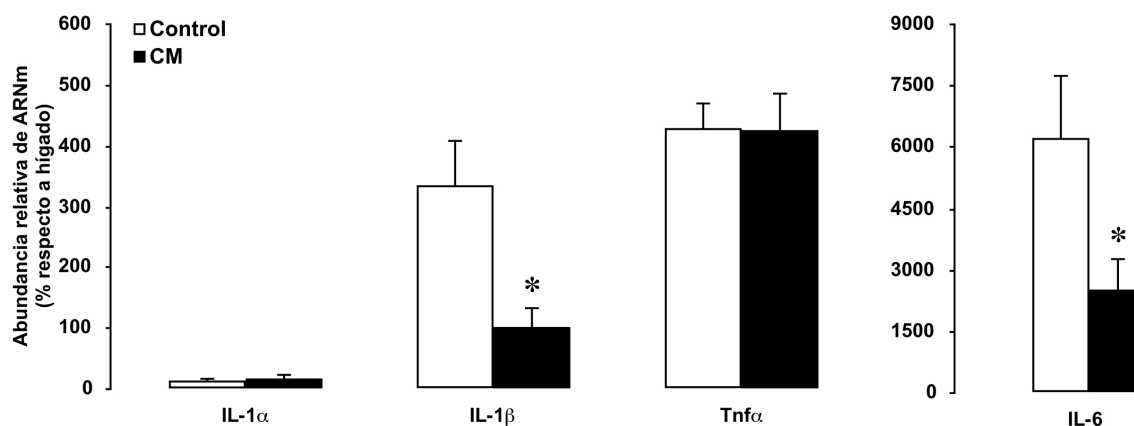
Estudios recogidos en la bibliografía indican que la hipercapnia, desarrollada frecuentemente en pacientes con distrés respiratorio agudo, inhibe la expresión de IL-6 (Wang *et al.*, 2010), lo que parece tener efectos antiinflamatorios, atenuando así el daño pulmonar inducido por una respuesta inflamatoria.



**Figura 27.** Niveles relativos de ARNm de citocinas en pulmón de ratas gestantes a término controles (barras blancas) o con colestasis gestacional (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 6 ratas por grupo  $\pm$  EEM del porcentaje de expresión respecto a hígado de rata adulta. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control mediante el test de *t* de Student.

Cuando medimos los niveles de expresión de estas mismas citocinas en el pulmón de los fetos pertenecientes a los dos grupos experimentales, encontramos niveles de expresión inferiores a los detectados en el tejido materno, como cabe esperar dada la inmadurez del sistema inmune fetal, excepto en el caso de la IL-6, cuyos niveles en el grupo control fueron superiores a los determinados en las madres. Observamos una marcada caída de la expresión de las interleukinas  $1\beta$  y 6 en el grupo de colestasis (figura 28). Los niveles de  $TNF\alpha$  no se vieron modificados por la hipercolanemia, al igual que ocurría en el caso de las madres.

Se sabe que la IL-6 promueve la maduración del pulmón fetal, aumentando las concentraciones de corticoesteroides en sangre (Salas *et al.*, 1990). Parece que éstos podrían actuar sobre los pneumocitos tipo II induciendo la síntesis del surfactante pulmonar. Por tanto, la caída de la expresión de IL-6 en el pulmón de los fetos hijos de madres colestáticas podría ser indicativa de un retraso en el proceso de maduración pulmonar.

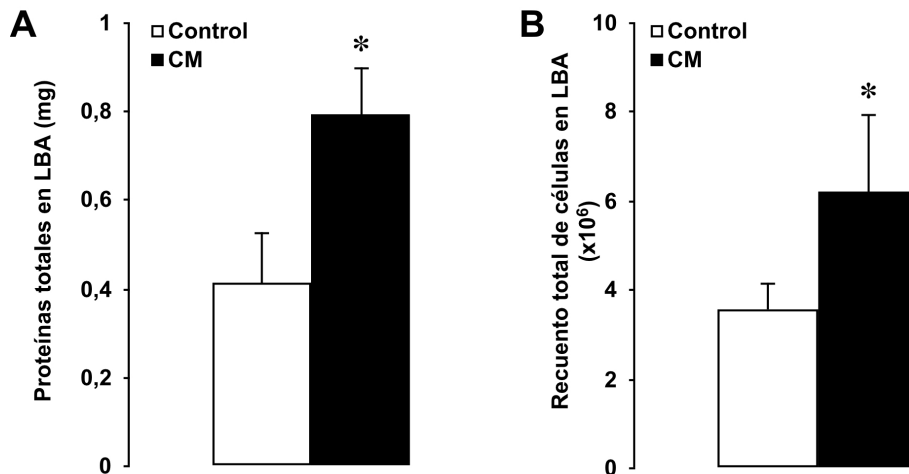


**Figura 28.** Niveles relativos de ARNm de citocinas en pulmón de fetos a término controles (barras negras) o con colestasis materna (barras blancas) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de 18 fetos por grupo expresado como porcentaje respecto a hígado de rata adulta. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

El menor número de macrófagos que encontramos en el tejido fetal (figura 26) puede justificarse, en parte, por la menor acumulación de ABs en el compartimento fetal y, en parte, por estudios que han demostrado que la respuesta fetal ante una agresión es mucho menor que la del adulto debido a la inmadurez del sistema inmune fetal, lo que favorece que exista un menor daño debido a la respuesta inflamatoria (White *et al.*, 1993).

Para completar el análisis, realizamos un estudio en el LBA solamente de las madres control y colestáticas, ya que debido a la fragilidad de los tejidos fetales estas muestras no se pudieron obtener de los fetos. Observamos que, tanto la cantidad de proteínas (figura 29A), como el número de células totales (figura 29B) en el LBA fue mayor en el pulmón de las gestantes colestáticas que en las controles.



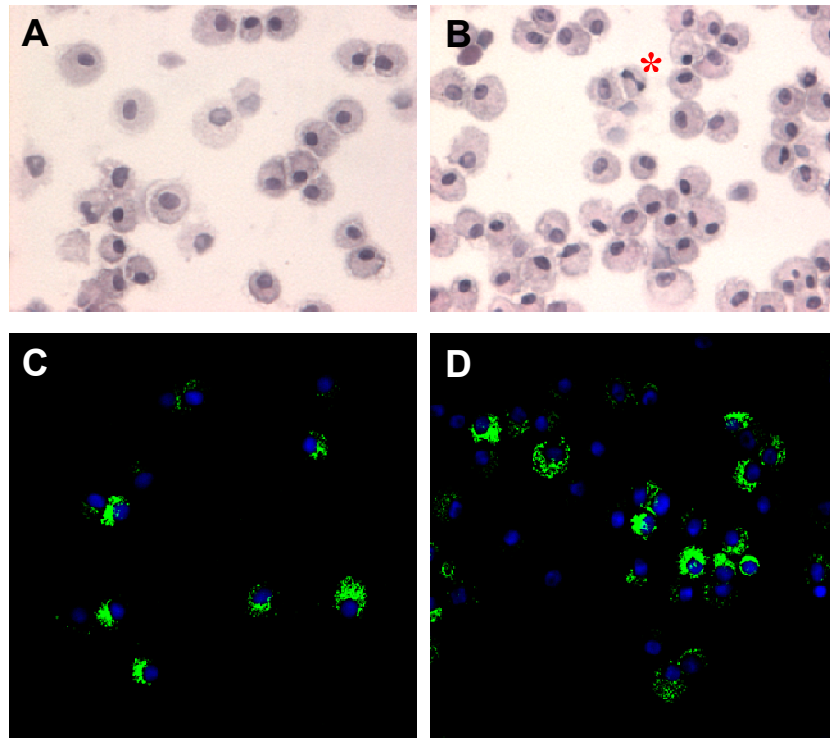


**Figura 29.** Cantidad de proteínas totales (A) y recuento total de células (B) en el LBA de ratas gestantes a término control (barras blancas) o con colestasis obstructiva (barras negras), obtenido tras la inyección intratraqueal de 5 ml de solución salina, en 6 ratas por grupo. Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control mediante el test  $t$  de Student.

Para determinar qué tipo de células se encontraban en el LBA, se fijaron en portas con una citocentrífuga, se tiñeron con hematoxilina-eosina, y se observaron al microscopio. Las figuras 30A y 30B muestran imágenes representativas de los grupos control y CM, respectivamente. Encontramos más neutrófilos (asteriscos) en el grupo de las ratas colestáticas y más células mononucleadas que, por el aspecto, parecían macrófagos.

Para confirmarlo, se llevó a cabo un marcaje por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-ED1 (verde), que permitió demostrar que la mayoría de las células en el grupo control eran macrófagos (figura 30C) y que en el grupo CM (figura 31D) aumentaba su número. Además, la tinción de los núcleos con Dapi (azul) mostró que el número de células que no presentaban inmunorreactividad con el anticuerpo anti-ED1 era también mayor en este grupo.

Comprobamos, por tanto, que la hipercolanemia materna inducía infiltración de diferentes células del sistema inmune, macrófagos y neutrófilos, que ya habíamos observado, y también de eosinófilos (figura 30B).



**Figura 30.** Imágenes representativas células de LBA de ratas gestantes a término control (A) o con colestasis obstructiva (B) teñidas con hematoxilina-eosina. Imágenes de inmunofluorescencia de ED1 como marcador de macrófagos alveolares en células de LBA de ratas gestantes a término control (C) o con colestasis gestacional (D). En verde se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color azul, se tiñeron con Dapi. Eosinófilos (asterisco).

Tanto el incremento en la concentración de proteínas en el LBA, como de células inflamatorias nos indican un aumento de la permeabilidad vascular que da lugar a la entrada en el espacio alveolar de células y proteínas desde la circulación. Este dato concuerda con los resultados obtenidos previamente por el análisis histológico de los cortes de tejido, que nos mostraban la existencia de infiltrado de células y edema en diferentes áreas del tejido.

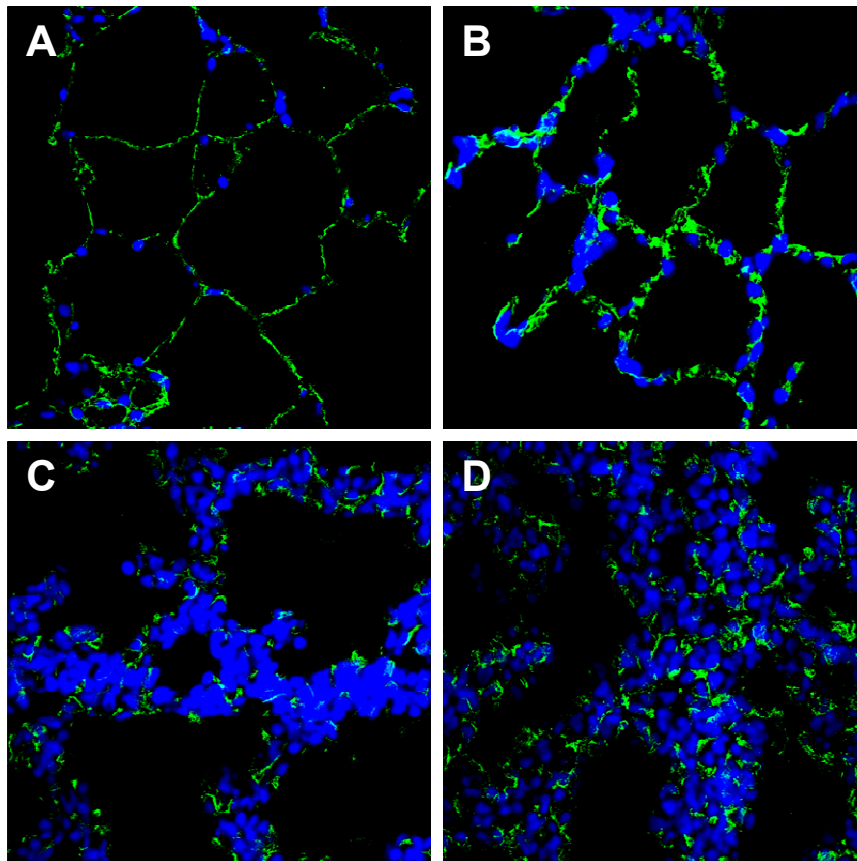
Para observar el aspecto del endotelio pulmonar de madres y fetos del grupo CM llevamos a cabo un estudio por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente a Reca-1, un antígeno de superficie que se expresa en todas las células endoteliales de rata (Duijvestijn *et al.*, 1992).

La figura 31 muestra imágenes de microscopía confocal obtenidas en cortes de pulmón materno y fetal de los grupos control y con colestasis marcados con Reca 1 (en verde) y con Dapi. En el pulmón adulto control se observa una fina capa de células endoteliales enmarcando el espacio alveolar (figura 31A), mientras que en pulmón colestático encontramos un engrosamiento de la capa de endotelio (figura



31B), lo que puede ser un factor limitante de considerable importancia en el proceso de intercambio gaseoso.

Un resultado similar encontramos en el pulmón fetal. En las muestras de fetos del grupo CM (figura 31C), el tejido endotelial aparecía más ensanchado que en los controles (figura 31D). Además la tinción de los núcleos con Dapi nos permitió confirmar lo que observamos en el estudio histológico, el mayor grosor del epitelio alveolar que caracteriza a un pulmón inmaduro y que determina una menor superficie de intercambio gaseoso y una mayor resistencia al flujo de sangre en los fetos CM (figura 31D). Pudimos ver nuevamente cómo el tamaño de los espacios alveolares son menores en los fetos hijos de madres con colestasis, lo que podría conducir a la insuficiencia respiratoria y el colapso del pulmón al final de la espiración del futuro neonato, ya que la tensión superficial de los alveolos de pequeño tamaño es mayor, y por tanto mayor el trabajo necesario para expandirlos.



**Figura 31.** Inmunolocalización de Reca1 como marcador de células endoteliales en pulmón de ratas gestantes a término (A y B) y sus fetos (C y D), control (A y C) o con colestasis obstructiva (B y D). En verde se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color azul, se tiñeron con Dapi.

Como hemos comentado ampliamente en el apartado de Introducción, la principal función del surfactante es disminuir la tensión superficial, y por tanto la tendencia de los alveolos al colapso. Su efecto es particularmente importante en el momento del nacimiento, cuando los pulmones se expanden por primera vez, y deben superar la tensión superficial de la interfase líquido-aire establecida dentro de los pulmones en cuanto el neonato respira por primera vez.

Sin embargo, se sabe que durante la vida intrauterina existen movimientos respiratorios fetales, fundamentales para el mantenimiento de un volumen pulmonar adecuado (Miller *et al.*, 1993). Se han detectado desde las 11 semanas y aumentan conforme se acerca el parto. Por tanto, un déficit de surfactante pulmonar también podría conducir al colapso alveolar durante la etapa fetal, como el que observamos en el análisis histológico realizado en el tejido pulmonar de fetos de rata.

Por otra parte, se sabe que la acumulación de ABs en la placenta durante la colestasis produce importantes cambios en su estructura con atrofia del tejido trofoblástico (Macias *et al.*, 2000) y vasoconstricción de las venas coriónicas (Sepulveda *et al.*, 1991), lo que puede producir un aumento de la resistencia al flujo de sangre a través de la placenta y por tanto un menor aporte de oxígeno al feto. Esta situación produce hipoxemia, y ésta un incremento de la permeabilidad capilar que podría explicar el aumento de la inmunorreactividad a Reca-1 en el pulmón fetal y que podría conducir al desarrollo de edema y al acúmulo en el interior de los alveolos de un material rico en proteínas, conocido con el nombre de membrana hialina (figura 24D).

A la vista de estos resultados podemos decir que la elevada concentración de ABs en el pulmón podría contribuir al desarrollo de un proceso inflamatorio en este órgano que parece ser de menor magnitud en el caso del tejido fetal.

#### **4.2.5. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión de la eritropoyetina**

Puesto que los resultados obtenidos mostraban una alteración de la estructura pulmonar y un incremento en la permeabilidad vascular, más acusadas en el tejido fetal, nos preguntamos si estos cambios podían afectar al proceso de intercambio gaseoso tras el nacimiento. Para investigar este punto, llevamos a cabo la determinación de la expresión de la eritropoyetina (Epo) como medida indirecta de la función pulmonar.

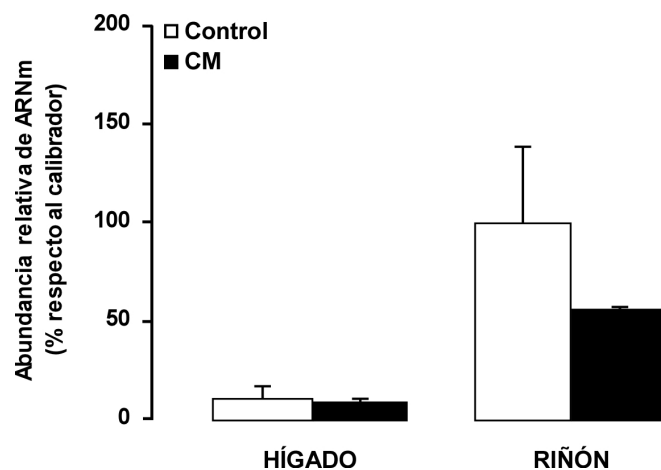
La Epo es una hormona cuya función principal es la regulación de la eritropoyesis. Su expresión aumenta en condiciones de hipoxia induciendo la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides (Jelkmann, 1992),

lo que contrarresta la hipoxia tisular al incrementar la capacidad de transportar oxígeno.

Utilizando el modelo experimental de colestasis obstructiva en ratas gestantes recogimos muestras de tejido hepático y renal de neonatos recién nacidos (día 0) y de 3 y 5 días de vida pertenecientes a ambos grupos experimentales. Además, obtuvimos tejidos maternos tras sacrificar a la ratas madre el día 5 post-parto. En esas muestras medimos la abundancia relativa del ARNm de la Epo.

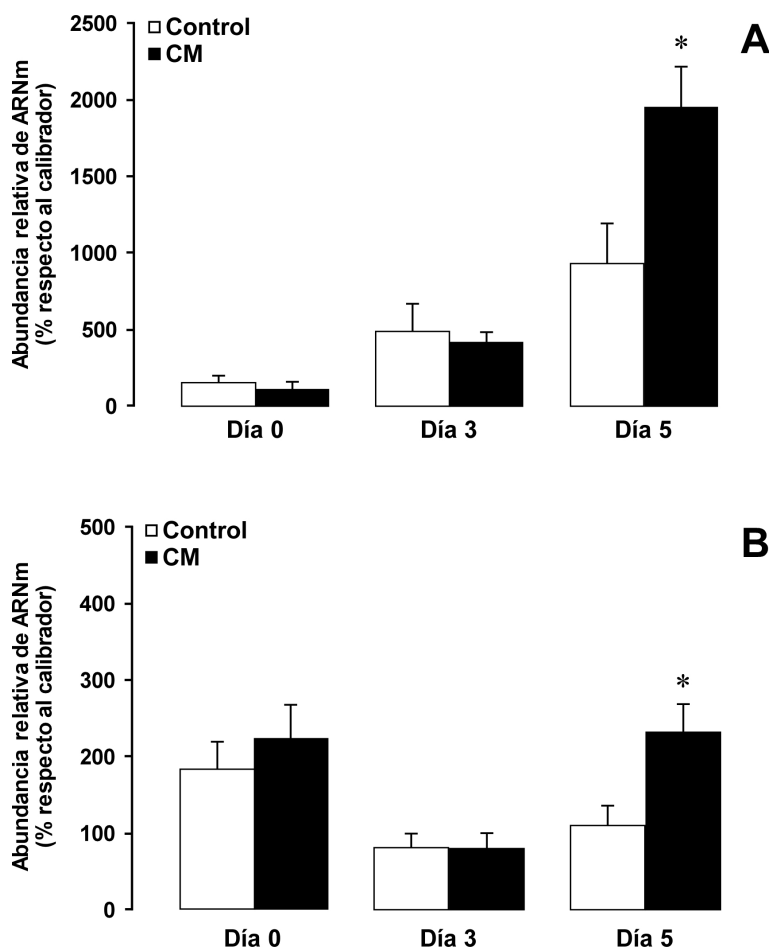
En la figura 32 observamos que, tal y como está descrito (Jacobson *et al.*, 1957), el riñón es el principal órgano encargado de la síntesis de Epo durante la vida adulta, mientras que, en ratas, como en humanos (Bondurant *et al.*, 1991), el hígado contribuye en menos de un 10% a la producción total de esta hormona. La colestasis materna no produjo cambios en la expresión del gen de la Epo respecto a los niveles detectados en el tejido control, aunque en el riñón se observó una caída que no alcanzó significación estadística.

Puesto que en este diseño experimental las madres se mantenían con vida hasta que los neonatos de 5 días eran sacrificados, la colestasis en estas ratas duraba casi 2 semanas. Por tanto, cabe esperar que en estos animales exista un daño renal que podría explicar la caída observada en la expresión de Epo por el deterioro del parénquima renal. Aunque por otras causas, este efecto es similar al de una hipoxia renal prolongada que acaba produciendo una disminución de la expresión de Epo debido a la pérdida de células que expresan el gen (Eckardt *et al.*, 1993).



**Figura 32.** Niveles relativos de ARNm de Eritropoyetina en hígado y riñón de ratas controles (barras blancas) o con colestasis gestacional (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 3 ratas por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a riñón de rata adulta, y normalizados por los valores de ARNm de Hprt-1. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Cuando medimos los niveles de ARNm de Epo en el hígado (figura 33A) y riñón (figura 33B) de los neonatos pertenecientes a los grupos C y CM encontramos una mayor expresión de la proteína en el tejido hepático. Estos datos concuerdan con los recogidos en la bibliografía que señalan al hígado como el tejido encargado de la síntesis de Epo durante la etapa fetal y perinatal (Peschle *et al.*, 1975; Zanjani *et al.*, 1977).



**Figura 33.** Niveles relativos de ARNm de Eritropoyetina en hígado (A) y riñón (B) de neonatos de rata controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de al menos 9 neonatos por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a riñón de rata adulta, y normalizados por los valores de ARNm de Hprt-1. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Sólo observamos cambios estadísticamente significativos entre los dos grupos experimentales en los neonatos de 5 días, donde la expresión de Epo detectada tanto en el tejido hepático como en el renal duplicaba los valores

observados en el grupo control. Estos resultados sugieren la existencia de una deficiente oxigenación del hígado y el riñón de estos animales, lo que está de acuerdo con una alteración en el proceso de intercambio gaseoso en los neonatos hijos de madres con colestasis, asociado al daño en el tejido pulmonar.

Por otra parte, en los últimos años, la Epo ha emergido como una importante molécula citoprotectora, capaz de proteger varios tipos de tejidos, como el cerebro, el corazón, el riñón o el pulmón (Yang *et al.*, 2003; Ozer *et al.*, 2005; Lipsic *et al.*, 2006; Grasso *et al.*, 2007), frente a diferentes agresiones a través de la inhibición de la apoptosis (Carlini *et al.*, 1999; MacRedmond *et al.*, 2009) y la regulación de la angiogénesis (Kertesz *et al.*, 2004). Además, existen estudios que muestran su capacidad para modular la respuesta inflamatoria en neonatos de rata (Lee *et al.*, 2007). A nivel pulmonar se le atribuyen propiedades antioxidantes (Tascilar *et al.*, 2007) y parece que promueve la reparación del endotelio pulmonar dañado a través del reclutamiento de células progenitoras (Heeschen *et al.*, 2003) y la estimulación de las propias células del epitelio (Sato *et al.*, 2006) mejorando su función.

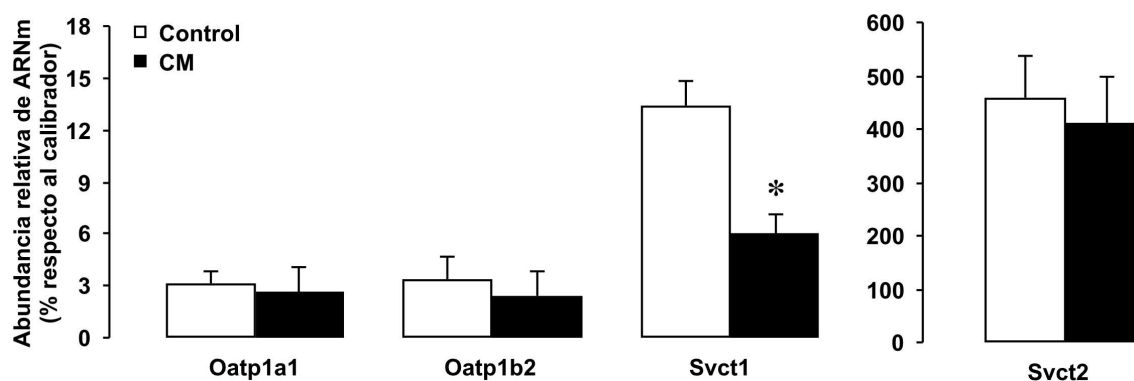
Por tanto, el aumento observado en la expresión de la Epo podría constituir, además, una respuesta al daño tisular asociado a la hipercolanemia materna durante la gestación.

#### **4.2.6. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión pulmonar de proteínas transportadoras y receptores nucleares**

Como hemos comentado anteriormente, durante los últimos años se ha descrito la presencia de varias proteínas de la familia ABC en el pulmón (Scheffer *et al.*, 2002), y se ha propuesto que estos transportadores podrían participar en la eliminación de compuestos potencialmente tóxicos de éste órgano. Por ello, como siguiente objetivo nos planteamos investigar si la colestasis materna tenía algún efecto sobre la expresión de proteínas transportadoras de ABs y lípidos biliares de membrana del pulmón, y receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs. El método elegido fue la cuantificación del ARNm de las proteínas por PCR cuantitativa a tiempo real.

En primer lugar, se determinó la abundancia relativa del ARNm de los transportadores de aniones orgánicos Oatp1a1 y Oatp1b2, que son dos de los principales transportadores de ABs en el hígado, y de vitamina C en el tejido pulmonar adulto, utilizando el hígado adulto como referencia, así como los cambios en los niveles de expresión de estos transportadores, presentes en la membrana de las células del epitelio pulmonar, tras una semana de colestasis.

Los niveles de expresión de las proteínas estudiadas fueron menores que los existentes en el tejido hepático, excepto en el caso de Svct2, 5 veces superiores al hígado (figura 34), lo que podría formar parte de los mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante del pulmón, muy expuesto a agresiones que inducen estrés oxidativo.



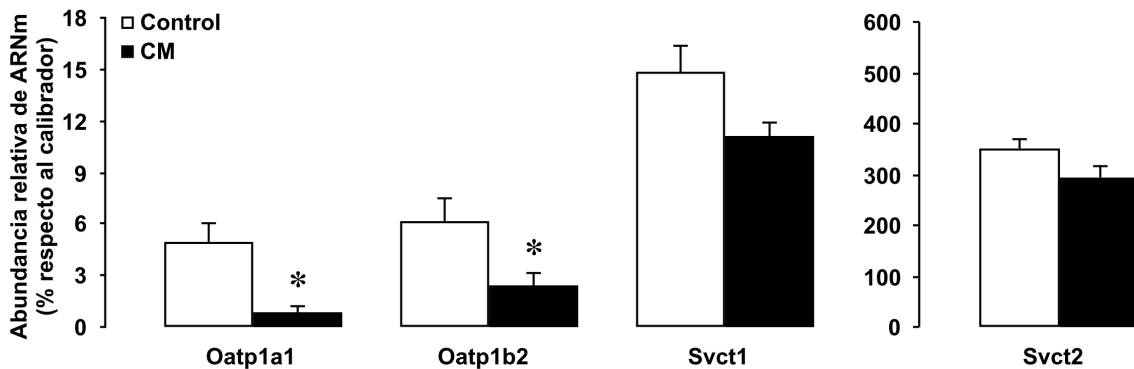
**Figura 34.** Niveles relativos de ARNm de transportadores de ABs y de vitamina C en pulmón de ratas gestantes a término controles (barras blancas) o con colestasis gestacional (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 6 ratas por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta, y normalizados por los valores de ARNm de Hprt-1. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

La colestasis materna no afectó a la expresión de ninguno de los transportadores estudiados en el tejido pulmonar de las ratas gestantes, salvo en el caso de Svct1, cuya expresión fue significativamente menor que en el grupo de las madres control. Este resultado podría indicar la existencia de una menor capacidad del tejido pulmonar para captar vitamina C, y por tanto una menor defensa frente a la agresión oxidativa asociada a la colestasis.

A pesar de los bajos niveles de ARNm de Svct1 detectados, dada la alta capacidad de transporte que posee, la caída en su expresión podría implicar un cambio importante en la capacidad del pulmón de realizar una eficiente captación de ácido ascórbico, pudiendo afectar a la capacidad defensiva contra el daño oxidativo o alterar las funciones que requieren vitamina C.

Los niveles de expresión de estos transportadores en el tejido fetal fueron similares a los del pulmón de las madres (figura 35). Observamos un descenso en los niveles de ARNm de todas las proteínas en el grupo de los fetos hijos de ratas colestáticas. La mayor caída se registró para los genes que codifican los transportadores Oatp1a1 y Oatp1b2. Se ha sugerido que la reducción en la expresión de los transportadores de aniones orgánicos representa una respuesta adaptativa al daño inducido por la colestasis que evita que se acumulen en las células aniones orgánicos (Gartung *et*

*al.*, 1997), aunque dada su baja expresión deben jugar un papel minoritario en su transporte en el pulmón.



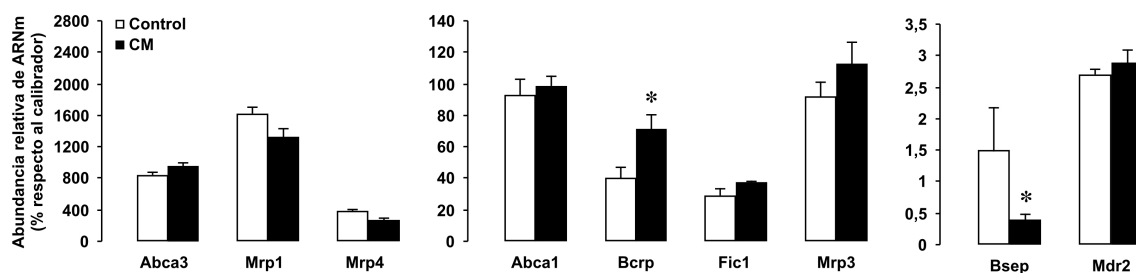
**Figura 35.** Niveles relativos de ARNm de transportadores de ABs y vitaminaC en pulmón de fetos a término controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 18 fetos por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Respecto a la abundancia del ARNm de los genes que codifican bombas exportadoras (figura 36), observamos que, coincidiendo con resultados de otros estudios (Scheffer *et al.*, 2002; Langmann *et al.*, 2003), el pulmón presenta una elevada expresión de varias proteínas ABC, destacando Mrp1, Mrp4 y Abca3, con niveles de ARNm más altos que en el tejido hepático.

Otros transportadores, como Abca1, Mrp3, Fic1 y Bcrp, presentan niveles de expresión similares a los detectados en el hígado. Sin embargo, encontramos que a diferencia del hígado, Bsep y Mdr2 apenas se expresaban en el tejido pulmonar, lo que sugiere que estos transportadores tengan, cuantitativamente, un papel poco relevante en el transporte a través de la membrana del epitelio alveolar.

No encontramos cambios significativos en los niveles de expresión de ninguna de las proteínas analizadas tras una semana de colestasis en el tejido materno, salvo en el caso de Bcrp, cuya expresión aumentó significativamente. Bsep sufrió una marcada caída en su expresión, aunque sus niveles en el grupo control eran ya muy bajos.

Estudios llevados a cabo en nuestro grupo sugieren que BCRP podría jugar un papel en la secreción de ABs a bilis, como una ruta alternativa a BSEP cuando la expresión de esta proteína y/o su función estuviesen disminuidas, como podría ser el caso de situaciones de colestasis en el pulmón. Este papel podría ser más relevante dada la elevada expresión de BCRP y la baja expresión de BSEP.



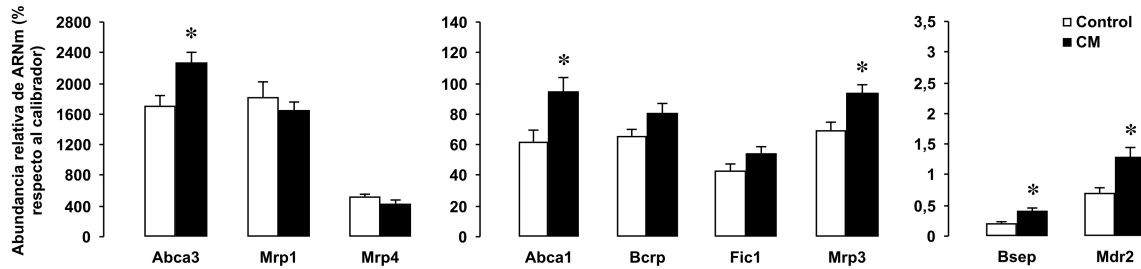
**Figura 36.** Niveles relativos de ARNm de proteínas ABC en pulmón de ratas gestantes a término controles (barras blancas) o con colestasis gestacional (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 6 ratas por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta y normalizados por los valores de ARNm de Hprt-1. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Cuando determinamos los niveles de expresión de las bombas de eflujo en el tejido pulmonar fetal (figura 37), encontramos valores similares a los determinados en el tejido adulto, pero al contrario de lo que vimos en las gestantes, la colestasis materna indujo cambios destacados en algunos genes. La expresión de Mrp1, Mrp4, Bcrp y Fic1 no presentaban diferencias estadísticamente significativas, aunque la de Bcrp y Fic1 mostró una tendencia a incrementarse en los fetos hijos de ratas colestáticas.

Sí encontramos un aumento significativo de la expresión de Abca1, Mrp3, Bsep y Mdr2, aunque los niveles de expresión determinados para el caso de Bsep y Mdr2 fueron muy bajos. Estos cambios son coherentes con los que se encuentran en otros tejidos en respuesta a la acumulación de ABs (Kullak-Ublick *et al.*, 2004), por lo que el incremento en la expresión de estas proteínas podría interpretarse como un mecanismo de defensa para evitar la acumulación de ABs en las células.

El cambio más llamativo fue un incremento marcado en la expresión del gen que codifica para Abca3, un transportador de fosfolípidos y colesterol esencial para la síntesis del surfactante pulmonar y, por tanto, para la función del pulmón. Además, los niveles de ARNm detectados duplicaban a los encontrados en el tejido pulmonar adulto. Estos resultados coinciden con otros estudios publicados en la bibliografía. Se ha descrito que la expresión de esta proteína ABC aumenta drásticamente antes del nacimiento (Yoshida *et al.*, 2004) y que, generalmente, se sobreexpresa cuando existe daño pulmonar (Stahlman *et al.*, 2007).

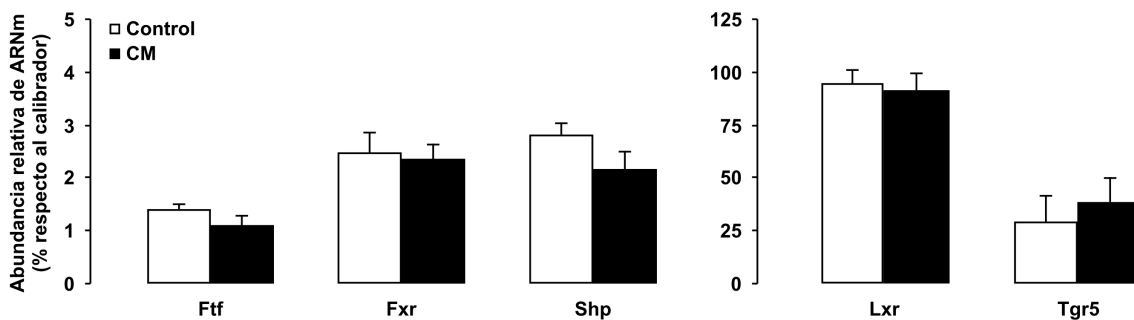




**Figura 37.** Niveles relativos de ARNm de proteínas ABC en pulmón de fetos a término controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 18 fetos por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

Los resultados obtenidos muestran una alteración en los sistemas de transporte de lípidos en el tejido fetal, de manera que es probable que la transferencia de lípidos hacia el espacio alveolar, necesaria para una correcta síntesis de surfactante, se encuentre afectada.

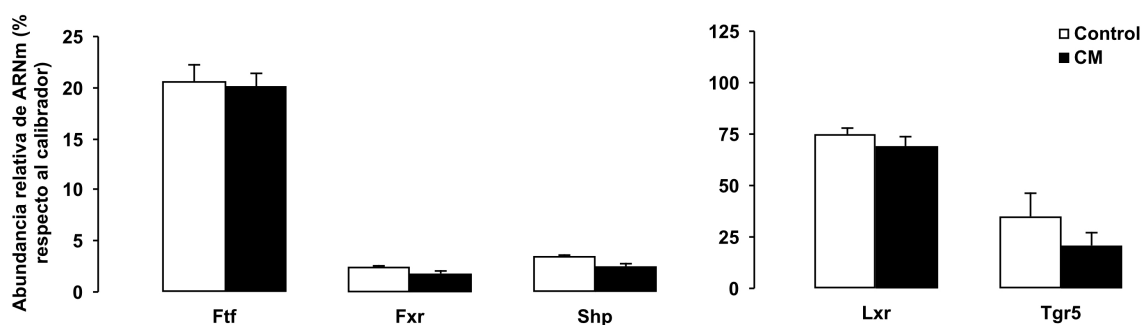
A continuación, se determinaron los niveles de ARNm de los principales receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs. La figura 38 muestra los niveles de ARNm de Ftf, Fxr, Shp, Lxr y Tgr5 en los dos grupos experimentales. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la abundancia del ARNm de ninguna de las proteínas estudiadas en el tejido pulmonar materno en respuesta a la colestasis.



**Figura 38.** Niveles relativos de ARNm de receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs en pulmón de ratas gestantes a término controles (barras blancas) o con colestasis gestacional (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 6 ratas por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta y normalizados por los valores de ARNm de Hprt-1. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test *t* de Student.

El patrón de expresión de estos receptores en el tejido fetal fue similar al encontrado en las madres (figura 39). Tampoco observamos cambios significativos en los niveles de ARNm de ninguno de ellos en el grupo de colestasis materna. Ftf presentaba

niveles mayores (aproximadamente 20 veces) que los encontrados en el pulmón materno, mientras que el resto de receptores tenía niveles similares al tejido adulto.



**Figura 39.** Niveles relativos de ARNm de receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs en pulmón de fetos a término controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 18 fetos por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a hígado de rata adulta. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test  $t$  de Student. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado.

Estos resultados confirman la presencia de transportadores de aniones orgánicos involucrados en el transporte de compuestos colefilicos en el pulmón, y de receptores nucleares y de membrana sensibles a ABs. Sin embargo, las alteraciones estructurales y la inflamación encontradas en colestasis no se acompañan de cambios en las proteínas transportadoras y receptores de ABs.

#### 4.2.7. Efecto de la colestasis materna sobre la expresión de la fosfolipasa A2-IIA

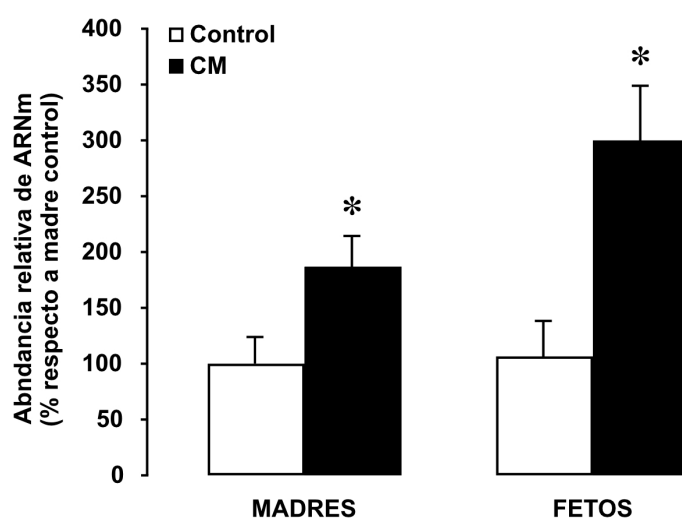
Como se ha comentado ampliamente en el apartado de introducción, se han propuesto varios mecanismos por los que los ABs podrían dañar el tejido pulmonar. Aunque no se ha demostrado, el que parece más probable es la alteración de la actividad de la enzima FLasa A2 en respuesta a elevados niveles de ABs en el alveolo, originando la depleción del surfactante.

Numerosos estudios han demostrado la implicación de la FLasa A2 en la patogenia del SDR (Grossmann *et al.*, 1999; Touqui *et al.*, 1999; Touqui *et al.*, 2003). Se han detectado elevados niveles de esta proteína en el LBA de estos pacientes (Kim *et al.*, 1995), que además parecen correlacionarse con la severidad del trastorno (Kitsioui *et al.*, 1999). Por otra parte, existe un aumento de lisofosfolípidos en el LBA que se ha atribuido a un incremento de la actividad de la enzima FLasa A2 (Holm *et al.*, 1989; Touqui *et al.*, 2003). Se ha podido demostrar que la mayor parte de la actividad FLasa A2 en el LBA de estos pacientes se debe a FLasas A2 dependientes de calcio (Nakos *et al.*, 2005). La FLasa A2 tipo IIA (FLasa A2-IIA) es la mas abundante de las

pertencientes a este grupo, por lo que decidimos centrar nuestro estudio en esta isoforma.

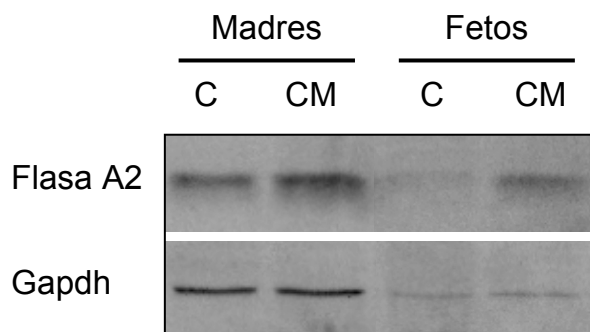
Utilizando el modelo experimental de colestasis obstructiva en ratas gestantes nos planteamos comprobar esta hipótesis, determinando la abundancia de esta enzima, implicada en la síntesis del surfactante en el tejido pulmonar, por PCR cuantitativa a tiempo real y Western blot.

En la figura 40 observamos que los niveles de FLasa A2-IIA en los fetos a término control eran iguales a los de las madres. La colestasis materna produjo un incremento estadísticamente significativo de la expresión del ARNm del gen de la FLasa A2-IIA tanto en las madres como en los fetos respecto a los niveles del tejido control. El incremento fue mayor en el tejido fetal, alcanzándose valores 3 veces superiores.



**Figura 40.** Niveles relativos de ARNm de la enzima FLasa A2-IIA en pulmón de ratas gestantes a término y sus fetos controles (barras blancas) o con colestasis materna (barras negras) determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores representan la media de 6 madres y 18 fetos por grupo  $\pm$  EEM expresados como porcentaje respecto a la expresión en las madres control. \*,  $p < 0,05$  comparando con el grupo control, mediante el test  $t$  de Student. Las muestras de cada grupo se analizaron por triplicado.

Estos cambios en los niveles del ARNm se reflejaron a nivel de proteína, como se observa en el análisis por Western blot de homogenados de pulmón materno y fetal obtenidos de animales control y con colestasis materna (figura 41).



**Figura 41.** Imagen representativa de la detección por Western blot de FLasa A2-IIA en homogenado de pulmón de ratas gestantes controles (calle 1), colestáticas (calle 2), fetos controles (calle 3) fetos con colestasis materna (calle 4). La detección se llevó a cabo usando el anticuerpo monoclonal M-18 frente a FLasa A2-IIA. Se cargaron 100  $\mu$ g de proteína/calle. Tamaño de la banda: aproximadamente 14 KDa. Los resultados se normalizaron en función del contenido de Gapdh de las muestras.

En el pulmón la FLasa A2-IIA es principalmente producida por los macrófagos donde se almacena en gránulos de secreción (Chock *et al.*, 1994), y es liberada al espacio alveolar cuando éstos son activados (Arbibe *et al.*, 1997; Nevalainen *et al.*, 2000), promoviendo la degradación del surfactante mediante la hidrólisis de los glicerofosfolípidos que lo constituyen (Touqui *et al.*, 1999; Nakos *et al.*, 2005), reduciendo así sus propiedades tensoactivas y participando en procesos inflamatorios a través de la formación de eicosanoides y otros mediadores de inflamación (Touqui *et al.*, 1999; Touqui *et al.*, 2003) como el factor activador de plaquetas (PAF) que puede causar broncoconstricción e incrementar la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inflamatorias, especialmente eosinófilos y neutrófilos (Evans *et al.*, 1987).

La expresión del gen de la FLasa A2-IIA es inducida por las IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  (Massaad *et al.*, 2000), a través de vías de señalización que implican al receptor nuclear PPAR $\gamma$ , e inhibida por los glicerofosfolípidos que forman parte del surfactante, fundamentalmente el fosfatidilglicerol (Berger *et al.*, 1999).

De acuerdo con estos estudios nuestros resultados muestran una activación del proceso inflamatorio en respuesta a la colestasis materna, con un aumento del número de neutrófilos (figura 25) y macrófagos (figura 26) en el pulmón, formación de edema (figuras 23 y 24), así como de la producción de IL-1 $\beta$  en el tejido materno, que justificarían el aumento de la expresión de la FLasa A2-IIA.

Por otra parte, la sobreexpresión de la FLasa A2-IIA podría ser un reflejo del aumento de su actividad enzimática, ya que el aumento de la hidrólisis del

fosfatidilglicerol, por el que la isoforma IIA de la FLasa A2 tiene preferencia (Lambeau *et al.*, 2008), supondría una menor inhibición de su expresión.

Se sabe que bajo determinadas condiciones, como la hipoxia, el edema, la concentración de calcio citosólico o cambios en el pH intracelular, no solo se modifica la secreción de FLasa A2 por las células, sino también su actividad enzimática.

Estudios recientes señalan que los ABs podrían incrementar la actividad de la FLasa A2-IIA (De Luca *et al.*, 2009), actuando como cofactores de la reacción catalizada por la enzima (Pan *et al.*, 2007), contribuyendo de esta manera al daño pulmonar. Por tanto la acumulación de ABs en el tejido pulmonar asociada a la hipercolanemia materna (figuras 21 y 22) podría ser responsable, al menos en parte, del aumento de actividad FLasa A2-IIA y de su expresión a través de la disminución de sus inhibidores.

Además se ha propuesto que el aumento de la actividad de FLasa A2 podría deberse al descenso en los niveles de la proteína del surfactante A (SP-A), un inhibidor de esta enzima (Hidi *et al.*, 1997; Chabot *et al.*, 2003). Existen datos en la bibliografía que demuestran una caída de los niveles de SP-A en el LBA de pacientes con SDR (Baker *et al.*, 1999), que podría deberse al aumento de macrófagos (Wright *et al.*, 1995; Bates *et al.*, 1996) y de neutrófilos activados (Ryan *et al.*, 1991) capaces de degradar esta proteína.

En este sentido, se ha comprobado que, en humanos, la expresión de la SP-A aumenta enormemente a lo largo del tercer trimestre de gestación (Pryhuber *et al.*, 1991), por lo que el mayor aumento de la expresión que observamos en el tejido pulmonar de los fetos del grupo CM (figura 40), podría estar relacionado con una menor cantidad de SP-A asociada a un retraso en la maduración pulmonar.

Estos resultados sugieren que la acumulación de ABs en el pulmón durante la colestasis materna podrían afectar a su estructura induciendo un respuesta inflamatoria, o bien favoreciendo la degradación del surfactante al inducir la expresión y actividad de la enzima FLA2-IIA, que puede afectar a la función pulmonar directamente hidrolizando los componentes del surfactante, o indirectamente a través de la producción de mediadores de inflamación.

### 4.3. Mecanismos de inducción de la expresión de MRP2 por cisplatino en células de cáncer de colon

El desarrollo de resistencia tumoral a fármacos citostáticos es una de las principales causas que comprometen el éxito de los tratamientos con quimioterapia (Marin *et al.*, 2009). Se estima que casi en el 50% de los pacientes con cáncer, los tumores son refractarios a los fármacos empleados y que la resistencia contribuye a más del 90% de los fracasos del tratamiento no quirúrgico y por tanto a la muerte por cáncer (Lum *et al.*, 1993).

La resistencia a la quimioterapia tiene un origen multifactorial en el que se engloban diferentes mecanismos (MOC de “mechanism of chemoresistance”) que han sido agrupados en cinco grupos (Marin *et al.*, 2010b) dependiendo de que impliquen cambios en la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de sustancias tóxicas (proteínas de captación catalogadas como MOC-Ia, o bombas de eflujo que se engloban en el MOC-Ib), cambios en proteínas celulares implicadas en procesos de detoxificación (MOC-II), disminución de la expresión de proteínas diana y aumento de la expresión de vías metabólicas alternativas (MOC-III), cambios en las moléculas que participan en la reparación del DNA (MOC-IV), cambios de expresión y/o presencia de mutaciones en genes proapoptóticos como p53 (MOC-Va) o antiapoptóticos (MOC-Vb) que determinan una alteración de las vías que controlan el balance apoptosis/supervivencia (MOC-V).

Uno de los mecanismos más importantes en la resistencia a la quimioterapia en células tumorales es la sobreexpresión de proteínas ABC (del inglés “ATP-binding cassette”) (Lage, 2003), que produce una reducción de la concentración celular de un fármaco a niveles menos tóxicos. Este mecanismo es especialmente importante en tumores hepáticos e intestinales, ya que en estos tejidos existe una alta expresión de proteínas ABC en células sanas, y es muy frecuente la sobreexpresión de estas proteínas en células tumorales derivadas de tejidos epiteliales situados en estos órganos (Minemura *et al.*, 1999).

La sobreexpresión de estas proteínas es responsable del fenotipo MDR (del inglés “multidrug resistance”), que se caracteriza por el desarrollo de resistencia de las células tumorales a un amplio espectro de fármacos, con diferente estructura y mecanismo de acción, tales como antraciclinas, vinblastina, paclitaxel, metotrexato, clorambucilo o cisplatino (Litman *et al.*, 2001; Szakacs *et al.*, 2006), para lo que no se requiere una exposición previa (Lage, 2003).

De los fármacos mencionados, el cisplatino es un compuesto antitumoral alquilante, cuyo efecto se basa en la reactividad del platino (II) con el ADN. El cisplatino y sus derivados, como el oxaliplatino, son de los compuestos más potentes y eficaces usados en monoterapia y terapia combinada con otros fármacos para el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos (Boulikas *et al.*, 2003), como el cáncer colorrectal, para el que la terapia combinada de derivados del platino con 5-fluoruracilo

y leucovorina constituye el tratamiento de elección en muchos casos, incrementando significativamente la supervivencia de estos pacientes.

Sin embargo, a pesar de que en este tipo de tumores se han alcanzado mayores porcentajes de éxito que en otros del tracto gastrointestinal, el desarrollo de resistencia a los fármacos citostáticos por las células tumorales constituye una importante limitación en la lucha contra este tipo de cáncer (Milacic *et al.*, 2008).

Numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años han demostrado que la resistencia a los fármacos derivados del platino se debe a la activación de varios de los mecanismos de resistencia descritos en el apartado de Introducción de esta Tesis Doctoral. Así, además de la sobreexpresión de las bombas de expulsión comentada anteriormente, fundamentalmente MRP2 (Cui *et al.*, 1999) y las proteínas de Wilson y Menkes (Komatsu *et al.*, 2000; Samimi *et al.*, 2003) se sabe que las células resistentes al cisplatino presentan una disminución en la expresión del transportador de cobre CTR1 (Monte, 2005), que constituye la principal ruta para la captación de cisplatino por las células (Ishida *et al.*, 2002). Además, el aumento de los niveles de glutatión, de la actividad GSH S-transferasa, de la mayor capacidad de las células tumorales para reparar más eficientemente los daños en el DNA, y los cambios en el control del balance supervivencia/apoptosis parecen estar relacionados con el aumento de resistencia al cisplatino (Marin *et al.*, 2010a)

De entre todos estos mecanismos, la sobreexpresión de MRP2 se considera uno de los más importantes en tumores enterohepáticos (Korita 2010, Hinoshita 2000). Su expresión está regulada en respuesta a numerosos xenobióticos, incluyendo el cisplatino (Kauffmann *et al.*, 1997), por una gran variedad de factores de transcripción, entre los que destaca NRF2 (Vollrath *et al.*, 2006) y diferentes miembros de la familia HNF (Qadri *et al.*, 2009). Varios receptores nucleares, como FXR, PXR y CAR se unen formando heterodímeros con RXR $\alpha$  a elementos de respuesta en el promotor del gen *ABCC2* (Kast *et al.*, 2002). Estos receptores nucleares son activados por compuestos endógenos, como los ABs en el caso de FXR, y por numerosos compuestos xenobióticos, como la rifampicina en el caso de PXR, o el fenobarbital en el de CAR. Por tanto, parece que la inducción de la expresión de MRP2 en respuesta a la activación de NRF2, PXR, CAR o FXR podría jugar un papel importante en la prevención de la acumulación de compuestos, potencialmente tóxicos, en el interior celular.

Por todo esto, nos planteamos como un objetivo parcial de esta Tesis investigar los efectos del cisplatino, elegido como modelo de compuesto citostático, sobre la expresión de MRP2, y caracterizar el mecanismo de regulación transcripcional del gen *ABCC2* en células de cáncer de colon.

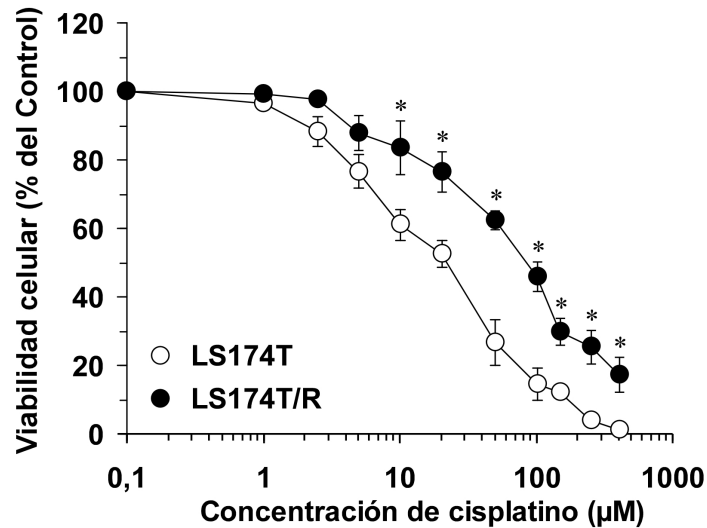
#### 4.3.1. Efecto del cisplatino en la expresión de bombas de eflujo en células de cáncer de colon

Se ha descrito un gran número de genes que pueden estar involucrados en el desarrollo de resistencia a fármacos antitumorales, pero uno de los mecanismos de quimiorresistencia mejor estudiados es el que incluye la expulsión de fármacos de la célula mediante proteínas transportadoras o bombas de eflujo (Linton, 2007). La mayoría de estas bombas de eflujo pertenecen a la superfamilia ABC. Sin embargo, existen otras proteínas que no son ABCs y que también tienen un papel destacado en la quimiorresistencia mediante expulsión de fármacos de la célula, como son las ATPasas de tipo P, ATP7A y ATP7B, y la proteína relacionada con la resistencia en cáncer de pulmón o LRP (Linton, 2007).

Por esta razón decidimos investigar, en primer lugar, la expresión de genes que codifican bombas de eflujo que podrían estar implicados en la resistencia al cisplatino en el cáncer de colon. Elegimos para ello dos líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano, LS174T y Caco-2, utilizadas previamente por numerosos grupos de investigación para el “screening” de fármacos antitumorales y la investigación de aspectos diversos de la biología tumoral e intestinal, como secreción de mucinas, interacciones celulares, efectos de la hipoxia sobre la síntesis de derivados del ácido siálico, etc. (van Klinken *et al.*, 1996; Calcagno *et al.*, 2005; Go *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2007). Se trata de dos tipos diferentes de células de cáncer de colon, Globet y enterocíticas, respectivamente, y por tanto con características fenotípicas distintas (Tom *et al.*, 1976; Jumarie *et al.*, 1991). Como línea celular resistente a cisplatino, se seleccionó la sublínea celular monoclonal LS174T/R, obtenida previamente en nuestro grupo mediante la doble selección por el método de la dilución límite de un clon parcialmente resistente al cisplatino. Este clon se seleccionó tras el cultivo de la línea celular silvestre en presencia de concentraciones crecientes de cisplatino, hasta 10  $\mu\text{M}$  (Briz *et al.*, 2003).

Las células LS174T/R eran capaces de soportar concentraciones más elevadas de cisplatino ( $\text{IC}_{50} = 82 \pm 19 \mu\text{M}$ ) que la línea salvaje de la que derivan, para la que la  $\text{IC}_{50}$  calculada fue de  $18 \pm 4 \mu\text{M}$  (figura 42).





**Figura 42.** Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de las células LS174T silvestres y resistentes expresada como porcentaje del control (células sin tratar). La cantidad de células se determinó por el test de formazán 72 h después de añadir el cisplatino. Los valores son media  $\pm$  EEM de al menos 3 cultivos realizados por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando células silvestres y resistentes mediante el test  $t$  de Student.

Para investigar el efecto de la exposición a cisplatino de las dos líneas celulares elegidas, analizamos mediante RT-PCRQ la expresión de una serie de genes que codifican para proteínas transportadoras de múltiples fármacos, la mayoría de ellas pertenecientes a la superfamilia ABC, así como dos ATPasas de tipo P, las denominadas proteínas de Wilson (ATP7B) y Menkes (ATP7A), y la LRP.

Las células se expusieron durante 72 h a una concentración de cisplatino próxima a la  $IC_{50}$ , que para las células Caco-2 era de  $24 \pm 5 \mu M$ , según se extrae de estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Vallejo *et al.*, 2007).

La determinación del perfil de expresión de estos transportadores en células LS174T (tabla 3) y Caco-2 (tabla 4) no tratadas, reveló elevados niveles de ARNm de las proteínas ATP7B y ABCA2 en ambas líneas celulares. También encontramos una expresión alta de LRP, lo que concuerda con los datos recogidos en la bibliografía, según los cuales esta proteína, relacionada con la quimiorresistencia, se sobreexpresa en cáncer de colon con respecto al tejido sano (Rybarova *et al.*, 2003). ATP7A, MDR1, MRP1 y MRP3 estaban muy expresadas en la línea celular LS174T, pero no en Caco-2, al contrario que MRP4, ABCA3, BCRP y MRP2, mucho más abundantes en las células Caco-2 que en las LS174T. El resto de genes analizados mostraron niveles de ARNm que consideramos medios o bajos en ambas líneas celulares.

La exposición de las células LS174T a una concentración de cisplatino de  $20 \mu M$  durante 72 horas indujo la sobreexpresión de la mayoría de los transportadores estudiados, siendo mayor este incremento en el caso de BCRP, LRP y varios miembros de la familia MRP (MRP1, 2, 3, 6 y 7) (tabla 3), para los que se observó un

aumento que variaba entre 4 y 12 veces, respecto a las células no tratadas con cisplatino. Sin embargo, encontramos una marcada caída de los niveles de ARNm de otras proteínas, principalmente ABCA8, cuya expresión fue 22 veces menor a la encontrada en las células no tratadas.

**Tabla 3.** Efecto del cisplatino sobre la expresión de transportadores relacionados con quimiorresistencia en células LS174T.

| Nivel de expresión | Transportador |               | $\Delta$ Ct<br>LS174T<br>silvestres | Nº de veces vs LS174T silvestres |             |                       |
|--------------------|---------------|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------|-----------------------|
|                    | Proteína      | Gen           |                                     | LS174T +<br>cisplatino           | LS174T/R    | LS174T/R <sub>e</sub> |
| Alto               | Wilson        | <i>ATP7B</i>  | 4,2 ± 0,8                           | ↑ (× 2)                          | ↑↑ (× 7)    | ↑↑ (× 7)              |
|                    | MRP1          | <i>ABCC1</i>  | 4,4 ± 0,9                           | ↑↑ (× 4)                         | ↑↑ (× 5)    | ↑↑ (× 6)              |
|                    | ABCA2         | <i>ABCA2</i>  | 4,5 ± 0,6                           | ≈1                               | ≈1          | ↓ (× 2)               |
|                    | MDR1          | <i>ABCB1</i>  | 4,8 ± 0,9                           | ↑ (× 2)                          | ↑ (× 2)     | ↑ (× 3)               |
|                    | Menkes        | <i>ATP7A</i>  | 5,2 ± 1,0                           | ↑ (× 2)                          | ≈1          | ≈1                    |
|                    | LRP           | <i>MVP</i>    | 5,3 ± 0,7                           | ↑↑ (× 7)                         | ↑ (× 2)     | ↑ (× 2)               |
|                    | MRP3          | <i>ABCC3</i>  | 5,5 ± 0,9                           | ↑↑ (× 5)                         | ↑↑ (× 9)    | ↑↑↑ (× 13)            |
| Medio              | MRP6          | <i>ABCC6</i>  | 6,0 ± 0,9                           | ↑↑ (× 4)                         | ↑↑ (× 5)    | ↑↑ (× 8)              |
|                    | MRP2          | <i>ABCC2</i>  | 6,1 ± 1,2                           | ↑↑ (× 4)                         | ↑↑↑ (× 353) | ↑↑↑ (× 494)           |
|                    | ABCA8         | <i>ABCA8</i>  | 6,2 ± 0,8                           | ↓↓↓ (× 22)                       | ↓↓↓ (× 20)  | ↓↓↓ (× 170)           |
|                    | MRP5          | <i>ABCC5</i>  | 6,2 ± 1,0                           | ↑ (× 2)                          | ↑ (× 2)     | ↑ (× 3)               |
|                    | MDR3          | <i>ABCB4</i>  | 6,7 ± 0,7                           | ≈1                               | ↑ (× 3)     | ↑↑ (× 4)              |
|                    | MRP7          | <i>ABCC10</i> | 6,8 ± 2,7                           | ↑↑ (× 6)                         | ↑ (× 2)     | ↑ (× 2)               |
|                    | ABCA3         | <i>ABCA3</i>  | 7,2 ± 1,2                           | ≈1                               | ↓ (× 2)     | ↓↓ (× 9)              |
| Bajo               | MRP4          | <i>ABCC4</i>  | 9,2 ± 0,4                           | ≈1                               | ↑↑ (× 9)    | ↑↑↑ (× 13)            |
|                    | MRP8          | <i>ABCC11</i> | 9,4 ± 1,6                           | ↓ (× 2)                          | ↓↓ (× 8)    | ↓↓↓ (× 27)            |
|                    | BCRP          | <i>ABCG2</i>  | 11,5 ± 2,3                          | ↑↑↑ (× 12)                       | ↑↑↑ (× 196) | ↑↑↑ (× 279)           |
|                    | BSEP          | <i>ABCB11</i> | 11,5 ± 1,6                          | ↓ (× 3)                          | ↓↓ (× 6)    | ↓↓ (× 8)              |
|                    | ABCA6         | <i>ABCA6</i>  | 12,0 ± 1,0                          | ≈1                               | ↓ (× 2)     | ↓ (× 2)               |

Niveles relativos de ARNm en células LS174T silvestres, resistentes (LS174T/R), resistentes estimuladas (LS174T/R<sub>e</sub>) y silvestres tratadas con cisplatino 20  $\mu$ M durante 72 h, determinados por RT-PCRQ. El cálculo de  $\Delta$ Ct se realizó por diferencia entre el Ct de cada uno de los genes y el Ct del normalizador GAPDH que fue 21,5 ± 0,7. Los valores representan la media ± EEM de al menos 3 cultivos. Los genes se clasificaron considerando un nivel alto cuando  $\Delta$ Ct < 6,0; medio, cuando  $\Delta$ Ct se encuentra entre 6,0 y 9,0; y bajo si  $\Delta$ Ct > 9,0. Las variaciones en la cantidad de ARNm se calculó con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en la que  $\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre el  $\Delta$ Ct de ese gen determinado y  $\Delta$ Ct en hígado humano, usado como calibrador. Símbolos que indican cambios en la expresión: ↑ o ↓, baja; ↑↑ o ↓↓, alta; ↑↑↑ o ↓↓↓, muy alta. ≈1, no es un cambio significativo (menor de 1,5 veces).

En la tabla 4 se recogen los resultados del tratamiento de las células Caco-2 con una concentración de cisplatino de 25  $\mu$ M durante 72 h. En esta línea celular no aparecieron cambios tan llamativos en los niveles de expresión de estas proteínas, como ocurría con las LS174T. ABCG2 y ABCC3 fueron una excepción en este grupo, con un sensible aumento de expresión en respuesta al cisplatino. ABCA8, ABCB4 y BSEP, cuyos niveles en la línea celular salvaje eran muy bajos, sufrieron una marcada

caída en su expresión de manera que tras el tratamiento con el cisplatino los niveles de ABCB4 y BSEP eran prácticamente indetectables.

La respuesta del gen *ABCC2* al cisplatino en las células Caco-2 fue mucho menor que la detectada en las células LS174T, con un ligero aumento de apenas 2 veces en su nivel de expresión.

**Tabla 4.** Expresión de transportadores relacionados con quimiorresistencia en células LS174T.

| Nivel de expresión | Transportador |               | $\Delta$ Ct<br>Caco-2 | Nº de veces vs<br>Caco-2<br>Caco-2 +<br>cisplatino |
|--------------------|---------------|---------------|-----------------------|--|
|                    | Proteína      | Gen           |                       |  |
| Alto               | MRP2          | <i>ABCC2</i>  | 3,2 ± 0,3             | ↑ (× 2)  |
|                    | Wilson        | <i>ATP7B</i>  | 3,6 ± 0,3             | ≈1   |
|                    | MRP4          | <i>ABCC4</i>  | 4,6 ± 0,6             | ↓ (× 2)  |
|                    | ABCA3         | <i>ABCA3</i>  | 5,3 ± 1,4             | ↓ (× 3)  |
|                    | LRP           | <i>MVP</i>    | 5,4 ± 0,1             | ≈1   |
|                    | BCRP          | <i>ABCG2</i>  | 5,8 ± 1,2             | ↑↑ (× 9)   |
|                    | ABCA2         | <i>ABCA2</i>  | 5,9 ± 1,1             | ≈1   |
| Medio              | MRP3          | <i>ABCC3</i>  | 6,9 ± 0,2             | ↑↑ (× 4)   |
|                    | MRP1          | <i>ABCC1</i>  | 7,0 ± 0,1             | ↑ (× 3)  |
|                    | MRP5          | <i>ABCC5</i>  | 7,0 ± 0,2             | ↑ (× 3)  |
|                    | MRP6          | <i>ABCC6</i>  | 8,2 ± 1,0             | ↑ (× 2)  |
|                    | MDR1          | <i>ABCB1</i>  | 8,6 ± 0,7             | ↑ (× 2)  |
|                    | Menkes        | <i>ATP7A</i>  | 8,7 ± 0,1             | ≈1   |
| Bajo               | ABCA6         | <i>ABCA6</i>  | 9,1 ± 0,4             | ↓ (× 2)  |
|                    | MRP7          | <i>ABCC10</i> | 10,4 ± 0,1            | ≈1   |
|                    | ABCA8         | <i>ABCA8</i>  | 12,1 ± 0,8            | ↓↓↓ (× 21)   |
|                    | MRP8          | <i>ABCC11</i> | 12,4 ± 0,1            | ≈1   |
|                    | MDR3          | <i>ABCB4</i>  | 13,7 ± 1,7            | ↓↓↓ (ND)   |
|                    | BSEP          | <i>ABCB11</i> | 16,6 ± 3,1            | ↓↓↓ (ND)   |

Niveles relativos de ARNm en células Caco-2 tratadas con cisplatino 25  $\mu$ M durante 72 h, determinados por RT-PCRQ. El cálculo de  $\Delta$ Ct se realizó por diferencia entre el Ct de cada uno de los genes y el Ct del normalizador GAPDH que fue  $20,4 \pm 1,1$ . Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos 3 cultivos. Los genes se clasificaron considerando un nivel alto cuando  $\Delta$ Ct < 6,0; medio, cuando  $\Delta$ Ct se encuentra entre 6,0 y 9,0; y bajo si  $\Delta$ Ct > 9,0. Las variaciones en la cantidad de ARNm se calculó con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en la que  $\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre el  $\Delta$ Ct de ese gen determinado y  $\Delta$ Ct en hígado humano, usado como calibrador. Símbolos que indican cambios en la expresión: ↑ o ↓, baja; ↑↑ o ↓↓, alta; ↑↑↑ o ↓↓↓, muy alta. ≈1, no es un cambio significativo (menor de 1,5 veces).

Para determinar el efecto de una exposición más larga al cisplatino se realizaron experimentos similares utilizando las células LS174T/R.

Los cambios en el perfil de expresión de los genes seleccionados en las células LS174T/R fueron similares, aunque de mayor magnitud que los observados tras la exposición a cisplatino durante 72 h de la línea celular silvestre (tabla 3). Llama la atención la sobreexpresión de MRP2, alcanzando niveles 353 veces superiores a los encontrados en las células silvestres, y BCRP, con un aumento de 196 veces respecto a las células LS174T, aunque hay que decir que, en este caso, los niveles de ARNm en la línea celular silvestre apenas eran detectables. Otras bombas de eflujo también sufrieron aumentos significativos en sus niveles de expresión, aunque menores al observado para MRP2, como fue el caso de MRP1, MRP3, MRP4 y MRP6, coincidiendo con estudios de otros autores que indican una inducción de la expresión de las bombas MRP3 y MRP4 por cisplatino (Wakamatsu *et al.*, 2007).

Se sabe que tanto MRP2 (Cui *et al.*, 1999) como MRP6 (Belinsky *et al.*, 2002) transportan cisplatino, por lo que el incremento en la expresión de estas proteínas constituye un mecanismo de defensa de las células tumorales frente al fármaco que evita su acumulación en el interior celular. Sin embargo, parece que el papel de MRP6 en la resistencia es poco importante (Bergen *et al.*, 2007).

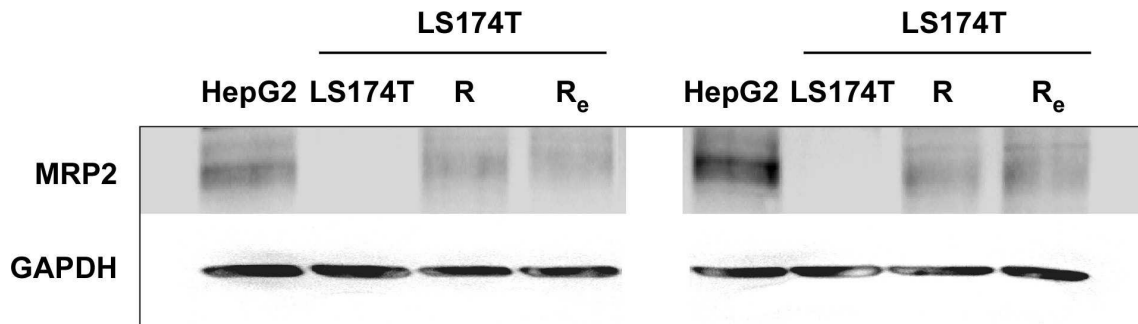
Por el contrario, observamos una caída en los niveles de ARNm de todos los miembros de la subfamilia ABCA estudiados, especialmente ABCA8, así como de otros transportadores como MRP8 y BSEP, cuyos niveles de expresión eran ya muy bajos en la línea celular silvestre.

Cuando la sublínea parcialmente resistente a cisplatino era cultivada de forma continuada en presencia de cisplatino (10  $\mu$ M) con objeto de mantener estimulados los mecanismos de quimiorresistencia (grupo experimental al que denominamos LS174T/R<sub>e</sub>) los cambios de expresión observados en las células LS174T/R se incrementaron aún más, encontrando, como cambios más llamativos, una caída de 170 veces en la expresión de ABCA8, y un aumento de 494 veces en el caso de MRP2 respecto a las células silvestres (tabla 3).

La tendencia general, por tanto, fue un aumento en los niveles de expresión de los genes seleccionados, lo que concuerda con una posible aparición de quimiorresistencia al cisplatino debido a un aumento de los transportadores que disminuirían la concentración intracelular del compuesto, al favorecer la salida de este fármaco de la célula.

Con el objeto de comprobar si los cambios en los niveles de ARNm de MRP2 encontrados en las células se traducían en una mayor expresión de la proteína, se determinó la abundancia del transportador por western blot. La figura 43 muestra una imagen representativa de la detección de MRP2 en dos cultivos diferentes de células LS174T), LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub>. Se usó como referencia lisado de células HepG2, ya que esta proteína está muy expresada en esta línea celular.

Como puede verse en la figura, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis por RT-PCRQ, los niveles de MRP2 en las células parcialmente resistentes al cisplatino eran significativamente superiores a los encontrados en la línea celular silvestre, donde apenas pudimos detectar esta proteína, a pesar de que los niveles de ARNm encontrados por RT-PCR no eran bajos (tabla 3).



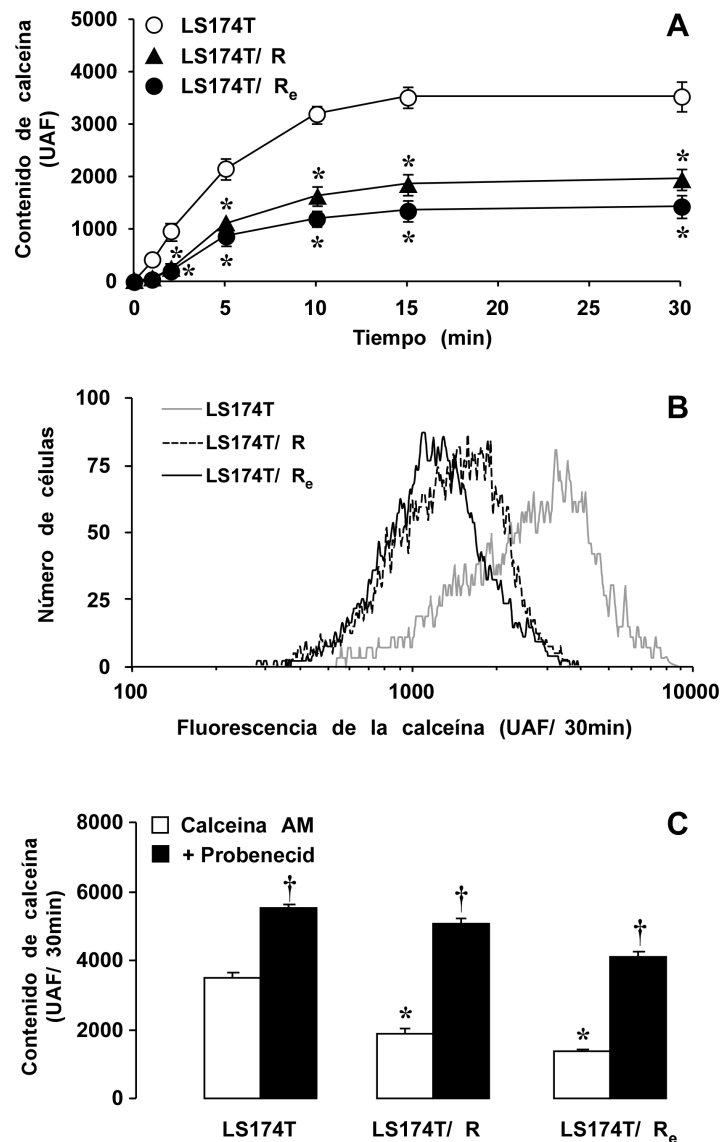
**Figura 43.** Imagen representativa de la detección por Western blot de MRP2 en lisado de células HepG2 (calle1) incluidas como control positivo, LS174T (calle 2), LS174T/R (calle 3) y LS174T/R<sub>e</sub> (calle 4). La detección se llevó a cabo usando el anticuerpo monoclonal M<sub>2</sub>III-6 frente a MRP2, en dos cultivos celulares diferentes. Se cargaron 100 µg de proteína/calle. Tamaño de la banda aproximado: 190 KDa. Se determinó el contenido de GAPDH de las muestras como normalizador de la carga de proteínas.

La sobreexpresión de varias MRPs observada tras el tratamiento con cisplatino, especialmente de MRP2 en la sublínea parcialmente resistente al cisplatino, hizo que nos planteásemos evaluar la funcionalidad de las proteínas de la subfamilia MRP en las células LS174T. Para ello se llevaron a cabo experimentos de acumulación de calceína AM, un derivado esterificado no fluorescente de calceína, capaz de atravesar la membrana plasmática por difusión simple. Tras su entrada en la célula es rápidamente convertida, mediante la acción de las esterasas intracelulares, en calceína, un sustrato fluorescente de los transportadores MRPs cuya acumulación intracelular puede determinarse mediante citometría de flujo (figura 44).

El análisis de la capacidad de acumulación de calceína a lo largo del tiempo en las líneas celulares LS174T, LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> (figura 44A) mostró cómo ésta fue significativamente inferior en las células LS174T/R respecto a las células silvestres, y aún menor en las células LS174T/R<sub>e</sub>, lo que era consistente con la mayor expresión de proteínas MRPs encontrada en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub>. La figura 44B muestra el histograma de frecuencia representativo de la fluorescencia de la calceína en células LS174T, LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> tras 30 min de incubación con la calceína AM. Se observa un desplazamiento hacia la izquierda del histograma de fluorescencia de las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> con respecto a las células silvestres.

Para confirmar los resultados obtenidos en estos experimentos y comprobar que la menor acumulación de calceína en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> era debida a la

actividad de las proteínas MRPs que habíamos encontrado sobreexpresadas en estas líneas celulares, se realizaron estudios de acumulación celular de calceína en presencia de probenecid, un conocido inhibidor de MRPs. La figura 44C muestra los resultados obtenidos al determinar la calceína acumulada en cada tipo celular tras incubarse las células en presencia de calceína-AM y probenecid, durante 15 min.



**Figura 44.** (A) Evolución temporal de la acumulación intracelular de calceína durante 30 min por las líneas celulares LS174T (círculos blancos), LS174T/R (triángulos negros) y LS174T/R<sub>e</sub> (círculos negros). Las células fueron incubadas en presencia de calceína-AM 1  $\mu$ M y 50  $\mu$ g/ml de ioduro de propidio (IP) a 37°C durante el tiempo correspondiente. (B) Histograma representativo de frecuencia de la fluorescencia de la calceína tras 30 min de incubación con calceína-AM a 37°C. (C) Efecto del probenecid sobre la acumulación intracelular de calceína. Los valores representan la intensidad de fluorescencia media calculada tras incubarse las células con calceína-AM 1  $\mu$ M y 50  $\mu$ g/ml de IP en presencia o ausencia de probenecid 500  $\mu$ M a 37°C durante 30 min. Las células teñidas con IP fueron excluidas del análisis. \*,  $p < 0,05$  comparando con células LS174T. †,  $p < 0,05$ , comparando con células incubadas en ausencia del inhibidor. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de tres cultivos llevados a cabo por triplicado.



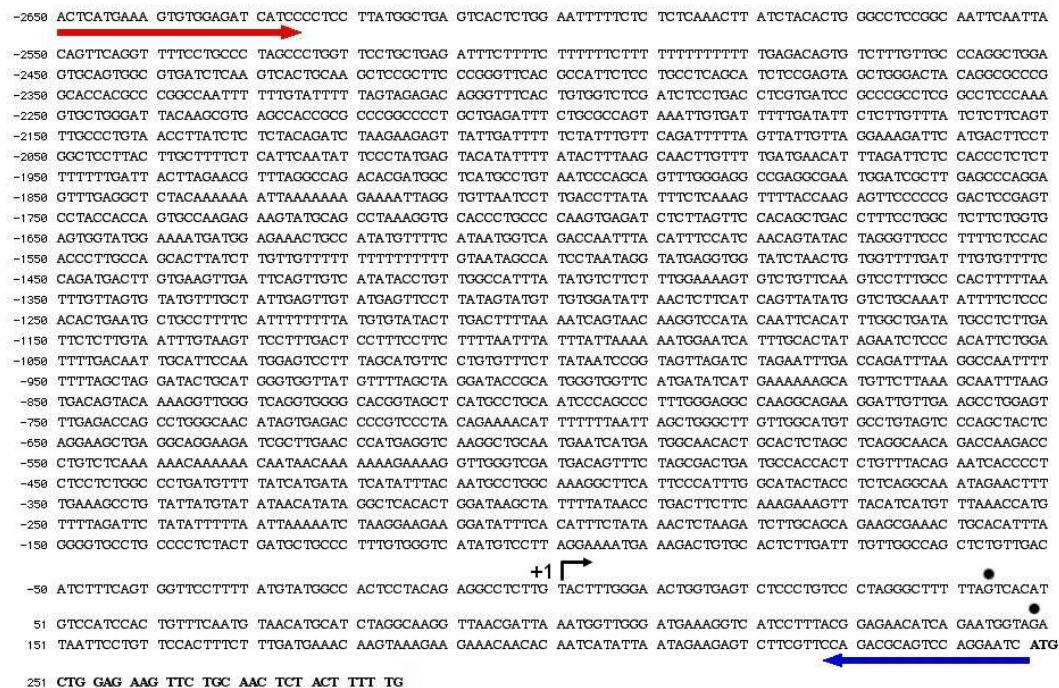
Se puede observar cómo la presencia del inhibidor en el medio de incubación aumentó la acumulación de calceína en las tres líneas celulares, siendo ésta sensiblemente mayor en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> que en las células silvestres.

Teniendo en cuenta estos resultados podemos sugerir que las proteínas MRPs sobreexpresadas en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub>, y especialmente MRP2, podrían contribuir de manera activa al fenómeno de resistencia a los fármacos antitumorales que puedan ser sustratos suyos, mediante la expulsión de los mismos al medio extracelular.

#### 4.3.2. Determinación de la actividad del promotor de MRP2

El siguiente paso en este estudio fue investigar los mecanismos responsables del aumento de expresión de MRP2 en células tumorales que se producía por exposición al cisplatino.

En una primera etapa, clonamos el promotor de MRP2, para lo que elegimos una región del gen *ABCC2* suficientemente grande para que pudiese incluir al promotor. Se decidió clonar la secuencia completa descrita en la base de datos "Entrez Nucleotide Database" como AF144630 (figura 45).



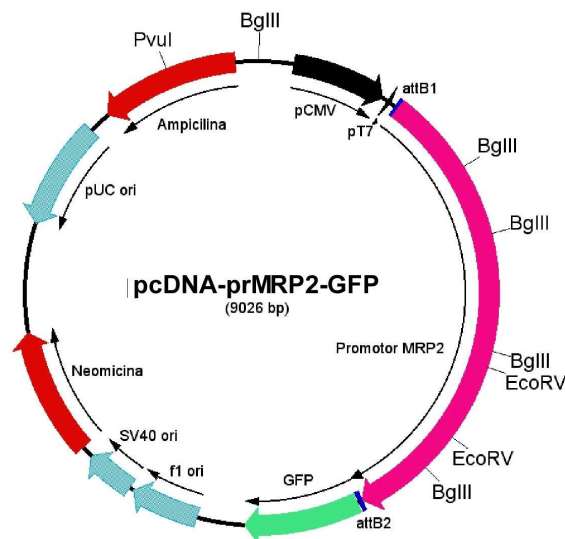
**Figura 45.** Secuencia de nucleótidos del promotor del gen *ABCC2* humano desde el nucleótido -2650 hasta el +248, publicada en la base de datos GenBank con el número de acceso AF144630. La flecha colocada en la posición +1 indica el lugar más común de inicio de la transcripción y los puntos, sitios alternativos de inicio de la transcripción. La secuencia final en negrita hace referencia al primer exón del gen. Las flechas en rojo y en azul indican la posición y dirección de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR de la secuencia.

El fragmento constituido por los primeros 248 pares de bases hacia el extremo 3' debajo del punto inicio de la transcripción fue incluido en la construcción, ya que existen indicios de que una delección de la región +81 a +248 puede causar un acusado descenso de la actividad del promotor de esta proteína (Tanaka *et al.*, 1999; Zhang *et al.*). Para simplificar la nomenclatura, la zona comprendida entre las posiciones -2650 y +248 de la secuencia AF144630 recibirá en este trabajo el nombre de promotor de MRP2.

El método elegido para la construcción de los vectores de expresión fue la tecnología Gateway, que, como ya hemos comentado en el apartado 3.10 de Material y Métodos, se basa en el sistema de recombinación del fago lambda, y presenta numerosas ventajas con respecto a los procedimientos tradicionales de clonación con enzimas de restricción y ligasas (Hartley *et al.*, 2000).

En el vector de expresión que diseñamos se contemplaba incluir en serie la secuencia del promotor de MRP2 y la ORF de un gen "reporter" que nos permitiera medir la respuesta de activación del promotor de MRP2. Por ello, elegimos como vector de destino el pDEST47, que porta en su secuencia la ORF de la proteína verde fluorescente (GFP).

Así, en una primera aproximación, se construyó un vector de expresión en el que el promotor de MRP2 (prMRP2) se encontraba en fase con la ORF de la GFP (figura 46). Con el fin de determinar la actividad transcripcional del promotor del gen *ABCC2*, tras poner a punto las condiciones óptimas de transfección, se realizaron experimentos de citometría de flujo con células LS174T y LS174T/R<sub>e</sub>, 72 h después de ser transfectadas con dicha construcción.



**Figura 46.** Esquema del vector pcDNA-prMRP2-GFP, que contenía prMRP2 (en magenta) en fase con la ORF del gen de la GFP (en verde). En negrita aparecen los nombres y los puntos de corte de las enzimas seleccionadas para realizar el estudio de restricción de este vector.



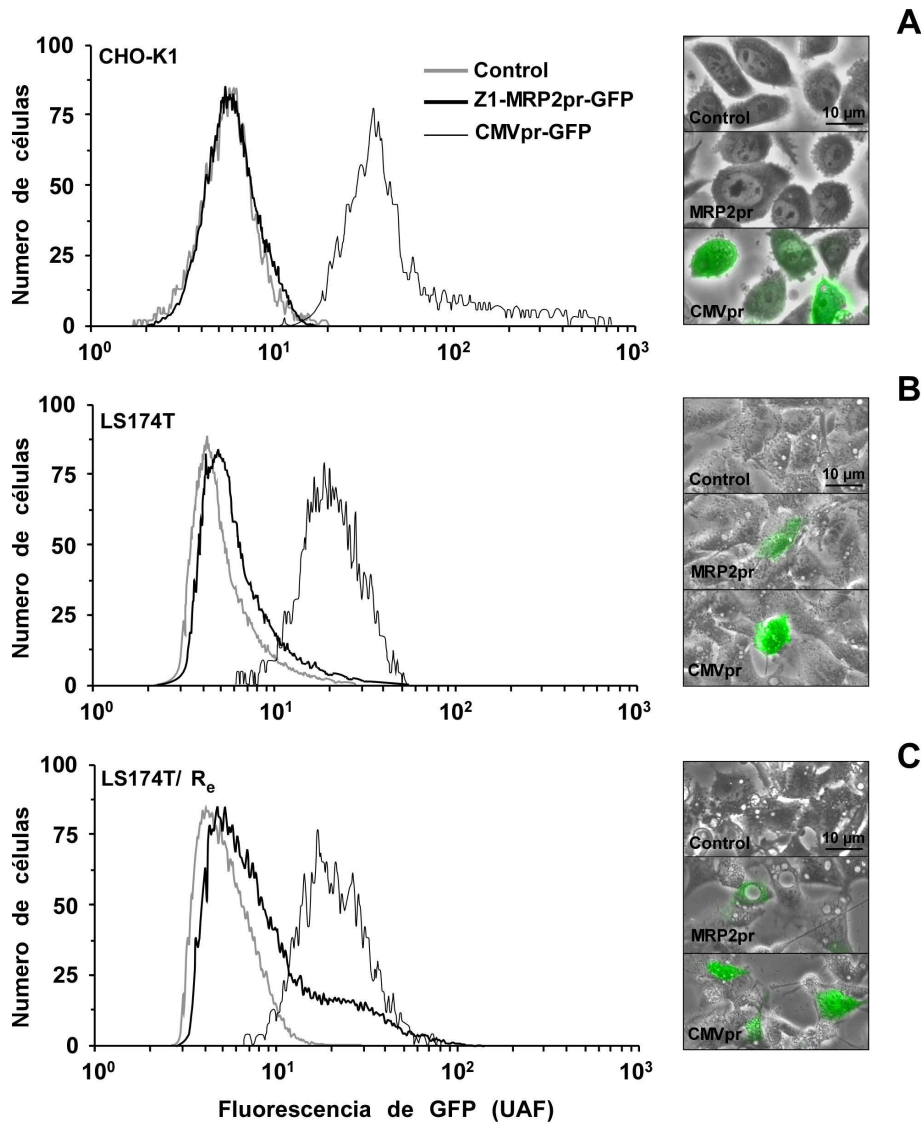
Se utilizó además, como control negativo, un vector vacío (pcDNA3.1/Hygro(+)), y como control positivo un plásmido en el que la expresión de GFP se encontraba controlada por el promotor CMV (pcDNA-GW47-CAT).

También se transfectaron células CHO-K1, de ovario de hámster chino, usadas como control negativo de la expresión de GFP regulada por prMRP2, puesto que esta línea celular no expresa MRP2.

Como puede verse en la figura 47, los resultados que obtuvimos permitían observar un marcado desplazamiento en el histograma de fluorescencia de las células transfectadas con el control positivo, con respecto a las transfectadas con el vector control negativo. Este desplazamiento era mayor en las células CHO-K1, probablemente debido a la mayor eficacia de transfección conseguida en estas células, recomendadas en los protocolos de expresión transitoria, por esta característica.

Cuando las células LS174T fueron transfectadas con el vector en el que la expresión de GFP estaba controlada por el promotor de MRP2, los histogramas obtenidos por citometría de flujo mostraban un débil desplazamiento en las curvas de fluorescencia (figura 47B), ligeramente mayor en las células de la sublínea LS174T/R<sub>e</sub> (figura 47C). Las células CHO-K1 transfectadas con el vector prMRP2-GFP no eran fluorescentes (figura 47A), lo que es consistente con la ausencia de expresión de MRP2 en esta línea celular que, por tanto, carece de la maquinaria intracelular necesaria para la transcripción del gen ABCC2.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, en los que la expresión de luciferasa controlada por el promotor de MRP2 humana en células de cáncer de ovario y cáncer epidermoide era muy débil, al contrario que en células de origen hepático como las HepG2, con una elevada expresión del transportador (Tanaka *et al.*, 1999).



**Figura 47.** Histogramas de fluorescencia representativos obtenidos por citometría de flujo de células CHO-K1 (A), LS174T (B) y LS174T/Re (C) transfectadas con el vector pcDNA-GW47-CAT (CMV-prGFP) usado como control positivo de la expresión de GFP, el vector vacío pcDNA3.1/Hygro(+) (control) o pcDNA-prMRP2-GFP. Imágenes representativas de las células transfectadas con los diferentes vectores obtenidas por solapamiento de fotografías de contraste de fase y de fluorescencia.

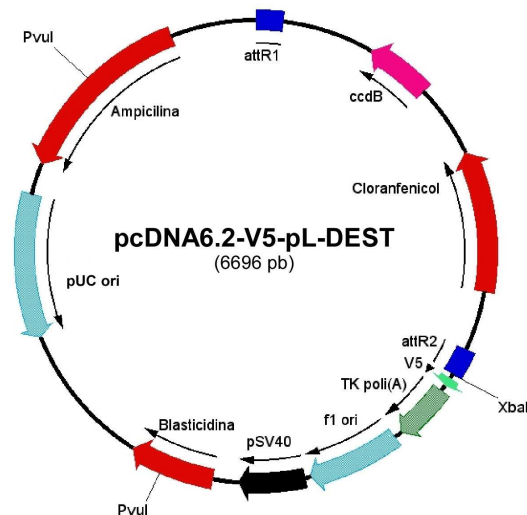
Estos resultados sugieren que la transfección de células LS174T con el vector de expresión pcDNA-prMRP2-GFP permite medir la actividad del promotor de MRP2 mediante el aumento de fluorescencia celular debido a la proteína GFP por citometría de flujo. Sin embargo, la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida fue baja y no permite distinguir pequeños cambios en la señal emitida. Por lo tanto, para poder investigar cambios más pequeños en la activación del promotor de MRP2 por agentes citostáticos, en este modelo experimental, es necesario utilizar un gen “reporter” cuya expresión pueda ser determinada por un método más sensible.

Por ello, nuestro siguiente objetivo fue clonar el promotor de MRP2 en un vector que tuviera el gen de luciferasa de luciérnaga como gen “reporter” (Luc2), de manera que pudiéramos medir la respuesta de activación del promotor de MRP2, mediante el aumento de actividad de esta enzima, por luminometría (figura 50A).

Para poder abordar este objetivo usamos una variante de la tecnología Gateway denominada “Multisite Gateway”, que como ya hemos explicado en el apartado 3.10.1 de Material y Métodos, permite clonar, direccionalmente, varios fragmentos de ADN en un mismo vector de destino.

Para clonar promotores y estudiar su actividad se recomienda el uso de un vector de destino que carezca de otros promotores que controlen su actividad, o la expresión del gen “reporter” elegido. Por tanto, el primer paso era obtener un vector de destino con estas características, para lo que decidimos modificar el vector comercial pcDNA6.2 V5 DEST, eliminando los promotores CMV y T7 que contenía en su secuencia.

Se amplificó por PCR toda la secuencia del plásmido comercial, a excepción de la correspondiente a los promotores a eliminar, usando para ello oligonucleótidos a los que se había añadido en los extremos una secuencia de corte para una enzima de restricción que permitiera, tras la amplificación del fragmento deseado, generar extremos 5' extendidos cohesivos, y el cierre posterior, mediante el uso de una ligasa, de la hebra de DNA, generando así el vector de destino deseado (figura 48).

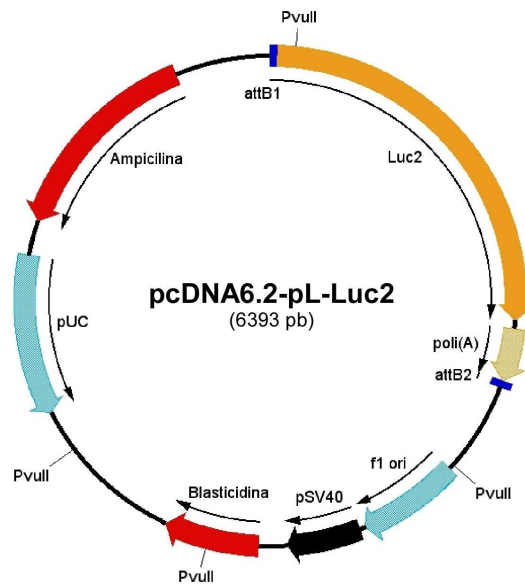


**Figura 48.** Esquema del vector pcDNA6.2-V5-pL-DEST. En negrita aparecen los nombres y los puntos de corte de las enzimas seleccionadas para realizar el estudio de restricción de este vector.

Para estudiar la respuesta de actividad del prMRP2 clonado mediante un aumento de la expresión del gen “reporter” Luc2 se necesitaba, además, otro vector de expresión

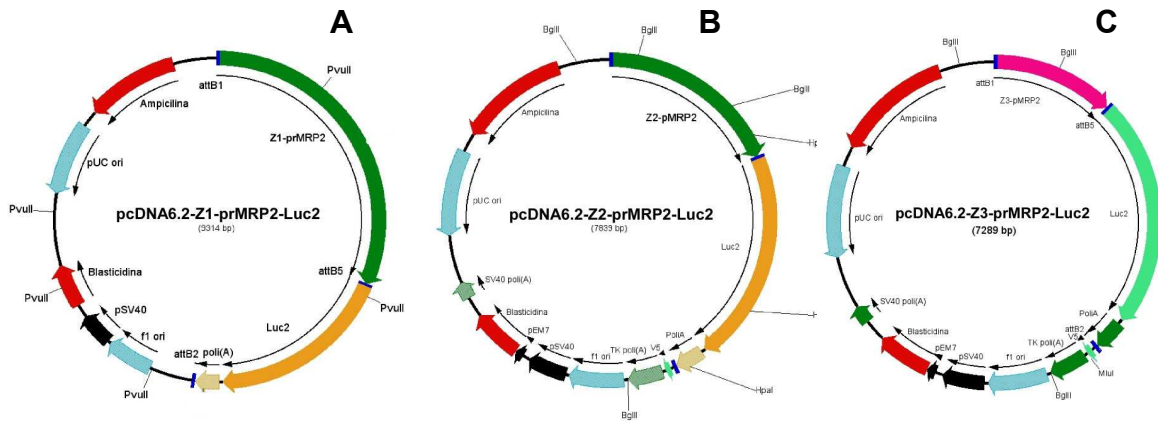
que sirviera de control negativo de la expresión inespecífica de luciferasa en las células en las que se transfectará. Debía tener, por tanto, la ORF de la luciferasa de luciérnaga, pero ningún promotor.

El plásmido comercial pGL4.10[Luc2] sirvió de molde para amplificar la ORF de luciferasa de luciérnaga por PCR. La recombinación BP de este producto de PCR, al que se habían añadido los extremos attB1 y attB2, con el vector donador pDONR207, y la posterior recombinación LR del pEntry obtenido con el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST, permitió obtener el vector denominado pcDNA6.2-pL-Luc2, con la ORF de luciferasa de luciérnaga, pero sin promotores que controlasen su expresión (figura 49).

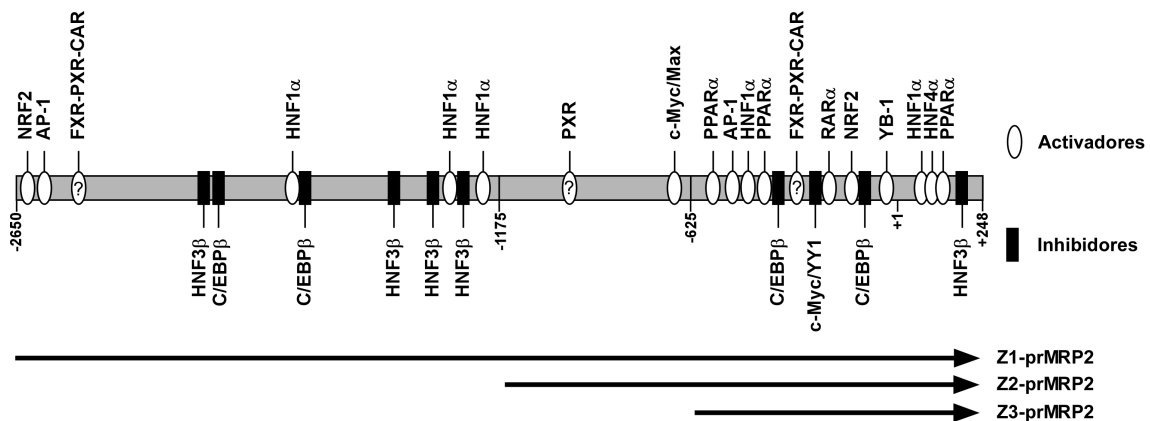


**Figura 49.** Esquema del vector pcDNA6.2-pL-Luc2, que contiene la ORF de luciferasa de luciérnaga (Luc2, en naranja) sin promotores que controlen su expresión, obtenido por recombinación LR entre el vector pEntry-L1-Luc2-L2 y el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST. En negrita aparece el nombre y los puntos de corte de la enzima seleccionada para realizar el estudio de restricción del vector.

Además de la mencionada construcción con el promotor completo a la que llamamos Z1-prMRP2, se clonaron otras regiones del promotor más pequeñas, delecionando el extremo 5' del fragmento de 2899 pb (figura 50B y C) para generar construcciones de diferente tamaño que contuvieran elementos de respuesta a diferentes factores de transcripción de interés en este estudio (figura 51). Estas construcciones de menor tamaño recibieron el nombre de Z2-prMRP2 (1423 pb) y Z3-prMRP2 (873 pb).



**Figura 50.** Esquemas de los vectores pcDNA-Z1, Z2 y Z3-prMRP2-Luc2, que contienen Z1, Z2 o Z3-prMRP2 en fase con la ORF del gen Luc2. En negrita aparecen los nombres y los puntos de corte de las enzimas seleccionadas para realizar los estudios de restricción de estos vectores.



**Figura 51.** Representación esquemática del promotor del gen *ABCC2* desde el nucleótido -2650 hasta el +248. La posición +1 indica el lugar más común de inicio de la transcripción. La ORF comienza en el nucleótido +249. Se representan las regiones del promotor clonadas (Z1-, Z2- y Z3-prMRP2) y los sitios de unión de varios factores de transcripción potencialmente implicados en la regulación de la expresión de MRP2.

En primer lugar realizamos estudios preliminares de puesta a punto del método estudiando la expresión de luciferasa de luciérnaga en células LS174T transfectadas con estos plásmidos. Decidimos medir la actividad luciferasa en los diferentes experimentos realizados en este trabajo 3 días después de la transfección, tiempo en que se alcanzaba un máximo en la expresión de Luc2 (datos no mostrados).

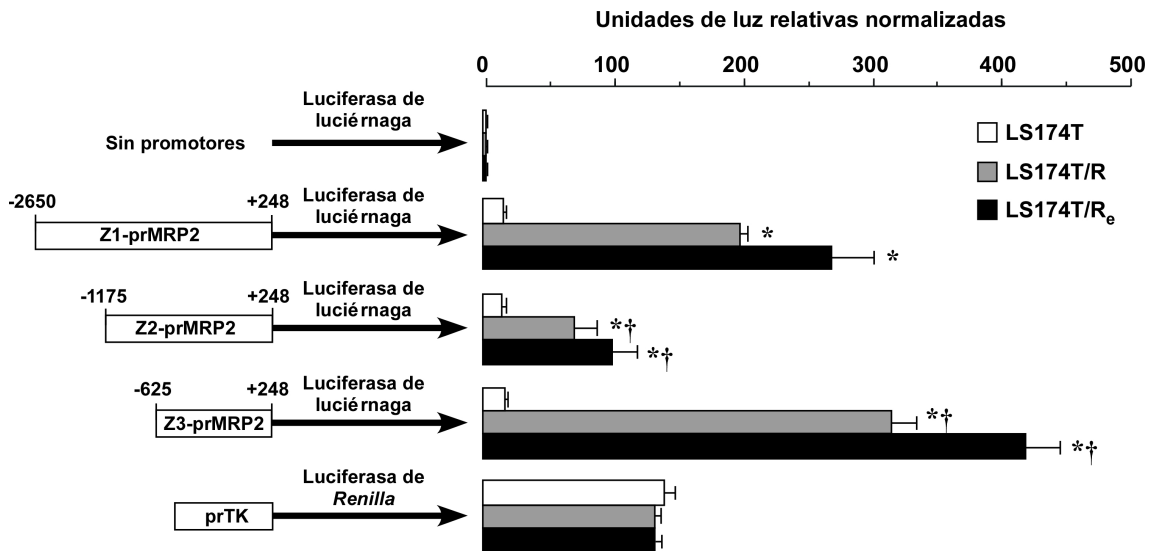
Una vez puestas a punto las condiciones de tiempo y cantidad de plásmido para transfectar las células, se llevaron a cabo experimentos en células LS174T, LS174T/R

y LS174T/R<sub>e</sub> para determinar la actividad de las diferentes regiones del promotor de MRP2 clonadas.

Para corregir variaciones en la eficacia de transfección entre los distintos experimentos, se eligió como normalizador un plásmido que contenía la ORF de la luciferasa de medusa del género *Renilla* (pGL4.74RLuc) cuya expresión estaba controlada por el promotor viral timidina kinasa (TK), según condiciones puestas a punto previamente en nuestro grupo (Pizarro R, 2010). Se utilizó también un vector control negativo, que contenía el gen “reporter” Luc2 sin promotores que controlasen su expresión (figura 49).

La figura 52 muestra cómo en el caso del control negativo la señal de luminiscencia fue prácticamente despreciable en las tres líneas celulares. Sin embargo, la transfección de las células LS174T con los vectores de expresión diseñados produjo una señal detectable y de similar magnitud para las tres regiones del promotor usadas.

A pesar de que la eficacia de transfección en las tres líneas celulares usadas fue similar, según los datos de actividad luciferasa de *Renilla* obtenidos, cuando transfectamos células LS174T/R observamos un fuerte aumento de la luminiscencia, respecto a la señal obtenida en la línea celular silvestre, alcanzando valores aún superiores en las células en las que la resistencia fue estimulada por cultivo en presencia de cisplatino (LS174T/R<sub>e</sub>). Sin embargo, en este caso, la actividad de las regiones Z1, Z2 y Z3 del promotor fue distinta, siendo Z3-prMRP2 la más activa transcripcionalmente, seguida de Z1-prMRP2 y Z2-prMRP2 que mostró una actividad mucho menor que las otras dos regiones estudiadas.



**Figura 52.** Actividad transcripcional del promotor de MRP2 en células LS174T, LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> transfectadas transitoriamente con los plásmidos que contenían la ORF de luciferasa de luciérnaga y una de las tres regiones (Z1, Z2 o Z3) del promotor. Se usó como control negativo un vector en el que la expresión de Luc2 no estaba controlada por ningún promotor, y como normalizador de la eficacia de transfección un plásmido en el que la expresión de la luciferasa de *Renilla* estaba regulada por el promotor TK. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células/cm<sup>2</sup>. A las 24 h se transfectaron con una mezcla lipídica catiónica que contenía la cantidad indicada de los plásmidos y se lisaron 3 días después con una solución detergente del kit, que además contenía luciferina, para medir la luminiscencia. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de luz por unidad de tiempo de exposición de la cámara corregidas por el número de células vivas, y representan la media±EEM de al menos tres transfecciones diferentes llevadas a cabo por triplicado. \*, p<0,05, comparando con la luminiscencia de las células silvestres. †, p<0,05, comparando con Z1-prMRP2 mediante el test *t* de Student.

Los resultados obtenidos en estos experimentos nos permiten concluir que el nivel de expresión de Luc2, mediada por las diferentes regiones del promotor clonadas, puede cuantificarse mediante el aumento de luminiscencia celular debida al aumento de expresión de la proteína luciferasa, y permite, además, medir la respuesta de activación del promotor de MRP2.

#### 4.3.3. Estimulación del promotor de MRP2 por cisplatino

Para investigar la capacidad del cisplatino para inducir el promotor de MRP2 en las células LS174T, se llevaron a cabo experimentos en células de las tres líneas celulares, transfectadas transitoriamente con los plásmidos Z1, Z2 ó Z3-prMRP2-Luc2 que fueron expuestas a una concentración de cisplatino de 5  $\mu$ M durante 24 h. Se eligió esta concentración porque estudios previos habían indicado que concentraciones por encima de la elegida resultaban tóxicas para la línea silvestre. Según datos recogidos en la bibliografía (Kast *et al.*, 2002), tiempos de exposición al



inductor inferiores a 24 h no permiten ver respuestas de activación, razón por la cual se eligió este tiempo de incubación con cisplatino en el diseño experimental.

El tratamiento con cisplatino indujo un aumento de la actividad luciferasa controlada por todas las regiones del promotor de MRP2 clonadas, de entre 108 y 176%, respecto a la misma condición sin cisplatino (tabla 5), lo que indicaba que las tres regiones eran capaces de responder, en las tres líneas celulares, a la presencia de cisplatino en el medio, incrementando su actividad transcripcional.

Obtuvimos resultados similares cuando las células transfectadas con las construcciones prMRP2-Luc2 fueron expuestas a rifampicina, un conocido inductor de MRP2 (Kauffmann *et al.*, 1998) que actúa a través de la activación del receptor nuclear PXR (Kast *et al.*, 2002). Así, la rifampicina produjo un aumento de la actividad luciferasa de entre el 150 y el 200% respecto a las células no tratadas (tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto de la rifampicina y el cisplatino sobre la actividad transcripcional del promotor de MRP2.

|           | Línea celular         | Control               | + Cisplatino            | Δ % | + Rifampicina           | Δ % |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| Z1-prMRP2 | LS174T                | 14,9 ± 0,8            | 23,4 ± 1,8 <sup>b</sup> | 157 | 28,6 ± 1,3 <sup>b</sup> | 192 |
|           | LS174T/R              | 198 ± 14 <sup>a</sup> | 345 ± 25 <sup>ab</sup>  | 175 | 381 ± 18 <sup>ab</sup>  | 198 |
|           | LS174T/R <sub>e</sub> | 269 ± 68 <sup>a</sup> | 475 ± 93 <sup>ab</sup>  | 176 | 520 ± 24 <sup>ab</sup>  | 193 |
| Z2-prMRP2 | LS174T                | 13,7 ± 0,2            | 17,4 ± 2                | 127 | 22,1 ± 1,4 <sup>b</sup> | 161 |
|           | LS174T/R              | 71 ± 2 <sup>a</sup>   | 76 ± 6 <sup>a</sup>     | 108 | 114 ± 7 <sup>ab</sup>   | 151 |
|           | LS174T/R <sub>e</sub> | 100 ± 19 <sup>a</sup> | 149 ± 23 <sup>a</sup>   | 149 | 222 ± 14 <sup>ab</sup>  | 190 |
| Z3-prMRP2 | LS174T                | 16,4 ± 0,5            | 22,9 ± 1,3 <sup>b</sup> | 140 | 38,2 ± 1,4 <sup>b</sup> | 223 |
|           | LS174T/R              | 316 ± 17 <sup>a</sup> | 465 ± 39 <sup>ab</sup>  | 147 | 687 ± 42 <sup>ab</sup>  | 218 |
|           | LS174T/R <sub>e</sub> | 420 ± 32 <sup>a</sup> | 543 ± 33 <sup>ab</sup>  | 129 | 728 ± 45 <sup>ab</sup>  | 186 |

Las células LS174T, LS174T/R y LS174/R<sub>e</sub> fueron transfectadas con los plásmidos Z1, Z2 ó Z3-prMRP2-Luc2 72 h antes de llevar a cabo los experimentos. 48 h después de la transfección se añadieron el cisplatino (5 μM) o la rifampicina (10 μM) y 24 h después se midió la actividad luciferasa. La señal de luminiscencia emitida se expresó como unidades relativas de luz tras normalizar por la viabilidad celular y la eficacia de transfección. Δ%, porcentaje de cambio respecto a las células transfectadas en ausencia del inductor (control). Los valores representan la media ± EEM de cuatro experimentos llevados a cabo por triplicado. <sup>a</sup>, p<0,05, comparando con las células LS174T. <sup>b</sup>, p<0,05, comparando con el control.

A la vista de estos resultados podemos decir que la exposición de células derivadas de tumores de colon a cisplatino produce un incremento en la actividad transcripcional del promotor de MRP2. Esta inducción puede deberse a una activación directa del promotor, o a un mecanismo indirecto mediado por factores de transcripción, por lo que el siguiente paso era investigar cambios en la expresión de factores de transcripción potencialmente implicados es la regulación de la expresión de MRP2 (figura 51) entre las células LS174T silvestres y resistentes, que explicaran la respuesta del promotor de MRP2 al cisplatino.



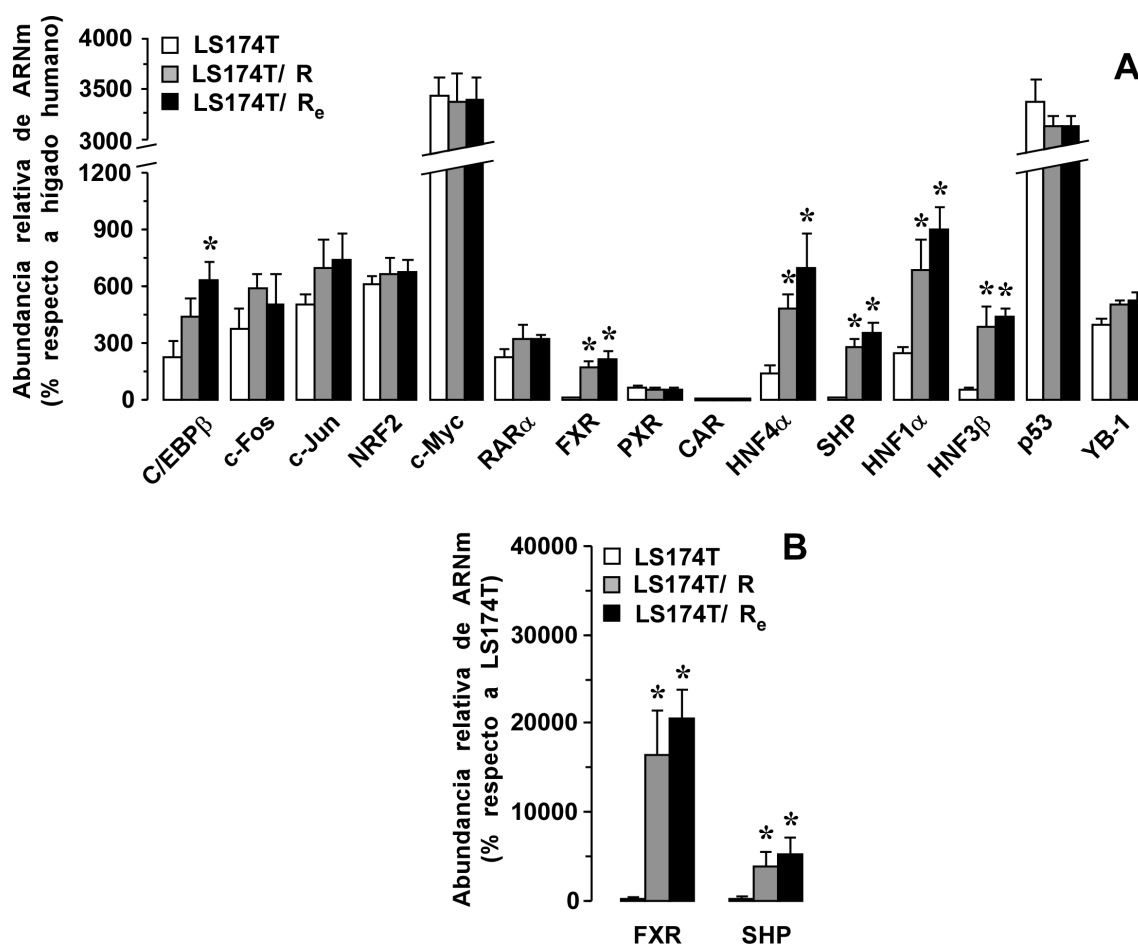
#### 4.3.4. Cambios en la expresión de factores de transcripción implicados en la activación del promotor de MRP2

La estructura y comportamiento del promotor del gen *ABCC2* son de gran interés, y se están llevando a cabo diversos estudios para determinar qué factores de transcripción están implicados en la regulación de la expresión de esta proteína y cuál es la localización de sus secuencias de unión en el promotor. Se sabe que las regiones del promotor del gen *ABCC2* humano y su ortólogo en la rata *Abcc2* contienen numerosos sitios consenso de unión para los factores Y-box, AP1, SP1, HNF1, HNF3 (Kauffmann *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999), HNF4 (Qadri *et al.*, 2009), FXR, PXR, CAR (Kast *et al.*, 2002), RAR $\alpha$  (Denson *et al.*, 2002) y NRF2 (Vollrath *et al.*, 2006) y que en la línea celular HepG2 de hepatoblastoma humano la región del promotor comprendida entre las bases -431 y -258 contiene la zona de unión a la proteína C/EBP $\beta$  o “CCAAT-enhancer binding protein beta”. Sin embargo, apenas existen datos a cerca de los mecanismos implicados en la respuesta de MRP2 a xenobióticos, por lo que es evidente que se necesitan más estudios para dilucidar los factores que regulan su expresión en estas circunstancias.

Con el objeto de determinar si la alta actividad del promotor de MRP2 detectada en este estudio en la sublínea parcialmente resistente a cisplatino (figura 52), incluso en ausencia del fármaco (LS174T/R) podía deberse a cambios en la expresión de los factores de transcripción que regulan su expresión. Por ello, se analizaron por RT-PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de mRNA de un panel de factores de transcripción asociados a la inducción de MRPs mediada por xenobióticos o a la resistencia al cisplatino (Tanaka *et al.*, 1999; Kauffmann *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002; Vollrath *et al.*, 2006; Qadri *et al.*, 2009).

En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos de abundancia relativa de ARNm de los factores de transcripción estudiados, expresada como porcentaje respecto a su expresión en hígado humano.

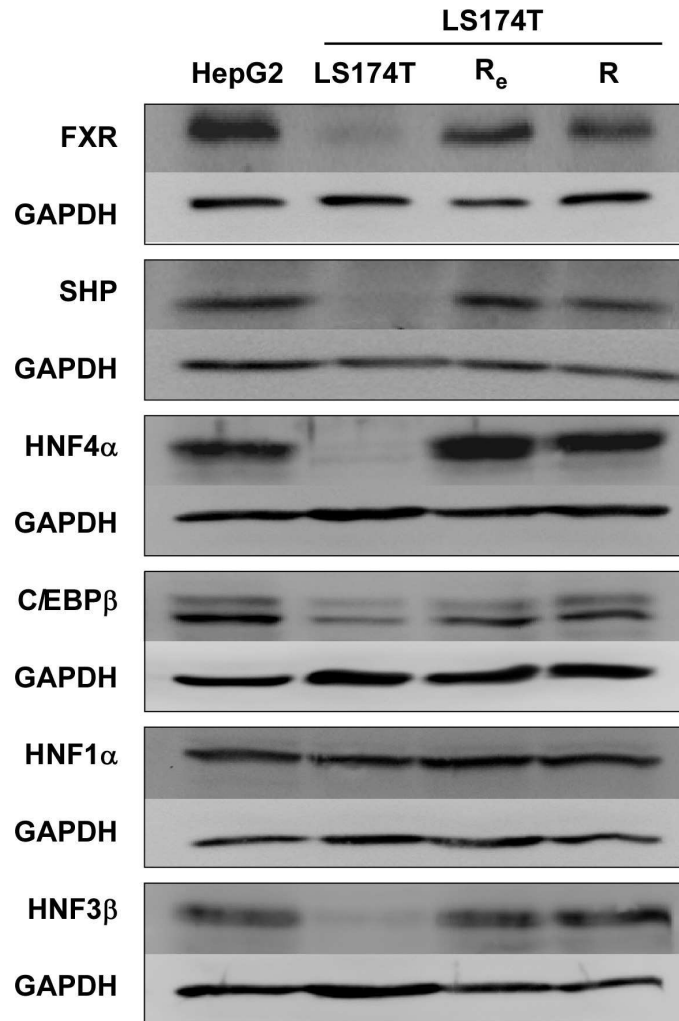
Cuando comparamos los niveles de ARNm de los factores c-Jun, c-Fos, NRF2, c-Myc, RAR $\alpha$ , PXR, CAR, p53 y YB-1, detectados en las tres líneas celulares estudiadas, no encontramos diferencias significativas entre la línea silvestre y las células parcialmente resistentes al cisplatino. Sin embargo, la expresión de C/EBP $\beta$ , HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF3 $\beta$  resultó ser significativamente mayor en las células LS174T/R, alcanzando valores entre 2 y 5 veces superiores. Este incremento era aún mayor en las células resistentes crecidas en presencia de una concentración constante de cisplatino, LS174T/R<sub>e</sub>. El mayor incremento en la expresión lo encontramos en los niveles de FXR y su gen diana SHP, que mostraron un incremento en los niveles de su ARNm de 200 y 50 veces, respectivamente, en las células resistentes respecto a las silvestres (figura 53B). Además, el cisplatino indujo un aumento en los niveles de expresión de estos receptores nucleares en las células LS174T/R<sub>e</sub>, en relación a los niveles detectados en las células crecidas en ausencia del fármaco.



**Figura 53.** Expresión relativa de factores de transcripción potencialmente implicados en la inducción del promotor de MRP2 determinada mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células silvestres, resistentes y resistentes estimuladas. Los datos se expresan como porcentaje de los valores detectados en hígado humano, (A) o en células LS174T (B) usados como calibradores. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de tres cultivos llevados a cabo por triplicado. \*,  $p < 0,05$  comparando con células LS174T mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El incremento en los niveles de ARNm de FXR, SHP, HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\beta$ , HNF4 $\alpha$  y C/EBP $\beta$  encontrado en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> respecto a la línea silvestre, se reflejaron a nivel de proteína, como se observa en el análisis por western blot de lisados de células de las tres líneas celulares (figura 54).

Se observa que en la separación electroforética C/EBP $\beta$  migró como dos bandas con pesos moleculares de 39 y 36 KDa. La aparición de estas bandas ya ha sido observada en estudios previos de C/EBP $\beta$ , y se debe a la existencia de varios puntos de inicio de la traducción en el ARNm, que dan lugar a la generación de variantes de diferente peso molecular y carga (Descombes *et al.*, 1991).



**Figura 54.** Imágenes representativas de la detección por Western blot de los factores de transcripción FXR, SHP, HNF4 $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , HNF1 $\alpha$  y HNF3 $\beta$  en lisado de células HepG2 (calle1) incluidas como control positivo, LS174T (calle 2), LS174T/R<sub>e</sub> (calle 3) y LS174T/R (calle 4). La detección se llevó a cabo usando los anticuerpos ab56902 frente a FXR, H-160 frente a SHP, H-171 frente a HNF4 $\alpha$ , C-19 frente a C/EBP $\beta$ , H-140 frente a HNF1 $\alpha$  y M-20 frente a HNF3 $\beta$ . Se cargaron entre 20 y 50  $\mu$ g de proteína/calle. Tamaño aproximado de las bandas: FXR 56 KDa; SHP 28 KDa; HNF4 $\alpha$ ; C/EBP $\beta$  50 KDa; HNF1 $\alpha$  79 KDa; y HNF3 $\beta$  54 KDa. Se determinó el contenido de GAPDH de las muestras como normalizador de la carga de proteínas.

Uno de los resultados más interesantes de esta parte del trabajo es la elevada expresión de FXR y su gen diana SHP en células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub>.

El receptor nuclear FXR es considerado un sensor específico de ABs. Su activación en hepatocitos y células intestinales desencadena una cascada de señalización que estimula mecanismos que previenen la acumulación de ABs. Una de las consecuencias de la activación de FXR en nuestros experimentos es el aumento de la expresión de bombas exportadoras ABC, como la MRP2.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el destacado papel que juegan los receptores nucleares en la regulación de la expresión de proteínas ABC. Algunos miembros de esta superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando actúan como sensores de xenobióticos. Estudios recientes han mostrado que los ligandos de FXR, PXR y CAR inducen la expresión de MRP2 en cultivos primarios de hepatocitos de rata y para la mayoría de ellos se han descrito sitios de unión en el promotor de MRP2, o bien se sospecha de su existencia (Stegmaier *et al.*, 2004) (figura 51). Así, por ejemplo se ha caracterizado un elemento de respuesta putativo ER-8 de -401 a -376 en el promotor de *Mrp2* que une los heterodímeros FXR/RXR, PXR/RXR, y CAR/RXR (Kast *et al.*, 2002).

Entre los ligandos de estos receptores se encuentran algunos fármacos como la rifampicina o el fenobarbital, que actúan como ligandos de PXR y CAR respectivamente, induciendo la expresión de varias proteínas MRPs, entre ellas MRP2 (Nishimura *et al.*, 2006; Wang *et al.*), y algunos antitumorales, como el cisplatino y el paclitaxel, que activan potentemente el receptor nuclear PXR, y se ha comprobado, de esta manera, que induce la expresión de MDR1 (Masuyama *et al.*, 2005).

De acuerdo con estos estudios, nuestros resultados muestran una activación del pMRP2 en respuesta al tratamiento con rifampicina (tabla 5). Sin embargo, puesto que no se han encontrado cambios importantes en la expresión de PXR en las células LS174T/R y LS174T/R<sub>e</sub> con respecto a la línea celular silvestre, este receptor no parece tener un papel relevante en el aumento de expresión de MRP2 inducido en las células resistentes por el tratamiento con cisplatino.

En cuanto al receptor CAR, debe jugar un papel minoritario en la resistencia al cisplatino en las células LS174T, dada su baja expresión en esta línea celular.

Nuestros resultados sugieren, sin embargo, que FXR podría estar implicado en el aumento de expresión de MRP2 inducido en tumores del circuito enterohepático por fármacos citostáticos como el cisplatino.

Sin embargo, no existen hasta la fecha evidencias de la activación de FXR de forma independiente de los ABs por compuestos citostáticos. Se sabe que el estado redox de la célula puede modular la actividad transcripcional de varios factores de transcripción, entre ellos FXR (Nomoto *et al.*, 2009). El aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el que tiene lugar durante el tratamiento con paracetamol se ha asociado a cambios en la expresión de proteínas ABC por mecanismos de retrocontrol que requieren la integridad del genoma mitocondrial (Perez *et al.*, 2011). Por otra parte el estrés oxidativo asociado a la administración de fármacos citostáticos induce la expresión de HNF4, probablemente a través de factores de transcripción capaces de responder a la presencia de especies reactivas oxígeno, como NF1 ó SP1, que interaccionan con sitios de unión en el promotor de HNF4 $\alpha$  (Hatzis *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2003).

HNF4 $\alpha$  regula la expresión de varios factores como C/EBP, HNF3 o HNF1 $\alpha$  (Hayashi *et al.*, 1999; Watt *et al.*, 2003), un conocido inductor de la expresión de MRP2, y parece que también de FXR y SHP (Jung *et al.*, 2003), por lo que el aumento de ROS producido por la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos en el medio intracelular podría dar lugar al incremento de los procesos de detoxificación a través de la inducción de MRP2 como mecanismo celular de defensa frente al estrés químico, pudiendo jugar un importante papel en el desarrollo de quimiorresistencia en tumores hepáticos e intestinales.

En resumen, nuestros estudios demuestran que la exposición de células derivadas de cáncer de colon a cisplatino induce la expresión de la bomba exportadora MRP2, implicada en la resistencia antitumoral, probablemente por un mecanismo mediado por factores de transcripción, entre los que destaca el tándem FXR-SHP.

**5**

**CONCLUSIONES**

---



▪ **CONCLUSIONES DERIVADAS DEL OBJETIVO 1:**

1.- El compuesto denominado BALU-1 es un derivado sintético de un ácido biliar que, en estudios "in vitro", ha mostrado su capacidad de actuar como inhibidor selectivo del transportador OATP1B1, por lo que reduce la captación por los hepatocitos a través de esta vía de toxinas, fármacos y sustancias endógenas sin afectar a la captación de ácidos biliares endógenos mediada por el transportador NTCP.

2.- La administración de BALU-1 no causa efectos tóxicos en ratas a dosis capaces de ejercer efectos protectores frente a la intoxicación por faloidina, como son estimular un efecto de lavado por la elevada capacidad colerética del BALU-1 e inhibir la captación y estimular la excreción biliar de la toxina, sin afectar a la captación y secreción de ácidos biliares endógenos por las principales rutas de transporte hepatocitario de estos compuestos, es decir, NTCP y BSEP. Estas propiedades del BALU-1 sugieren que este compuesto podría ser un fármaco interesante en el tratamiento farmacológico de intoxicaciones agudas por setas venenosas, así como para prevenir o disminuir la captación hepática de otras toxinas o fármacos.

➡ **CONCLUSIÓN GLOBAL DE ESTE OBJETIVO:**

La inhibición selectiva del transportador OATP1B1 puede utilizarse como una estrategia farmacológica frente a ciertas toxinas.

▪ **CONCLUSIONES DERIVADAS DEL OBJETIVO 2:**

3.- La hipercolanemia materna asociada a la colestasis de la embarazada provoca una acumulación de ácidos biliares en el pulmón materno y fetal que induce alteraciones estructurales y un incremento de la permeabilidad vascular, más acusadas en el tejido fetal. También aparece un proceso inflamatorio, que es de menor magnitud en el feto que en la madre, y un retraso en la maduración del tejido pulmonar fetal.

4.- Nuestros resultados han identificado la presencia en el tejido pulmonar de transportadores de aniones orgánicos capaces de transportar ácidos biliares, así como de receptores nucleares y de membrana sensibles a la activación por ácidos biliares. Sin embargo, las alteraciones estructurales y la inflamación encontradas en el tejido pulmonar durante la colestasis materna, no se acompañan de cambios en la expresión de estas proteínas que permitan sugerir su implicación en la etiopatogenia del síndrome respiratorio neonatal.

5.- En respuesta a elevados niveles pulmonares de ácidos biliares se produce una sobreexpresión de la fosfolipasa A2-IIA lo que, junto al efecto detergente de los ácidos biliares, puede afectar a la función pulmonar directamente a través de la emulsión e



hidrólisis de los glicerofosfolípidos constituyentes del surfactante, e indirectamente a través de la producción de mediadores de inflamación.

⇒ CONCLUSIÓN GLOBAL DE ESTE OBJETIVO:

Los ácidos biliares, pero no sus sistemas de transporte, están implicados en la etiopatogenia del síndrome respiratorio neonatal asociado a la colestasis de la embarazada

▪ **CONCLUSIONES DERIVADAS DEL OBJETIVO 3:**

6.- La exposición a cisplatino de células de adenocarcinoma de colon induce la sobreexpresión de varias bombas exportadora de la familia MRP, sobre todo MRP2, lo que concuerda con un descenso de los niveles intracelulares de cisplatino y el desarrollo de resistencia a este fármaco.

7.- Se han clonado tres fragmentos de distinta longitud de la región del gen ABCC2 que precede al exon 1 y se han ligado a la ORF de una luciferasa. Estas construcciones, una vez transfectadas en células de mamífero, han permitido establecer una región mínima de respuesta a la inducción por tratamiento con cisplatino.

8.- La exposición de células derivadas de tumores de colon a cisplatino produce un incremento en la actividad transcripcional del promotor de MRP2. Esta inducción puede deberse a una activación directa del promotor, o a un mecanismo indirecto mediado por factores de transcripción, entre los que destaca el tandem FXR-SHP.

9.- La activación de factores de transcripción por compuestos citostáticos como el cisplatino estimula la expresión de MRP2 por activación de su promotor, lo que puede constituir un importante mecanismo celular de defensa frente al estrés químico debido a compuestos potencialmente tóxicos, y jugar un papel importante en el desarrollo de quimiorresistencia en tumores hepáticos e intestinales.

⇒ CONCLUSIÓN GLOBAL DE ESTE OBJETIVO:

La activación de la expresión de la bomba exportadora MRP2 en respuesta a la exposición al cisplatino disminuye los niveles del fármaco en las células tumorales y contribuye a la falta de eficacia del tratamiento antitumoral.

**6**

**BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H (1999). Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* **274**, 17159-17163.
- Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyo M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma K, Nagura H, Ito S, Matsuno S (2001). LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* **120**, 1689-1699.
- Adachi H, Suzuki T, Abe M, Asano N, Mizutamari H, Tanemoto M, Nishio T, Onogawa T, Toyohara T, Kasai S, Satoh F, Suzuki M, Tokui T, Unno M, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003). Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F1188-1197.
- Adachi M, Sampath J, Lan LB, Sun D, Hargrove P, Flatley R, Tatum A, Edwards MZ, Wezeman M, Matherly L, Drake R, Schuetz J (2002). Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* **277**, 38998-39004.
- Adams FH, Towers B, Osher AB, Ikegami M, Fujiwara T, Nozaki M (1978). Effects of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs. I. Clinical and autopsy findings. *Pediatr Res* **12**, 841-848.
- Agassandian M, Mathur SN, Zhou J, Field FJ, Mallampalli RK (2004). Oxysterols trigger ABCA1-mediated basolateral surfactant efflux. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 227-233.
- Akbulut H, Soykan I, Yakaryilmaz F, Icii F, Aksoy F, Haznedaroglu S, Yildirim S (1997). Five-year results of the treatment of 23 patients with immunoproliferative small intestinal disease: a Turkish experience. *Cancer* **80**, 8-14.
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* **1511**, 7-16.
- Alberts SR, Gores GJ, Kim GP, Roberts LR, Kendrick ML, Rosen CB, Chari ST, Martenson JA (2007). Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer. *Mayo Clin Proc* **82**, 628-637.
- Albrecht C, Viturro E (2007). The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch* **453**, 581-589.
- Aleksunes LM, Manautou JE (2007). Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* **35**, 459-473.
- Aljiffry M, Walsh MJ, Molinari M (2009). Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World J Gastroenterol* **15**, 4240-4262.
- Alvarez Alcalde M, Jover A, Meijide F, Galantini L, Pavel NV, Antelo A, Vazquez Tato J (2008). Synthesis and characterization of a new gemini surfactant derived from

- 3alpha,12alpha-dihydroxy-5beta-cholan-24-amine (steroid residue) and ethylenediaminetetraacetic acid (spacer). *Langmuir* **24**, 6060-6066.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**, 5337-5339.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* **276**, 28857-28865.
- Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* **350**, 2343-2351.
- Angeletti RH, Novikoff PM, Juvvadi SR, Fritschy JM, Meier PJ, Wolkoff AW (1997). The choroid plexus epithelium is the site of the organic anion transport protein in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 283-286.
- Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K (1976). Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidaemic subjects. *Gut* **17**, 420-425.
- Anthony DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R (1996). Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res* **56**, 1374-1381.
- Aranda A, Pascual A (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-1304.
- Arbibe L, Vial D, Rosinski-Chupin I, Havet N, Huerre M, Vargaftig BB, Touqui L (1997). Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *J Immunol* **159**, 391-400.
- Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S (2003). Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* **39**, 112-119.
- Avery ME, Mead J (1959). Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* **97**, 517-523.
- Baggetto LG, Dong M, Bernaud J, Espinosa L, Rigal D, Bonvallet R, Marthinet E (1998). In vitro and in vivo reversal of cancer cell multidrug resistance by the semi-synthetic antibiotic tiamulin. *Biochem Pharmacol* **56**, 1219-1228.
- Baier PK, Hempel S, Waldvogel B, Baumgartner U (2006). Zonation of hepatic bile salt transporters. *Dig Dis Sci* **51**, 587-593.
- Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL (1999). Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* **353**, 1232-1237.
- Bakos E, Homolya L (2007). Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch* **453**, 621-641.

- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* **447**, 735-743.
- Ballatori N (2005). Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**, 689-698.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N (2005). OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* **42**, 1270-1279.
- Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B (2003). FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* **124**, 1926-1940.
- Baringhaus KH, Matter H, Stengelin S, Kramer W (1999). Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na(+)/bile acid cotransporter. *J Lipid Res* **40**, 2158-2168.
- Bates SR, Fisher AB (1996). Surfactant protein A is degraded by alveolar macrophages. *Am J Physiol* **271**, L258-266.
- Beaudreuil S, Sharobeem R, Maitre F, Karsenti D, Grezard O, Pierre D (1998). [Kidney toxicity of Amanita phalloides. A case with kidney needle biopsy]. *Presse Med* **27**, 1434.
- Beer TW, Rowlands DC, Crocker J (1996). Detection of the multidrug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignant lung tumours. *Thorax* **51**, 526-529.
- Belinsky MG, Chen ZS, Shchhaveleva I, Zeng H, Kruh GD (2002). Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* **62**, 6172-6177.
- Bergen AA, Plomp AS, Hu X, de Jong PT, Gorgels TG (2007). ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Arch* **453**, 685-691.
- Berger A, Havet N, Vial D, Arbibe L, Dumarey C, Watson ML, Touqui L (1999). Dioleoylphosphatidylglycerol inhibits the expression of type II phospholipase A2 in macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 613-618.
- Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Frossard JL, Lee HS, Castagliuolo I, Wang CC, Gerard N, Pothoulakis C, Steer ML (1998). Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4760-4765.
- Bjorkhem I (1992). Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res* **33**, 455-471.
- Bjorkhem I, Liljeqvist L, Nilsell K, Einarsson K (1986). Oxidoreduction of different hydroxyl groups in bile acids during their enterohepatic circulation in man. *J Lipid Res* **27**, 177-182.

- Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, Kulkarni AV, Hafey MJ, Evers R, Johnson JM, Ulrich RG, Slatter JG (2006). Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* **36**, 963-988.
- Blechacz B, Gores GJ (2008). Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* **48**, 308-321.
- Blondeau K, Pauwels A, Dupont L, Mertens V, Proesmans M, Orel R, Brecej J, Lopez-Alonso M, Moya M, Malfroot A, De Wachter E, Vandenplas Y, Hauser B, Sifrim D (2010). Characteristics of gastroesophageal reflux and potential risk of gastric content aspiration in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **50**, 161-166.
- Blumberg B, Evans RM (1998). Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* **12**, 3149-3155.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.
- Bodin K, Lindbom U, Diczfalusy U (2005). Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim Biophys Acta* **1687**, 84-93.
- Bomzon A, Holt S, Moore K (1997). Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin Nephrol* **17**, 549-562.
- Bonin S, Pascolo L, Croce LS, Stanta G, Tiribelli C (2002). Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. *Mol Med* **8**, 318-325.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 347-357.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295-1302.
- Bosch FX, Ribes J, Borrás J (1999). Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* **19**, 271-285.
- Bosch I, Croop J (1996). P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1288**, F37-54.
- Bosquillon C (2010). Drug transporters in the lung--do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *J Pharm Sci* **99**, 2240-2255.
- Boulikas T, Vougiouka M (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* **10**, 1663-1682.
- Boyer J, McLean EG, Aroori S, Wilson P, McCulla A, Carey PD, Longley DB, Johnston PG (2004). Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res* **10**, 2158-2167.
- Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, Lee JY, Ballatori N (2006). Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G1124-1130.

- Brechot JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF (1998). Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium. *J Histochem Cytochem* **46**, 513-517.
- Brites D, Rodrigues CM (1998a). Elevated levels of bile acids in colostrum of patients with cholestasis of pregnancy are decreased following ursodeoxycholic acid therapy [see comments]. *J Hepatol* **29**, 743-751.
- Brites D, Rodrigues CM, van-Zeller H, Brito A, Silva R (1998b). Relevance of serum bile acid profile in the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy in an high incidence area: Portugal. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **80**, 31-38.
- Briz O, Macias RI, Vallejo M, Silva A, Serrano MA, Marin JJ (2003a). Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol Pharmacol* **63**, 742-750.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ (2003b). Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* **371**, 897-905.
- Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, Marin JJ (2002). Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* **61**, 853-860.
- Brown JM (2002). Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* **1**, 453-458.
- Bruix J, Llovet JM (2002). Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **35**, 519-524.
- Bunz F (2001). Cell death and cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 337-341.
- Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K (2004). Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **104**, 2940-2942.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ (2002). The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**, 1649-1658.
- Calcagno AM, Fostel JM, Orzechowski RP, Alston JT, Mattes WB, Siahaan TJ, Ware JA (2005). Modulation of cell adhesion molecules in various epithelial cell lines after treatment with PP2. *Mol Pharm* **2**, 170-184.
- Cao J, Huang L, Liu Y, Hoffman T, Stieger B, Meier PJ, Vore M (2001). Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology* **33**, 140-147.
- Cappell MS, Hassan T (1992). Gastrointestinal and hepatic effects of Amanita phalloides ingestion. *J Clin Gastroenterol* **15**, 225-228.
- Carey JB, Jr. (1958). The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *J Clin Invest* **37**, 1494-1503.



- Clark DA, Nieman GF, Thompson JE, Paskanik AM, Rokhar JE, Bredenberg CE (1987). Surfactant displacement by meconium free fatty acids: an alternative explanation for atelectasis in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr* **110**, 765-770.
- Clements JA, Avery ME (1998). Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, S59-66.
- Coello A, Meijide F, Nunez ER, Tato JV (1996). Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *J Pharm Sci* **85**, 9-15.
- Combettes L, Berthon B, Claret M (1992). Taurolithocholate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* **287 ( Pt 3)**, 891-896.
- Connors TD, Van Raay TJ, Petry LR, Klinger KW, Landes GM, Burn TC (1997). The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3. *Genomics* **39**, 231-234.
- Cooper JA (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* **38**, 1277-1287.
- Courtois A, Payen L, Guillouzo A, Fardel O (1999). Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett* **459**, 381-385.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* **274**, G157-169.
- Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG (2003). Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G449-459.
- Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **55**, 929-937.
- Cunningham D (1998). Mature results from three large controlled studies with raltitrexed ('Tomudex'). *Br J Cancer* **77 Suppl 2**, 15-21.
- Chabot S, Koumanov K, Lambeau G, Gelb MH, Balloy V, Chignard M, Whitsett JA, Touqui L (2003). Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2. *J Immunol* **171**, 995-1000.
- Chan LM, Lowes S, Hirst BH (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**, 25-51.

- Chandra P, Brouwer KL (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* **21**, 719-735.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**, 1866-1870.
- Chen P, Mrkobrada M, Vallis KA, Cameron R, Sandhu J, Hendler A, Reilly RM (2002). Comparative antiproliferative effects of (111)In-DTPA-hEGF, chemotherapeutic agents and gamma-radiation on EGFR-positive breast cancer cells. *Nucl Med Biol* **29**, 693-699.
- Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, Kruh GD (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* **67**, 545-557.
- Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* **533**, 201-209.
- Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, Klaassen CD (2002). Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 97-104.
- Chiang JY (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* **40**, 539-551.
- Childs S, Yeh RL, Hui D, Ling V (1998). Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res* **58**, 4160-4167.
- Chock SP, Schmauder-Chock EA, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB (1994). The localization of phospholipase A2 in the secretory granule. *Biochem J* **300** ( Pt 3), 619-622.
- Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL (2010). Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem* **25**, 13-26.
- Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, Cheng AL (2002). Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **63**, 1709-1716.
- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N (2005). The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* **280**, 6960-6968.
- Dawson PA, Oelkers P (1995). Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* **6**, 109-114.
- de Graaf D, Sharma RC, Mechetner EB, Schimke RT, Roninson IB (1996). P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1238-1242.
- De Luca D, Minucci A, Zecca E, Piastra M, Pietrini D, Carnielli VP, Zuppi C, Tridente A, Conti G, Capoluongo ED (2009). Bile acids cause secretory phospholipase A2 activity enhancement, revertible by exogenous surfactant administration. *Intensive Care Med* **35**, 321-326.

- Dean M (2005). The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* **400**, 409-429.
- Deffie AM, McPherson JP, Gupta RS, Hedley DW, Goldenberg GJ (1992). Multifactorial resistance to antineoplastic agents in drug-resistant P388 murine leukemia, Chinese hamster ovary, and human HeLa cells, with emphasis on the role of DNA topoisomerase II. *Biochem Cell Biol* **70**, 354-364.
- Deleze G, Paumgartner G, Karlaganis G, Giger W, Reinhard M, Sidiropoulos D (1978). Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest* **8**, 41-45.
- Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M, Beliveau R (1999). Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS Lett* **442**, 208-214.
- Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ (1992). Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *J Cell Biol* **118**, 551-559.
- Denson LA, Bohan A, Held MA, Boyer JL (2002). Organ-specific alterations in RAR alpha:RXR alpha abundance regulate rat Mrp2 (Abcc2) expression in obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **123**, 599-607.
- Descombes P, Schibler U (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**, 569-579.
- Desch CE, Benson AB, 3rd, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD, Pfister DG, Virgo KS, Petrelli NJ (2005). Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* **23**, 8512-8519.
- Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, Strautnieks S, Thompson RJ, Lammert F, Kubitz R, Keitel V, Glantz A, Mattsson LA, Marschall HU, Molokhia M, Moore GE, Linton KJ, Williamson C (2009). Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* **58**, 537-544.
- Donner MG, Keppler D (2001). Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* **34**, 351-359.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Haussinger D (2007). Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G1134-1146.
- Doubre H, Cesari D, Mairovitz A, Benac C, Chantot-Bastaraud S, Dagnon K, Antoine M, Danel C, Bernaudin JF, Fleury-Feith J (2005). Multidrug resistance-associated protein (MRP1) is overexpressed in DNA aneuploid carcinomatous cells in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Cancer* **113**, 568-574.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665-15670.
- Drescher S, Glaeser H, Murdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003). P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 223-231.

- Drobnik W, Lindenthal B, Lieser B, Ritter M, Christiansen Weber T, Liebisch G, Giesa U, Igel M, Borsukova H, Buchler C, Fung-Leung WP, Von Bergmann K, Schmitz G (2001). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology* **120**, 1203-1211.
- Dubin M, Maurice M, Feldmann G, Erlinger S (1978). Phalloidin-induced cholestasis in the rat: relation to changes in microfilaments. *Gastroenterology* **75**, 450-455.
- Duijvestijn AM, van Goor H, Klatter F, Majoor GD, van Bussel E, van Breda Vriesman PJ (1992). Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab Invest* **66**, 459-466.
- Dumont M, D'Hont C, Lamri Y, Durand-Schneider AM, Jacquemin E, Feldmann G, Erlinger S (1994). Effects of phalloidin and colchicine on diethylmaleate-induced choleresis and ultrastructural appearance of rat hepatocytes. *Liver* **14**, 308-313.
- Dumont M, Erlinger S, Uchman S (1980). Hypercholeresis induced by ursodeoxycholic acid and 7-ketolithocholic acid in the rat: possible role of bicarbonate transport. *Gastroenterology* **79**, 82-89.
- El-Mir MY, Badia MD, Luengo N, Monte MJ, Marin JJ (2001). Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* **100**, 499-508.
- El-Mir MY, Monte MJ, Morales AI, Arevalo M, Serrano MA, Marin JJ (1997). Effect of maternal cholestasis on biliary lipid and bile acid secretion in the infant rat. *Hepatology* **26**, 527-536.
- Elias E, Hruban Z, Wade JB, Boyer JL (1980). Phalloidin-induced cholestasis: a microfilament-mediated change in junctional complex permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2229-2233.
- Eloranta JJ, Jung D, Kullak-Ublick GA (2006). The human Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide gene is activated by glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, and suppressed by bile acids via a small heterodimer partner-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* **20**, 65-79.
- Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA (2005). Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* **433**, 397-412.
- Endo Y, Obata T, Murata D, Ito M, Sakamoto K, Fukushima M, Yamasaki Y, Yamada Y, Natsume N, Sasaki T (2007). Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer Sci* **98**, 1633-1637.
- Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM (1994). Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* **93**, 737-749.
- Erlinger S (1982). [Choleresis and cholestasis (author's transl)]. *Gastroenterol Clin Biol* **6**, 500-508.
- Evans AM (2000). Influence of dietary components on the gastrointestinal metabolism and transport of drugs. *Ther Drug Monit* **22**, 131-136.

- Evans TW, Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ (1987). Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *J Appl Physiol* **63**, 479-484.
- Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, Paulusma CC, Oude Elferink RP, Baas F, Schinkel AH, Borst P (1998). Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* **101**, 1310-1319.
- Fakhrejehani E, Miyamoto A, Tanigawa N (2007). Correlation between thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil, in relation to differentiation in gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**, 437-446.
- Fautrel A, Andrieux L, Musso O, Boudjema K, Guillouzo A, Langouet S (2005). Overexpression of the two nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **43**, 288-293.
- Fehrenbach T, Cui Y, Faulstich H, Keppler D (2003). Characterization of the transport of the bicyclic peptide phalloidin by human hepatic transport proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**, 415-420.
- Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG (1996). Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clin Chim Acta* **251**, 173-186.
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* **203**, 257-263.
- Fishman PN, Pond GR, Moore MJ, Oza A, Burkes RL, Siu LL, Feld R, Gallinger S, Greig P, Knox JJ (2006). Natural history and chemotherapy effectiveness for advanced adenocarcinoma of the small bowel: a retrospective review of 113 cases. *Am J Clin Oncol* **29**, 225-231.
- Friche E, Danks MK, Schmidt CA, Beck WT (1991). Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* **51**, 4213-4218.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999). Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 497-501.
- Frimmer M, Petzinger E, Rufeger U, Veil LB (1977). The role of bile acids in phalloidin poisoning. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **301**, 145-147.
- Fritz P, Behrle E, Beaune P, Eichelbaum M, Kroemer HK (1993). Differential expression of drug metabolizing enzymes in primary and secondary liver neoplasm: immunohistochemical characterization of cytochrome P4503A and glutathione-S-transferase. *Histochemistry* **99**, 443-451.
- Frohling W, Stiehl A (1976). Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis. *Eur J Clin Invest* **6**, 67-74.
- Fromm MF (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 423-429.



- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T (2001). Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* **142**, 2005-2012.
- Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T (1980). Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* **1**, 55-59.
- Furukawa T, Komatsu M, Ikeda R, Tsujikawa K, Akiyama S (2008). Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport. *Curr Med Chem* **15**, 3268-3278.
- Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* **62**, 4899-4902.
- Gabbiani G, Montesano R, Tuchweber B, Salas M, Orci L (1975). Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab Invest* **33**, 562-569.
- Gao B, Stieger B, Noe B, Fritschy JM, Meier PJ (1999). Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* **47**, 1255-1264.
- Garcia-Marin JJ, Gonzalez J, Esteller A (1986). Influence of dehydrocholate on bilirubin transport into bile in the rat. *Digestion* **33**, 80-88.
- Gartung C, Matern S (1997). Molecular regulation of sinusoidal liver bile acid transporters during cholestasis. *Yale J Biol Med* **70**, 355-363.
- Gatmaitan ZC, Arias IM (1993). Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* **24**, 77-97.
- Gatmaitan ZC, Arias IM (1995). ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol Rev* **75**, 261-275.
- Gavrilova O, Geyer J, Petzinger E (2007). In vivo relevance of Mrp2-mediated biliary excretion of the Amanita mushroom toxin demethylphalloin. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 2070-2077.
- Geier A, Dietrich CG, Gerloff T, Haendly J, Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C (2003). Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 87-94.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* **273**, 10046-10050.
- Gerolami A, Crotte C, Montet JC, Vigne JL, Granger M, Mule A (1972). [Metabolism of dehydrocholic acid. Chromatographic study of its derivatives in the bile. "In vitro" study of their ability to form mixed micelles]. *Biol Gastroenterol (Paris)* **5**, 265-272.

- Go S, Sato C, Yin J, Kannagi R, Kitajima K (2007). Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 537-542.
- Goerke J (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* **1408**, 79-89.
- Goldstein LJ (1996). MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* **32A**, 1039-1050.
- Goldstein LJ, Gottesman MM, Pastan I (1991). Expression of the MDR1 gene in human cancers. *Cancer Treat Res* **57**, 101-119.
- Gong Y, Huang ZB, Christensen E, Glud C (2008). Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000551.
- Gonzalez-Sanchez E (2008). Transfección de células tumorales de origen enterohepático con plásmidos que contienen el promotor de la proteína de resistencia MRP2 (ABCC2).
- Gradhand U, Lang T, Schaeffeler E, Glaeser H, Tegude H, Klein K, Fritz P, Jedlitschky G, Kroemer HK, Bachmakov I, Anwald B, Kerb R, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M, Fromm MF (2008). Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *Pharmacogenomics J* **8**, 42-52.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* **278**, 48275-48282.
- Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG (1994). Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* **54**, 357-361.
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pharmacol Ther* **102**, 728-734.
- Gross NJ, Barnes E, Narine KR (1988). Recycling of surfactant in black and beige mice: pool sizes and kinetics. *J Appl Physiol* **64**, 2017-2025.
- Grossmann G, Tashiro K, Kobayashi T, Suzuki Y, Matsumoto Y, Waseda Y, Akino T, Curstedt T, Robertson B (1999). Experimental neonatal respiratory failure induced by lysophosphatidylcholine: effect of surfactant treatment. *J Appl Physiol* **86**, 633-640.
- Gui C, Miao Y, Thompson L, Wahlgren B, Mock M, Stieger B, Hagenbuch B (2008). Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. *Eur J Pharmacol* **584**, 57-65.
- Gundala S, Wells LD, Milliano MT, Talkad V, Luxon BA, Neuschwander-Tetri BA (2004). The hepatocellular bile acid transporter Ntcp facilitates uptake of the lethal mushroom toxin alpha-amanitin. *Arch Toxicol* **78**, 68-73.
- Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Kruh GD (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* **278**, 29509-29514.

- Hagenbuch B, Dawson P (2004a). The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* **447**, 566-570.
- Hagenbuch B, Meier PJ (1996). Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* **16**, 129-136.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 1-18.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004b). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* **447**, 653-665.
- Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW (2009). Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001145.
- Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L (1982). Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* **70**, 673-683.
- Handschin C, Meyer UA (2003). Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **55**, 649-673.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795.
- Hatzis P, Talianidis I (2001). Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol* **21**, 7320-7330.
- Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y (2003). Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 824-829.
- Hayashi M, Sakai T, Hasegawa Y, Nishikawahara T, Tomioka H, Iida A, Shimizu N, Tomita M, Awazu S (1999a). Physiological mechanism for enhancement of paracellular drug transport. *J Control Release* **62**, 141-148.
- Hayashi Y, Wang W, Ninomiya T, Nagano H, Ohta K, Itoh H (1999b). Liver enriched transcription factors and differentiation of hepatocellular carcinoma. *Mol Pathol* **52**, 19-24.
- Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**, 1393-1403.
- Heikkinen J, Maentausta O, Tuimala R, Ylostalo P, Janne O (1980). Amniotic fluid bile acids in normal and pathologic pregnancy. *Obstet Gynecol* **56**, 60-64.
- Henriksson G, Norlander T, Zheng X, Stierna P, Westrin KM (1997). Expression of P-glycoprotein 170 in nasal mucosa may be increased with topical steroids. *Am J Rhinol* **11**, 317-321.



- Herraez E (2006). Estudio de la capacidad de nuevos derivados de ácidos biliares (BALUs) para modificar la secreción biliar de lípidos y la circulación enterohepática de los ácidos biliares naturales. In *Fisiología y Farmacología*. Salamanca, Salamanca.
- Hidi R, Vial D, Havet N, Berger A, Vargaftig BB, Touqui L (1997). Inhibition by pulmonary surfactant Curosurf of secretory phospholipase A2 expression in guinea-pig alveolar macrophages. *Biochem Pharmacol* **54**, 1055-1058.
- Higgins CF (1995). P-glycoprotein and cell volume-activated chloride channels. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 63-70.
- Hills BA, Chen Y, Masters IB, Hills YC (1997). Raised bile acid concentrations in SIDS lungs at necropsy. *Arch Dis Child* **77**, 120-123.
- Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP (1999). Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 359-376.
- Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y (1999). Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* **274**, 15181-15185.
- Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y (2000). ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* **275**, 2905-2910.
- Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Schmitz-Salue C, Foth H, Kahl GF (1995). Modulation of P-glycoprotein and mdr1b mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 179-185.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3473-3478.
- Hofmann AF (1994). *Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents. The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system*. Raven Press, New York.
- Hofmann AF (1998). Progress in idiopathic bile acid malabsorption. *Gut* **43**, 738-739.
- Holm BA, Matalon S (1989). Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* **69**, 805-818.
- Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliwer SA, Goodwin B, Jones SA (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* **17**, 1581-1591.
- Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez WY, Robey RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* **61**, 6635-6639.

- Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD (2004). Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* **64**, 4927-4930.
- Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* **162**, 181-191.
- Houten SM (2006). Homing in on bile acid physiology. *Cell Metab* **4**, 423-424.
- Huang W, Zhang J, Chua SS, Qatanani M, Han Y, Granata R, Moore DD (2003). Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4156-4161.
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadee W (2004). Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* **64**, 4294-4301.
- Huijghebaert SM, Hofmann AF (1986). Pancreatic carboxypeptidase hydrolysis of bile acid-amino conjugates: selective resistance of glycine and taurine amides. *Gastroenterology* **90**, 306-315.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**, 1543-1568.
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL (1991). Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br J Cancer* **64**, 437-444.
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL (1993). Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res* **10**, 743-749.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342.
- Ihse I, Arnesjo B (1973). The phospholipase A2 activity of human small intestinal contents. *Acta Chem Scand* **27**, 2749-2756.
- Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Kawanaka K, Tabata I, Higuchi M, Tange T, Yamamoto TT, Ezaki O (1997). Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol* **273**, E37-45.
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* **64**, 610-618.
- Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y (2002). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* **1**, 611-616.

- Iqbal S, Lenz HJ (2001). Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* **3**, 102-108.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14298-14302.
- Ishikawa T, Ali-Osman F (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* **268**, 20116-20125.
- Ishizaki K, Kinbara S, Miyazawa N, Takeuchi Y, Hirabayashi N, Kasai H, Araki T (1997). The biochemical studies on phalloidin-induced cholestasis in rats. *Toxicol Lett* **90**, 29-34.
- Islam TC, Asplund AC, Lindvall JM, Nygren L, Liden J, Kimby E, Christensson B, Smith CI, Sander B (2003). High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Leukemia* **17**, 1880-1890.
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ (1996). Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* **148**, 877-887.
- Izukura M, Hashimoto T, Gomez G, Uchida T, Greeley GH, Jr., Thompson JC (1991). Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* **6**, 427-432.
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994). Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 133-137.
- Jander S, Bischoff J (2000a). Treatment of Amanita phalloides poisoning: I. Retrospective evaluation of plasmapheresis in 21 patients. *Ther Apher* **4**, 303-307.
- Jander S, Bischoff J, Woodcock BG (2000b). Plasmapheresis in the treatment of Amanita phalloides poisoning: II. A review and recommendations. *Ther Apher* **4**, 308-312.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW (2005). Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* **385**, 419-426.
- Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BJ, Youssef BM, Klimstra D, Blumgart LH (2001). Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* **234**, 507-517; discussion 517-509.

- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* **275**, 30069-30074.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D (1997). ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* **327** ( Pt 1), 305-310.
- Jefferson T, Demicheli V, Di Pietrantonj C, Rivetti D (2006). Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001169.
- Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O (2006). Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **34**, 1756-1763.
- Jones DV, Jr., Lozano R, Hoque A, Markowitz A, Patt YZ (1996). Phase II study of paclitaxel therapy for unresectable biliary tree carcinomas. *J Clin Oncol* **14**, 2306-2310.
- Joo SS, Won TJ, Kim MJ, Hwang KW, Lee do I (2006). Interferon signal transduction of biphenyl dimethyl dicarboxylate/amantadine and anti-HBV activity in HepG2 2.2.15. *Arch Pharm Res* **29**, 405-411.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**, 31-53.
- Juliano R (1976). Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *J Supramol Struct* **4**, 521-526.
- Jumarie C, Malo C (1991). Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **149**, 24-33.
- Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2001). Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J Biol Chem* **276**, 37206-37214.
- Jung D, Kullak-Ublick GA (2003). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology* **37**, 622-631.
- Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2002). Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* **122**, 1954-1966.
- Kaestner KH (2000). The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 281-285.
- Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* **97**, 626-630.

- Kakyo M, Sakagami H, Nishio T, Nakai D, Nakagomi R, Tokui T, Naitoh T, Matsuno S, Abe T, Yawo H (1999). Immunohistochemical distribution and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2). *FEBS Lett* **445**, 343-346.
- Kalin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tummler B (1999). DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **103**, 1379-1389.
- Kamiyama Y, Matsubara T, Yoshinari K, Nagata K, Kamimura H, Yamazoe Y (2007). Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet* **22**, 287-298.
- Kancheva R, Hill M, Cibula D, Vcelakova H, Kancheva L, Vrbikova J, Fait T, Parizek A, Starka L (2007). Relationships of circulating pregnanolone isomers and their polar conjugates to the status of sex, menstrual cycle, and pregnancy. *J Endocrinol* **195**, 67-78.
- Kandell RL, Bernstein C (1991). Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. *Nutr Cancer* **16**, 227-238.
- Kaneko T, Sato T, Katsuya H, Miyauchi Y (1990). Surfactant therapy for pulmonary edema due to intratracheally injected bile acid. *Crit Care Med* **18**, 77-83.
- Kaneko T, Sato T, Morioka T (1982). [Respiratory and circulatory changes after the intratracheal infusion of bile in dogs]. *Masui* **31**, 860-864.
- Karpen SJ (2002). Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* **36**, 832-850.
- Karpen SJ, Sun AQ, Kudish B, Hagenbuch B, Meier PJ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ (1996). Multiple factors regulate the rat liver basolateral sodium-dependent bile acid cotransporter gene promoter. *J Biol Chem* **271**, 15211-15221.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **23**, 1061-1066.
- Kartner N, Riordan JR, Ling V (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **221**, 1285-1288.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**, 2908-2915.
- Kauffmann HM, Keppler D, Gant TW, Schrenk D (1998). Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmoot) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch Toxicol* **72**, 763-768.
- Kauffmann HM, Keppler D, Kartenbeck J, Schrenk D (1997). Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology* **26**, 980-985.

- Kauffmann HM, Vorderstemann B, Schrenk D (2001). Basal expression of the rat, but not of the human, multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene is mediated by CBF/NF-Y and Sp1 promoter-binding sites. *Toxicology* **167**, 25-35.
- Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, Kuwano M (1999). Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* **456**, 327-331.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* **278**, 9435-9440.
- Kedersha NL, Rome LH (1986). Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* **103**, 699-709.
- Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kuhlkamp T, Keppler D, Haussinger D, Kubitz R (2005). Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **41**, 1160-1172.
- Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS (1988). Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* **241**, 1813-1815.
- Keppler D, König J, Buchler M (1997). The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul* **37**, 321-333.
- Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* **2**, 51-64.
- Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD (2005). Cholangiocarcinoma. *Lancet* **366**, 1303-1314.
- Kim DK, Fukuda T, Thompson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV (1995). Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* **269**, L109-118.
- Kinalski M, Sledziewski A, Kretowski A (2000). [Intrauterine stimulation for fetal respiratory system maturation; benefits and risks.]. *Wiad Lek* **53**, 538-545.
- Kirk J, Houlbrook S, Stuart NS, Stratford IJ, Harris AL, Carmichael J (1993). Selective reversal of vinblastine resistance in multidrug-resistant cell lines by tamoxifen, toremifene and their metabolites. *Eur J Cancer* **29A**, 1152-1157.
- Kitsioulis EI, Nakos G, Lekka ME (1999). Differential determination of phospholipase A(2) and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates. *J Lipid Res* **40**, 2346-2356.
- Klaassen CD (1974). Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can J Physiol Pharmacol* **52**, 334-348.
- Klein K, Kullak-Ublick GA, Wagner M, Trauner M, Eloranta JJ (2009). Hepatocyte nuclear factor-4alpha and bile acids regulate human concentrative nucleoside



- transporter-1 gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G936-947.
- Kliwer SA, Lehmann JM, Willson TM (1999). Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* **284**, 757-760.
- Klugbauer N, Hofmann F (1996). Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* **391**, 61-65.
- Koepsell H, Endou H (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* **447**, 666-676.
- Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S (2000). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* **60**, 1312-1316.
- Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000). A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G156-164.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**, 3537-3547.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6914-6919.
- Kosmider S, Lipton L (2007). Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **13**, 3799-3805.
- Kramer W, Buscher HP, Gerok W, Kurz G (1979). Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high-density lipoprotein revealed by photoaffinity labelling. *Eur J Biochem* **102**, 1-9.
- Kramer W, Girbig F, Glombik H, Corsiero D, Stengelin S, Weyland C (2001). Identification of a ligand-binding site in the Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporting protein from rabbit ileum. *J Biol Chem* **276**, 36020-36027.
- Krishnamachary N, Center MS (1993). The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res* **53**, 3658-3661.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **279**, 24218-24225.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997). Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* **113**, 1295-1305.

- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995). Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* **109**, 1274-1282.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**, 525-533.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* **20**, 273-292.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-342.
- Kuo MT, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee YC, Tatebe S, Mills GB, Unate H (2002). Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling. *Oncogene* **21**, 1945-1954.
- Kuss BJ, Corbo M, Lau WM, Fennell DA, Dean NM, Cotter FE (2002). In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: a potential role in neuroblastoma therapy. *Int J Cancer* **98**, 128-133.
- Kusuhara H, Sugiyama Y (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* **453**, 735-744.
- Laatikainen T, Karjalainen O (1973). Excretion of progesterone metabolites in urine and bile of pregnant women with intrahepatic cholestasis. *J Steroid Biochem* **4**, 641-648.
- Lage H (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **22**, 188-199.
- Lage JM, Popek EJ (1993). The role of DNA flow cytometry in evaluation of partial and complete hydatidiform moles and hydropic abortions. *Semin Diagn Pathol* **10**, 267-274.
- Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, Testa JR, Tew KD (1998). Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 1332-1337.
- Lallemand JY, Stoven V, Annereau JP, Boucher J, Blanquet S, Barthe J, Lenoir G (1997). Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis? *Lancet* **350**, 711-712.
- Lambeau G, Gelb MH (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* **77**, 495-520.
- Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G (2003). Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* **49**, 230-238.



- Lazaridis KN, Gores GJ (2005). Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* **128**, 1655-1667.
- Lecureur V, Fardel O, Guillouzo A (1994). The antiprogesterin drug RU 486 potentiates doxorubicin cytotoxicity in multidrug resistant cells through inhibition of P-glycoprotein function. *FEBS Lett* **355**, 187-191.
- Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, Schuetz JD (2000). Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **57**, 24-35.
- Lechapt-Zalcman E, Hurbain I, Lacave R, Commo F, Urban T, Antoine M, Milleron B, Bernaudin JF (1997). MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur Respir J* **10**, 1837-1843.
- Lee H, Zhang Y, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ, Edwards PA (2006). FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res* **47**, 201-214.
- Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL (2000a). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **118**, 163-172.
- Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR, Kruh GD (1998). Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res* **58**, 2741-2747.
- Lee MA, Woo IS, Kang JH, Hong YS, Lee KS (2004a). Epirubicin, cisplatin, and protracted infusion of 5-FU (ECF) in advanced intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 346-350.
- Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ (2004b). Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun* **4**, 13.
- Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD (2000b). The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol* **20**, 187-195.
- Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D (2006). Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci* **91**, 140-149.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Li G, Chen X, Wang Q, Xu Z, Zhang W, Ye L (2007). The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **27**, 173-175.
- Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N (1998). Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184-16191.

- Li XG, Haluska P, Jr., Hsiang YH, Bharti A, Kufe DW, Rubin EH (1996). Identification of topoisomerase I mutations affecting both DNA cleavage and interaction with camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* **803**, 111-127.
- Lin MC, Kramer W, Wilson FA (1990). Identification of cytosolic and microsomal bile acid-binding proteins in rat ileal enterocytes. *J Biol Chem* **265**, 14986-14995.
- Lin X, Howell SB (1999). Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. *Mol Pharmacol* **56**, 390-395.
- Linton KJ (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **22**, 122-130.
- List AF, Spier C, Greer J, Wolff S, Hutter J, Dorr R, Salmon S, Futscher B, Baier M, Dalton W (1993). Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia. *J Clin Oncol* **11**, 1652-1660.
- Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* **58**, 931-959.
- Litman T, Jensen U, Hansen A, Covitz KM, Zhan Z, Fetsch P, Abati A, Hansen PR, Horn T, Skovsgaard T, Bates SE (2002). Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 6-16.
- Liu Y, Suchy FJ, Silverman JA, Vore M (1997). Prolactin increases ATP-dependent taurocholate transport in canalicular plasma membrane from rat liver. *Am J Physiol* **272**, G46-53.
- Loe DW, Deeley RG, Cole SP (1998). Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* **58**, 5130-5136.
- Loranger A, Barriault C, Yousef IM, Tuchweber B (1996). Structural and functional alterations of hepatocytes during transient phalloidin-induced cholestasis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **137**, 100-111.
- Lorico A, Nesland J, Emilsen E, Fodstad O, Rappa G (2002). Role of the multidrug resistance protein 1 gene in the carcinogenicity of aflatoxin B1: investigations using mrp1-null mice. *Toxicology* **171**, 201-205.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lu H, Choudhuri S, Ogura K, Csanaky IL, Lei X, Cheng X, Song PZ, Klaassen CD (2008). Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol Sci* **103**, 35-45.
- Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, Yahanda AM, Adler KM, Kaubisch S, Halsey J, Sikic BI (1993). Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer* **72**, 3502-3514.

- Lum BL, Kaubisch S, Yahanda AM, Adler KM, Jew L, Ehsan MN, Brophy NA, Halsey J, Gosland MP, Sikic BI (1992). Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance. *J Clin Oncol* **10**, 1635-1642.
- Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, Bru C, Rodes J, Bruix J (1999). Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* **29**, 62-67.
- Macdonald IA, Bokkenheuser VD, Winter J, McLernon AM, Mosbach EH (1983). Degradation of steroids in the human gut. *J Lipid Res* **24**, 675-700.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ (2000). Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* **31**, 975-983.
- Macias RI, Serrano MA, Monte MJ, Jimenez S, Hernandez B, Marin JJ (2005). Long-term effect of treating pregnant rats with ursodeoxycholic acid on the congenital impairment of bile secretion induced in the pups by maternal cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 751-758.
- Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ, Stieger B (2000). Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* **57**, 634-641.
- Maeda K, Sugiyama Y (2008). Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**, 223-235.
- Magnani E, Bartling L, Hake S (2006). From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Mol Biol* **7**, 46.
- Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD (2005). Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **33**, 956-962.
- Maher JM, Dieter MZ, Aleksunes LM, Slitt AL, Guo G, Tanaka Y, Scheffer GL, Chan JY, Manautou JE, Chen Y, Dalton TP, Yamamoto M, Klaassen CD (2007). Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* **46**, 1597-1610.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**, 2368-2373.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362-1365.
- Maliapaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, Schellens JH (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* **59**, 4559-4563.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Manso MA, Ramudo L, De Dios I (2007). Extrapancreatic organ impairment during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. Effect of N-acetylcysteine. *Int J Exp Pathol* **88**, 343-349.
- Marie JP (2001). Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* **13**, 463-469.
- Marin JJ, Barbero ER, Herrera MC, Tabernero A, Monte MJ (1993). Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* **18**, 1182-1192.
- Marin JJ, Briz O, Perez MJ, Romero MR, Monte MJ (2009a). Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Front Biosci* **14**, 4257-4280.
- Marin JJ, Castano B, Blazquez AG, Rosales R, Efferth T, Monte MJ (2010a). Strategies for overcoming chemotherapy resistance in enterohepatic tumours. *Curr Mol Med* **10**, 467-485.
- Marin JJ, Macias RI, Briz O, Perez MJ, Blazquez AG, Arrese M, Serrano MA (2008). Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver Int* **28**, 435-454.
- Marin JJ, Romero MR, Blazquez AG, Herráez E, Keck E, Briz O (2009b). Importance and limitations of chemotherapy among the available treatments for gastrointestinal tumours. *Anticancer Agents Med Chem* **9**, 162-184.
- Marin JJ, Romero MR, Briz O (2010b). Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* **17**, 709-740.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206-210.
- Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* **5**, 69-84.
- Massaad C, Paradon M, Jacques C, Salvat C, Bereziat G, Berenbaum F, Olivier JL (2000). Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors. *J Biol Chem* **275**, 22686-22694.
- Masuyama H, Suwaki N, Tateishi Y, Nakatsukasa H, Segawa T, Hiramatsu Y (2005). The pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *Mol Endocrinol* **19**, 1170-1180.
- Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM (2001). Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* **21**, 778-796.

- McCarthy TC, Li X, Sinal CJ (2005). Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids. *J Biol Chem* **280**, 23232-23242.
- McDevitt CA, Collins R, Kerr ID, Callaghan R (2009). Purification and structural analyses of ABCG2. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 57-65.
- McDevitt CA, Collins RF, Conway M, Modok S, Storm J, Kerr ID, Ford RC, Callaghan R (2006). Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **14**, 1623-1632.
- McKenzie S, Barnes S, Schwartz R (2005). An update on the surgical management of colon cancer. *Curr Surg* **62**, 313-318.
- McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4245-4250.
- Meier-Abt F, Faulstich H, Hagenbuch B (2004). Identification of phalloidin uptake systems of rat and human liver. *Biochim Biophys Acta* **1664**, 64-69.
- Meier PJ (1989). The bile salt secretory polarity of hepatocytes. *J Hepatol* **9**, 124-129.
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* **26**, 1667-1677.
- Meier PJ, Meier-Abt AS, Boyer JL (1987). Properties of the canalicular bile acid transport system in rat liver. *Biochem J* **242**, 465-469.
- Meier PJ, Stieger B (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**, 635-661.
- Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* **52**, 6885-6889.
- Mekhjian HS, Phillips SF, Hofmann AF (1979). Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci* **24**, 545-550.
- Mendenhall WM, Amos EH, Rout WR, Zlotecki RA, Hochwald SN, Cance WG (2004). Adjuvant postoperative radiotherapy for colon carcinoma. *Cancer* **101**, 1338-1344.
- Mendenhall WM, Rout WR, Vauthey JN, Haigh LS, Zlotecki RA, Copeland EM, 3rd (1997). Conservative treatment of rectal adenocarcinoma with endocavitary irradiation or wide local excision and postoperative irradiation. *J Clin Oncol* **15**, 3241-3248.
- Meng LJ, Reyes H, Palma J, Hernandez I, Ribalta J, Sjoval J (1997). Profiles of bile acids and progesterone metabolites in the urine and serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* **27**, 346-357.
- Mengs U, Trost W (1981). Acute phalloidin poisoning in dogs. *Arch Toxicol* **48**, 61-67.

- Merrell MD, Augustine LM, Slitt AL, Cherrington NJ (2008). Induction of drug metabolism enzymes and transporters by oltipraz in rats. *J Biochem Mol Toxicol* **22**, 128-135.
- Mertens V, Blondeau K, Van Oudenhove L, Vanaudenaerde B, Vos R, Farre R, Pauwels A, Verleden G, Van Raemdonck D, Sifrim D, Dupont LJ (2011). Bile acids aspiration reduces survival in lung transplant recipients with BOS despite azithromycin. *Am J Transplant* **11**, 329-335.
- Milacic V, Fregona D, Dou QP (2008). Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. *Histol Histopathol* **23**, 101-108.
- Miller AA, Hooper SB, Harding R (1993). Role of fetal breathing movements in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol* **75**, 2711-2717.
- Minemura M, Tanimura H, Tabor E (1999). Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Int J Oncol* **15**, 559-563.
- Mitchell JB, Cook JA, DeGraff W, Glatstein E, Russo A (1989). Glutathione modulation in cancer treatment: will it work? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **16**, 1289-1295.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Miyashita T, Reed JC (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* **52**, 5407-5411.
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H (2004). Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* **109**, 238-246.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* **15**, 804-816.
- Monte MJ, Morales AI, Arevalo M, Alvaro I, Macias RI, Marin JJ (1996). Reversible impairment of neonatal hepatobiliary function by maternal cholestasis. *Hepatology* **23**, 1208-1217.
- Monte MJ, Rodriguez-Bravo T, Macias RI, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA, Lopez-Salva A, Marin JJ (1995). Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr Res* **38**, 156-163.
- Moore SD, Cox DW (2002). Expression in mouse kidney of membrane copper transporters Atp7a and Atp7b. *Nephron* **92**, 629-634.
- Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG, Vore M (2002). Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* **35**, 1409-1419.
- Mouro I, Halleck MS, Schlegel RA, Mattei MG, Williamson P, Zachowski A, Devaux P, Cartron JP, Colin Y (1999). Cloning, expression, and chromosomal mapping of



- a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 333-339.
- Muirhead KA, Kloszewski ED, Antell LA, Griswold DE (1985). Identification of live cells for flow cytometric analysis of lymphoid subset proliferation in low viability populations. *J Immunol Methods* **77**, 77-86.
- Mulugeta S, Gray JM, Notarfrancesco KL, Gonzales LW, Koval M, Feinstein SI, Ballard PL, Fisher AB, Shuman H (2002). Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *J Biol Chem* **277**, 22147-22155.
- Mullenbach R, Bennett A, Tetlow N, Patel N, Hamilton G, Cheng F, Chambers J, Howard R, Taylor-Robinson SD, Williamson C (2005). ATP8B1 mutations in British cases with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* **54**, 829-834.
- Muller M (2000). Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin Liver Dis* **20**, 323-337.
- Muller M, Jansen PL (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* **272**, G1285-1303.
- Muller M, Mayer R, Hero U, Keppler D (1994). ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by mdrl P-glycoprotein. *FEBS Lett* **343**, 168-172.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Murray GI, Paterson PJ, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD (1993). The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **71**, 36-43.
- Nagano M, Kuroki S, Mizuta A, Furukawa M, Noshiro M, Chijiwa K, Tanaka M (2004). Regulation of bile acid synthesis under reconstructed enterohepatic circulation in rats. *Steroids* **69**, 701-709.
- Nakos G, Kitsioui E, Hatzidaki E, Koulouras V, Touqui L, Lekka ME (2005). Phospholipases A2 and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **33**, 772-779.
- Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, Muraoka H, Sai Y, Suzuki N, Tsuji A (2002). Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 in intestinal secretion of grepafloxacin in rats. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 344-349.
- Naumann N, Siratska O, Gahr M, Rosen-Wolff A (2005). P-glycoprotein expression increases ATP release in respiratory cystic fibrosis cells. *J Cyst Fibros* **4**, 157-168.
- Neufeld EB, Demosky SJ, Jr., Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. (2002). The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 974-979.

- Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM (2000). Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 83-90.
- Nies AT, Keppler D (2007). The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* **453**, 643-659.
- Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S (2006). Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**, 297-307.
- Nishio T, Adachi H, Nakagomi R, Tokui T, Sato E, Tanemoto M, Fujiwara K, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Nakai D, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Kondo Y, Unno M, Ito S, Iinuma K, Nunoki K, Matsuno S, Abe T (2000). Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1, which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 831-838.
- Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E (2006). Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets* **7**, 861-879.
- Nomoto M, Miyata M, Yin S, Kurata Y, Shimada M, Yoshinari K, Gonzalez FJ, Suzuki K, Shibasaki S, Kurosawa T, Yamazoe Y (2009). Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull* **32**, 172-178.
- Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, Dusonchet L, Meli M, D'Alessandro N (2004). Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol Rep* **11**, 133-136.
- Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I (2005). Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* **33**, 434-439.
- Ogasawara K, Terada T, Asaka J, Katsura T, Inui K (2007). Hepatocyte nuclear factor-4{alpha} regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1819-1826.
- Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, Akizawa T, Yoshioka M, Sugiyama Y (2000). Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G438-446.
- Ohama T, Hirano K, Zhang Z, Aoki R, Tsujii K, Nakagawa-Toyama Y, Tsukamoto K, Ikegami C, Matsuyama A, Ishigami M, Sakai N, Hiraoka H, Ueda K, Yamashita S, Matsuzawa Y (2002). Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 625-630.
- Okabe M, Szakacs G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN, Gottesman MM (2008). Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther* **7**, 3081-3091.



- Okano J, Matsumoto K, Nagahara T, Murawaki Y (2006). Gefitinib and the modulation of the signaling pathways downstream of epidermal growth factor receptor in human liver cancer cells. *J Gastroenterol* **41**, 166-176.
- Okuyama T, Maehara Y, Endo K, Baba H, Adachi Y, Kuwano M, Sugimachi K (1994). Expression of glutathione S-transferase-pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer* **74**, 1230-1236.
- Ormerod MG, O'Neill C, Robertson D, Kelland LR, Harrap KR (1996). cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **37**, 463-471.
- Owen RP, Badagnani I, Giacomini KM (2006). Molecular determinants of specificity for synthetic nucleoside analogs in the concentrative nucleoside transporter, CNT2. *J Biol Chem* **281**, 26675-26682.
- Palermo DP, DeGraaf ME, Marotti KR, Rehberg E, Post LE (1991). Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J Biotechnol* **19**, 35-47.
- Pan YH, Bahnson BJ (2007). Structural basis for bile salt inhibition of pancreatic phospholipase A2. *J Mol Biol* **369**, 439-450.
- Pang E, Hu Y, Chan KY, Lai PB, Squire JA, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Leung TW, Wong N (2005). Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* **85**, 664-674.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**, 153-156.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **284**, 1365-1368.
- Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jimenez F, Marin JJ (2002). Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* **102**, 587-593.
- Patel T (2006). Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**, 33-42.
- Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Waugh KA, Hoque AM, Frome AI, Lahoti S, Ellis L, Vauthey JN, Curley SA, Schnirer, II, Rajiman I (2001). Phase II trial of cisplatin, interferon alpha-2b, doxorubicin, and 5-fluorouracil for biliary tract cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 3375-3380.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704.
- Perez M, Gonzalez-Sanchez E, Gonzalez-Loyola A, Gonzalez-Buitrago J, Marin J (2011). Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells. *Br J Pharmacol* **162**, 1686-1699.

- Perez MJ, Briz O (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* **15**, 1677-1689.
- Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ (2005). Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* **43**, 324-332.
- Petak I, Tillman DM, Houghton JA (2000). p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **6**, 4432-4441.
- Petzinger E (1981). Competitive inhibition of the uptake of demethylphalloin by cholic acid in isolated hepatocytes. Evidence for a transport competition rather than a binding competition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **316**, 345-349.
- Petzinger E, Burckhardt G, Schwenk M, Faulstich H (1982a). Lack of intestinal transport of [3H]-demethylphalloin: comparative studies with phallotoxins and bile acids on isolated small intestinal cells and ileal brush border membrane vesicles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **320**, 196-200.
- Petzinger E, Frimmer M (1982b). Energy linked uptake of demethylphalloin by isolated rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **319**, 87-92.
- Petzinger E, Frimmer M (1984). Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate. *Biochim Biophys Acta* **778**, 539-548.
- Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ (2002). Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* **16**, 2283-2296.
- Popowski K, Eloranta JJ, Saborowski M, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2005). The human organic anion transporter 2 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4 alpha and suppressed by bile acids. *Mol Pharmacol* **67**, 1629-1638.
- Porembka DT, Kier A, Sehlhorst S, Boyce S, Orłowski JP, Davis K, Jr. (1993). The pathophysiologic changes following bile aspiration in a porcine lung model. *Chest* **104**, 919-924.
- Portincasa P, Di Ciaula A, Wang HH, Moschetta A, Wang DQ (2009). Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives. *Curr Med Chem* **16**, 1531-1542.
- Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA (1991). Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatr Res* **30**, 597-605.
- Puchelle E, Gaillard D, Ploton D, Hinnrasky J, Fuchey C, Boutterin MC, Jacquot J, Dreyer D, Pavirani A, Dalemans W (1992). Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 485-491.
- Qadri I, Hu LJ, Iwahashi M, Al-Zuabi S, Quattrochi LC, Simon FR (2009). Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol Appl Pharmacol* **234**, 281-292.

- Qian XD, Beck WT (1990). Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts. *J Biol Chem* **265**, 18753-18756.
- Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, Amorino G, Valerie K, Sealy L, Engelhardt JF, Grant S, Hylemon PB, Dent P (2003). Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* **23**, 3052-3066.
- Quist RG, Ton-Nu HT, Lillienau J, Hofmann AF, Barrett KE (1991). Activation of mast cells by bile acids. *Gastroenterology* **101**, 446-456.
- Raedsch R, Lauterburg BH, Hofmann AF (1981). Altered bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* **26**, 394-401.
- Rao US, Fine RL, Scarborough GA (1994). Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* **48**, 287-292.
- Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* **59**, 3968-3971.
- Reichel C, Gao B, Van Montfoort J, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T, Meier PJ (1999). Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* **117**, 688-695.
- Reyes H, Palma J, Ribalta J (1998). Recurrent familial cholestasis disclosed by pregnancy. *Gastroenterology* **114**, 1354-1355.
- Ribalta J, Reyes H, Gonzalez MC, Iglesias J, Arrese M, Poniachik J, Molina C, Segovia N (1991). S-adenosyl-L-methionine in the treatment of patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with negative results. *Hepatology* **13**, 1084-1089.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D (2006). Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G640-649.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D (2003). Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **38**, 374-384.
- Robertson PA, Sniderman SH, Laros RK, Jr., Cowan R, Heilbron D, Goldenberg RL, Iams JD, Creasy RK (1992). Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986. *Am J Obstet Gynecol* **166**, 1629-1641; discussion 1641-1625.
- Roger L, St Pyrek J, Little JM, Adcock EW (1983). What is meant by the term "bile acid"? *Am J Physiol* **244**, G107-110.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G (2008). Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* **47**, 301-309.

- Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, Dietel M, Greenberger L, Cole SP, Doyle LA (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* **91**, 429-433.
- Rost D, Kartenbeck J, Keppler D (1999). Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* **29**, 814-821.
- Ruetz S, Gros P (1994). Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell* **77**, 1071-1081.
- Ruparelia P, Cheow HK, Evans JW, Banney L, Shankar S, Szczepura KR, Swift AE, Ballinger JR, Hartman NG, Chilvers ER, Peters AM (2008). Pulmonary elimination rate of inhaled <sup>99m</sup>Tc-sestamibi radioaerosol is delayed in healthy cigarette smokers. *Br J Clin Pharmacol* **65**, 611-614.
- Russell AL, Henderson CJ, Smith G, Wolf CR (1994). Suppression of multi-drug resistance gene expression in the mouse liver by 1,4-bis[2,(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene. *Int J Cancer* **58**, 550-554.
- Ryan SF, Ghassibi Y, Liau DF (1991). Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 33-41.
- Rybarova S, Boor A, Jurkovic I, Kocan P (2003). Expression of LRP--lung resistance-related protein in the normal colorectal mucosa and in colorectal carcinoma. *Bratisl Lek Listy* **104**, 179-183.
- Saborowski M, Kullak-Ublick GA, Eloranta JJ (2006). The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Pharmacol Exp Ther* **317**, 778-785.
- Sai Y, Tsuji A (2004). Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today* **9**, 712-720.
- Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Tsujimoto H, Imanishi T, Ogaki M, Ohyama T, Yamazaki J, Hagiwara A, Yamaguchi T, Sawai K, Takahashi T (1997). Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surg Today* **27**, 676-679.
- Salas MA, Evans SW, Levell MJ, Whicher JT (1990). Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells. *Clin Exp Immunol* **79**, 470-473.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirota N, Elfring GL, Miller LL (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* **343**, 905-914.
- Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB (2003). Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **9**, 5853-5859.

- Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, Dantzig AH (2002). Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology* **41**, 65-74.
- Sanyal AJ, Hirsch JI, Moore EW (1990). Premicellar taurocholate avidly binds ferrous (Fe<sup>++</sup>) iron: a potential physiologic role for bile salts in iron absorption. *J Lab Clin Med* **116**, 76-86.
- Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW (1997). Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange. *J Biol Chem* **272**, 26340-26345.
- Sato K, Tsuchida S, Tamai K (1989). [Anti-cancer drug resistance and glutathione S-transferases]. *Gan To Kagaku Ryoho* **16**, 592-598.
- Savaraj N, Wu C, Wangpaichitr M, Kuo MT, Lampidis T, Robles C, Furst AJ, Feun L (2003). Overexpression of mutated MRP4 in cisplatin resistant small cell lung cancer cell line: collateral sensitivity to azidothymidine. *Int J Oncol* **23**, 173-179.
- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF, Keppler D (1999). Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1159-1169.
- Scheffer GL, Hu X, Pijnenborg AC, Wijnholds J, Bergen AA, Scheper RJ (2002a). MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab Invest* **82**, 515-518.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Elferink RP, van der Valk P, Borst P, Scheper RJ (2002b). Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* **82**, 193-201.
- Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EG, Scheper RJ (2002c). Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* **55**, 332-339.
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ (1995). The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* **1**, 578-582.
- Scheithauer W (2002). Review of gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Semin Oncol* **29**, 40-45.
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, et al. (1993). Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* **53**, 1475-1479.
- Schinkel AH (1998). Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int J Clin Pharmacol Ther* **36**, 9-13.
- Schinkel AH, Jonker JW (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 3-29.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P (1997).



- Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4028-4033.
- Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD (1996). Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* **49**, 311-318.
- Seeger MA, van Veen HW (2009). Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 725-737.
- Segal-Bendirdjian E, Jacquemin-Sablon A (1995). Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp Cell Res* **218**, 201-212.
- Sepulveda WH, Gonzalez C, Cruz MA, Rudolph MI (1991). Vasoconstrictive effect of bile acids on isolated human placental chorionic veins. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **42**, 211-215.
- Serrano MA, Macias RI, Vallejo M, Briz O, Bravo A, Pascual MJ, St-Pierre MV, Stieger B, Meier PJ, Marin JJ (2003). Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 515-524.
- Seward DJ, Koh AS, Boyer JL, Ballatori N (2003). Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *J Biol Chem* **278**, 27473-27482.
- Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA (2005). Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology* **128**, 620-626.
- Sheps JA, Ling V (2007). Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflugers Arch* **453**, 545-553.
- Shiao T, Iwahashi M, Fortune J, Quattrochi L, Bowman S, Wick M, Qadri I, Simon FR (2000). Structural and functional characterization of liver cell-specific activity of the human sodium/taurocholate cotransporter. *Genomics* **69**, 203-213.
- Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, Stoffel M (2001). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* **27**, 375-382.
- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ (1995). Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **95**, 745-754.
- Shneider BL, Fox VL, Schwarz KB, Watson CL, Ananthanarayanan M, Thevananther S, Christie DM, Hardikar W, Setchell KD, Mieli-Vergani G, Suchy FJ, Mowat AP (1997). Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* **25**, 1176-1183.

- Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M (2004). ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* **350**, 1296-1303.
- Sjovall J, Sjovall K (1970). Steroid sulphates in plasma from pregnant women with pruritus and elevated plasma bile acid levels. *Ann Clin Res* **2**, 321-337.
- Sjovall K (1970). Sulphates of pregnanones, pregnanediols and 16-hydroxysteroids in plasma from pregnant women. *Ann Clin Res* **2**, 409-413.
- Smirlis D, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR, Shephard EA (2001). Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. *J Biol Chem* **276**, 12822-12826.
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**, 451-462.
- Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B, Borst P (2000). MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* **275**, 23530-23539.
- Smrcek JM, Schwartau N, Kohl M, Berg C, Geipel A, Krapp M, Diedrich K, Ludwig M (2005). Antenatal corticosteroid therapy in premature infants. *Arch Gynecol Obstet* **271**, 26-32.
- Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR, Johnstone RW (1998). The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7024-7029.
- Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL (2001). Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* **33**, 783-791.
- Soto Tellini VH, Jover A, Galantini L, Pavel NV, Meijide F, Vazquez Tato J (2006). New lamellar structure formed by an adamantyl derivative of cholic acid. *J Phys Chem B* **110**, 13679-13681.
- Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S, Ahluwalia R, Obach R, Principe P, Twelves C, Verweij J, McLeod HL (2004). Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* **76**, 38-44.
- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T (2002). Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1856-1863.
- Stahlman MT, Besnard V, Wert SE, Weaver TE, Dingle S, Xu Y, von Zychlin K, Olson SJ, Whitsett JA (2007). Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. *J Histochem Cytochem* **55**, 71-83.
- Stegmaier P, Kel AE, Wingender E (2004). Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Inform* **15**, 276-286.

- Stockel B, König J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D (2000). Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* **267**, 1347-1358.
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* **20**, 233-238.
- Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Russell TL, Heizer ML, Avadhani NG, Hylemon PB (1996). Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **57**, 337-347.
- Stride BD, Grant CE, Loe DW, Hipfner DR, Cole SP, Deeley RG (1997). Pharmacological characterization of the murine and human orthologs of multidrug-resistance protein in transfected human embryonic kidney cells. *Mol Pharmacol* **52**, 344-353.
- Sugeno H, Takebayashi Y, Higashimoto M, Ogura Y, Shibukawa G, Kanzaki A, Terada K, Sugiyama T, Watanabe K, Katoh R, Nitta Y, Fukushima T, Koyama Y, Inoue N, Sekikawa K, Ogawa K, Sato Y, Takenoshita S (2004). Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* **24**, 1045-1048.
- Sugimoto Y, Tsukahara S, Imai Y, Sugimoto Y, Ueda K, Tsuruo T (2003). Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists. *Mol Cancer Ther* **2**, 105-112.
- Suzuki H, Sugiyama Y (2000). Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver. *Semin Liver Dis* **20**, 251-263.
- Suzuki H, Sugiyama Y (2002). Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1311-1331.
- Suzuki T, Nishio K, Tanabe S (2001). The MRP family and anticancer drug metabolism. *Curr Drug Metab* **2**, 367-377.
- Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003). Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* **17**, 1203-1215.
- Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, Gottesman MM (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* **6**, 129-137.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-234.



- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjoström B, Lundgren B, Artursson P (2001). Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 164-170.
- Takada T, Kato H, Matsushiro T, Nimura Y, Nagakawa T, Nakayama T (1994). Comparison of 5-fluorouracil, doxorubicin and mitomycin C with 5-fluorouracil alone in the treatment of pancreatic-biliary carcinomas. *Oncology* **51**, 396-400.
- Takahashi Y, Niitsu Y (1994). [Glutathione S transferases-pi]. *Gan To Kagaku Ryoho* **21**, 945-951.
- Takahata T, Ookawa K, Suto K, Tanaka M, Yano H, Nakashima O, Kojiro M, Tamura Y, Tateishi T, Sakata Y, Fukuda S (2008). Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**, 399-407.
- Talalay P (1960). Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem Anal* **8**, 119-143.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000). Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 251-260.
- Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Takeda M, Ikegami Y, Sawada S, Tsuji M, Matsuda Y, Ishikawa T (2007). Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci* **98**, 231-239.
- Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, Takano H, Kohno K, Kuwano M (1999). The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* **30**, 1507-1512.
- Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza EC, Higuchi K, Kamisako T, Kuroda M, Takeuchi K, Iwasa M, Kaito M, Adachi Y (2002). Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G656-662.
- Tanizawa A, Kohn KW, Kohlhagen G, Leteurtre F, Pommier Y (1995). Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry* **34**, 7200-7206.
- Tascilar M, Loos WJ, Seynaeve C, Verweij J, Sleijfer S (2007). The pharmacologic basis of ifosfamide use in adult patients with advanced soft tissue sarcomas. *Oncologist* **12**, 1351-1360.
- Teixeira C, Reed JC, Pratt MA (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* **55**, 3902-3907.
- Tian Q, Zhang J, Tan TM, Chan E, Duan W, Chan SY, Boelsterli UA, Ho PC, Yang H, Bian JS, Huang M, Zhu YZ, Xiong W, Li X, Zhou S (2005). Human multidrug

- resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharm Res* **22**, 1837-1853.
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD (1976). Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* **12**, 180-191.
- Torky AR, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, Foth H (2005). Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology* **207**, 437-450.
- Touqui L, Arbibe L (1999). A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis. *Mol Med Today* **5**, 244-249.
- Touqui L, Wu YZ (2003). Interaction of secreted phospholipase A2 and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome. *Acta Pharmacol Sin* **24**, 1292-1296.
- Trauner M, Arrese M, Lee H, Boyer JL, Karpen SJ (1998a). Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *J Clin Invest* **101**, 2092-2100.
- Trauner M, Boyer JL (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**, 633-671.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL (1998b). Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* **339**, 1217-1227.
- Tsuda M, Sekine T, Takeda M, Cha SH, Kanai Y, Kimura M, Endou H (1999). Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 1301-1305.
- Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, Fujimura A (2002). Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 41-45.
- Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* **267**, 24248-24252.
- Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* **355**, 830-833.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ (2006). Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* **44**, 1150-1157.
- Vallejo M, Castro MA, Medarde M, Macias RI, Romero MR, El-Mir MY, Monte MJ, Briz O, Serrano MA, Marin JJ (2007). Novel bile acid derivatives (BANBs) with cytostatic activity obtained by conjugation of their side chain with nitrogenated bases. *Biochem Pharmacol* **73**, 1394-1404.
- Van Aobel RA, Masereeuw R, Russel FG (2000). Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F216-232.

- van den Berge M, Polosa R, Kerstjens HA, Postma DS (2004). The role of endogenous and exogenous AMP in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 737-746.
- van der Deen M, de Vries EG, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS (2005). ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res* **6**, 59.
- van der Deen M, de Vries EG, Visserman H, Zandbergen W, Postma DS, Timens W, Timmer-Bosscha H (2007). Cigarette smoke extract affects functional activity of MRP1 in bronchial epithelial cells. *J Biochem Mol Toxicol* **21**, 243-251.
- van der Deen M, Homan S, Timmer-Bosscha H, Scheper RJ, Timens W, Postma DS, de Vries EG (2008). Effect of COPD treatments on MRP1-mediated transport in bronchial epithelial cells. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **3**, 469-475.
- van der Deen M, Marks H, Willemse BW, Postma DS, Muller M, Smit EF, Scheffer GL, Scheper RJ, de Vries EG, Timens W (2006). Diminished expression of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in bronchial epithelium of COPD patients. *Virchows Arch* **449**, 682-688.
- van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Meijer CJ, Pinedo HM, et al. (1990). Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol* **1**, 56-64.
- van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JH, Beijnen JH, Schinkel AH (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* **63**, 6447-6452.
- van Herwaarden AE, Wagenaar E, Karnekamp B, Merino G, Jonker JW, Schinkel AH (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* **27**, 123-130.
- van Klinken BJ, Oussoren E, Weenink JJ, Strous GJ, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW (1996). The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj J* **13**, 757-768.
- Van Mil SW, Milona A, Dixon PH, Mullenbach R, Geenes VL, Chambers J, Shevchuk V, Moore GE, Lammert F, Glantz AG, Mattsson LA, Whittaker J, Parker MG, White R, Williamson C (2007). Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* **133**, 507-516.
- Vicens M, Macias RI, Briz O, Rodriguez A, El-Mir MY, Medarde M, Marin JJ (2007). Inhibition of the intestinal absorption of bile acids using cationic derivatives: mechanism and repercussions. *Biochem Pharmacol* **73**, 394-404.
- Villanueva GR, Mendoza ME, el-Mir MY, Monte MJ, Herrera MC, Marin JJ (1997). Effect of bile acids on hepatobiliary transport of cisplatin by perfused rat liver. *Pharmacol Toxicol* **80**, 111-117.

- Villanueva GR, Sanchez-Abarca LI, Bravo P, el-Mir MY, Marin JJ (1995). Assessment of hepatobiliary function and placental barrier integrity in pregnant rats by combination of bromosulphophthalein and fluorescein isothiocyanate plasma disappearance tests. *Int J Exp Pathol* **76**, 183-190.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD, Schneider E (2000). Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res* **60**, 3514-3521.
- Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J (2006). Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J* **395**, 599-609.
- Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, Muller M (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* **28**, 1637-1644.
- Wacher VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ (1998). Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci* **87**, 1322-1330.
- Wakamatsu T, Nakahashi Y, Hachimine D, Seki T, Okazaki K (2007). The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins. *Int J Oncol* **31**, 1465-1472.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683.
- Wang N, Gates KL, Trejo H, Favoreto S, Jr., Schleimer RP, Sznajder JI, Beitel GJ, Sporn PH (2010a). Elevated CO<sub>2</sub> selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. *Faseb J* **24**, 2178-2190.
- Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* **275**, 33053-33058.
- Wang X, Sykes DB, Miller DS (2010b). Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* **78**, 376-383.
- Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Speidel N, Buttner R, Bihl H, Leutner CC, Heinicke T, Hohenberger P (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol* **6**, 249-251.
- Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ, Haussinger D (1999). Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol Chem* **380**, 1273-1279.

- Watanabe S, Miyairi M, Oshio C, Smith CR, Phillips MJ (1983). Phalloidin alters bile canalicular contractility in primary monolayer cultures of rat liver. *Gastroenterology* **85**, 245-253.
- Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA (2003). HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* **37**, 1249-1253.
- Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, O'Brien TR, Pfeiffer RM (2006). Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst* **98**, 873-875.
- White DJ, Gilks W (1993). The ontogeny of immune responses. *J Heart Lung Transplant* **12**, S301-308.
- Wieland T (1983). The toxic peptides from Amanita mushrooms. *Int J Pept Protein Res* **22**, 257-276.
- Wieland T, Wieland O (1959). Chemistry and toxicology of the toxins of Amanita phalloides. *Pharmacol Rev* **11**, 87-107.
- Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, Borst P (2003). Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* **278**, 17664-17671.
- Wils P, Phung-Ba V, Warnery A, Lechardeur D, Raeissi S, Hidalgo IJ, Scherman D (1994). Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochem Pharmacol* **48**, 1528-1530.
- Wilson FA, Burckhardt G, Murer H, Rumrich G, Ullrich KJ (1981). Sodium-coupled taurocholate transport in the proximal convolution of the rat kidney in vivo and in vitro. *J Clin Invest* **67**, 1141-1150.
- Wioland MA, Fleury-Feith J, Corlieu P, Commo F, Monceaux G, Lacau-St-Guilly J, Bernaudin JF (2000). CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J Histochem Cytochem* **48**, 1215-1222.
- Wittenburg H, Carey MC (2002). Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest* **110**, 605-609.
- Wood L, Palmer M, Hewitt J, Urtasun R, Bruera E, Rapp E, Thael JF (1998). Results of a phase III, double-blind, placebo-controlled trial of megestrol acetate modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance in the first-line management of small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer* **77**, 627-631.
- Wright JR, Dobbs LG (1991). Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol* **53**, 395-414.
- Wright JR, Youmans DC (1995). Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *Am J Physiol* **268**, L772-780.
- Wulf GG, Modlich S, Inagaki N, Reinhardt D, Schroers R, Griesinger F, Trumper L (2004). ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* **89**, 1395-1397.



- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S, Zhang JT (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* **279**, 19781-19789.
- Xu Y, Villalona-Calero MA (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol* **13**, 1841-1851.
- Yamaguchi Y, Shiraki K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka Y, Saitou Y, Sugimoto K, Nakano T (2005). Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Oncol Rep* **14**, 1311-1316.
- Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, Negishi M (2006). Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem* **281**, 16625-16631.
- Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N (2001). ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* **508**, 221-225.
- Yanase K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y (2006). Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett* **234**, 73-80.
- Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB (1989). Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* **264**, 782-788.
- Yoshida I, Ban N, Inagaki N (2004). Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 547-555.
- Youn CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chang IY, Chung MH, You HJ (2004). Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* **64**, 4849-4857.
- Youngblood GL, Sweet DH (2004). Identification and functional assessment of the novel murine organic anion transporter Oat5 (Slc22a19) expressed in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F236-244.
- Zanoli P (1979). Mechanism of protection with 2,4-monofurfurylidene-tetra-O-methyl sorbitol (MSF) against *Amanita phalloides* toxicity in mice. *Arzneimittelforschung* **29**, 1885-1888.
- Zarubica A, Trompier D, Chimini G (2007). ABCA1, from pathology to membrane function. *Pflugers Arch* **453**, 569-579.
- Zecca E, Costa S, Lauriola V, Vento G, Papacci P, Romagnoli C (2004). Bile acid pneumonia: a "new" form of neonatal respiratory distress syndrome? *Pediatrics* **114**, 269-272.
- Zecca E, De Luca D, Baroni S, Vento G, Tiberi E, Romagnoli C (2008). Bile acid-induced lung injury in newborn infants: a bronchoalveolar lavage fluid study. *Pediatrics* **121**, e146-149.

- Zecca E, De Luca D, Marras M, Caruso A, Bernardini T, Romagnoli C (2006). Intrahepatic cholestasis of pregnancy and neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatrics* **117**, 1669-1672.
- Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, Borst P (2003). Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* **371**, 361-367.
- Zelcer N, van de Wetering K, de Waart R, Scheffer GL, Marschall HU, Wielinga PR, Kuil A, Kunne C, Smith A, van der Valk M, Wijnholds J, Elferink RO, Borst P (2006). Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J Hepatol* **44**, 768-775.
- Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, Kruh GD (1999). Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* **59**, 5964-5967.
- Zeng H, Lin ZP, Sartorelli AC (2004). Resistance to purine and pyrimidine nucleoside and nucleobase analogs by the human MDR1 transfected murine leukemia cell line L1210/VMDRC.06. *Biochem Pharmacol* **68**, 911-921.
- Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD (2000). Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* **60**, 4779-4784.
- Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, Chuen Li S, Zhou S, Duan W, Zhu YZ (2005a). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev* **37**, 611-703.
- Zhang P, Tian X, Chandra P, Brouwer KL (2005b). Role of glycosylation in trafficking of Mrp2 in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* **67**, 1334-1341.
- Zhang Y, Zhao T, Li W, Vore M (2010). The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation. *Mol Pharmacol* **77**, 237-246.
- Zhou G, Kuo MT (1997). NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* **272**, 15174-15183.
- Zhou MT, Chen CS, Chen BC, Zhang QY, Andersson R (2010). Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. *World J Gastroenterol* **16**, 2094-2099.
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y (2008). Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* **15**, 1981-2039.
- Zimber A, Zusman I (1990). Effects of secondary bile acids on the intrauterine development in rats. *Teratology* **42**, 215-224.
- Zimber A, Zusman I, Bentor R, Pinus H (1991). Effects of lithocholic acid exposure throughout pregnancy on late prenatal and early postnatal development in rats. *Teratology* **43**, 355-361.
- Zollner G, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S, Gonzalez FJ, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M (2003a). Role of nuclear bile



- acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol* **39**, 480-488.
- Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M (2003b). Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **38**, 717-727.
- Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K, Trauner M (2001). Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**, 633-646.
- Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M (2006). Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* **3**, 231-251.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Denk H, Trauner M (2005). Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **25**, 367-379.
- Zucker SD, Goessling W (2000). Mechanism of hepatocellular uptake of albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta* **1463**, 197-208.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* **8**, 161-173.