

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

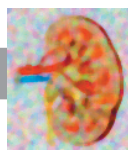
RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

1. L'APARELL RENAL



1.1. El sistema excretor

L'aparell urinari o renal té com a principal funció la d'extreure de la circulació els productes catabòlics finals i altres substàncies de desfet –provinents bàsicament del metabolisme cel·lular–, per a ser evacuades fora del cos de l'animal; el ronyó i els seus ductes associats constitueixen el principal sistema excretor dels mamífers.



FIG 1. Òrgans constituents del sistema urinari. (Adaptat de [1])

Els òrgans urinaris comprenen els ronyons, productors i secretors de l'orina, els urèters, encarregats de conduir l'orina fins a la bufeta urinària, on serà retinguda durant un temps i finalment, els urèters, conductes a través dels quals s'abocarà fora de l'organisme (veure Figura 1).

El ronyó de mamífer mostra una considerable varietat estructural entre les diferents espècies, en resposta a les demandes medi ambientals de cadascuna d'elles. En particular i com a exemple, els rosegadors del desert disposen d'unes nanses de Henle més llargues, el que els permet de reabsorbir una major quantitat d'aigua i excretar una orina sobreconcentrada. La urea és el principal producte final d'excreció (derivat del metabolisme proteic) en els mamífers, en contrast amb els rèptils o les aus, que excreten majoritàriament àcid úric, de natura més insoluble.

1.2. El Ronyó

Constitueix, com s'ha dit, l'òrgan fonamental de l'aparell urinari/excretor propi dels vertebrats, jugant un paper cabdal en el manteniment del medi intern de l'organisme. Importa i exporta grans volums d'aigua i soluts en resposta a diferents situacions fisiològiques. La unitat funcional renal és la nefrona, que es detallarà més endavant.

El ronyó duu a terme les seves accions homeostàtiques seqüencialment a través d'una filtració glomerular selectiva (mitjançada per l'elevada pressió sanguínia en el glomèrul), secreció tubular de toxines i reabsorció de substàncies metabòliques importants (aminoàcids, sucres, electròlits, etc). Tots aquests són els processos que regularan conjuntament la concentració dels productes finals del metabolisme, la pressió osmòtica, el balanç àcid-base, la composició iònica i el volum del mitjà intern.

Apart de les funcions d'excreció i d'osmoregulació típiques, els ronyons també intervenen en dos mecanismes homeostàtics de vital importància, ambdós mitjançats per hormones:

- La síntesi i secreció d'*eritropoetina*, implicada en la producció d'eritrocits per part de la medul·la òssia i que, per tant, contribueix al manteniment de la capacitat de transport d'oxigen per la sang.
- La contribució al manteniment i regulació de la pressió sanguínia, pel sistema de la *renina-angiotensina* (RAS), principalment a través de la secreció de renina, entre d'altres.

1.3. Estructura Renal

1.3.1. Anatomia general

Els ronyons són dos òrgans parells situats a la part posterior de l'abdomen sota el peritoneu (embolcallats per una massa de greix), un a cada banda de la columna vertebral. Cada un dels dos ronyons està investit per una túnica fibrosa, que forma una ferma làmina que cobreix la totalitat de l'òrgan. En humans –i en la majoria de mamífers–, cada ronyó està alimentat normalment per una sola artèria renal (tot i no ser desconeixuda l'existència de diverses arterioles accessòries); aquesta emana directament de l'aorta abdominal de manera que rep la sang arterial a la màxima pressió disponible.

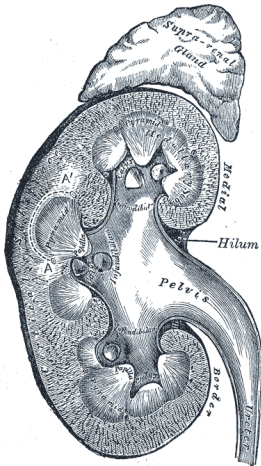


FIG. 2. Secció vertical del ronyó. (Adaptat de: Henry Gray, "Anatomy of the human body", bartleby.com, [2])

Si realitzem un tall longitudinal del ronyó, podrem identificar diverses zones: una regió pàl·lida externa (l'escorça o còrtex) i una regió interna més fosca (la medul·la). La substància medul·lar apareix com una sèrie de masses estriades còniques de color vermellós, anomenades piràmides renals, les bases de les quals es dirigeixen cap a la divisòria corticomedul·lar, mentre que els seus àpex convergeixen cap al sinus renal que és la cavitat central d'on emanen. En la majoria de mamífers petits, com els rosegadors, el ronyó consta d'una única piràmide renal (anomenant-se unipapil·lar). Els ronyons més grans com els del gos o els de l'home, en canvi, presenten múltiples papil·les. A l'engròs, doncs, la subdivisió elemental del ronyó es pot realitzar (de fora cap a dins) en les zones cortical i medul·lar, amb aquesta última regió subdividida alhora en part interna i part externa.

1.3.2. La nefrona

El ronyó mamífer està construït a partir d'un gran nombre d'unitats funcionals anomenades nefrones. Cada nefrona (o nefró) consisteix essencialment en el corpuscle renal, l'aparell juxtaglomerular, el túbul proximal, la nansa de Henle i el túbul distal. Un ronyó humà conté ~1 milió de nefrones, en contrast amb les ~30.000 de que disposa un ronyó típic de rata adulta. Podem dividir funcionalment la nefrona en segments; cada segment nefronal desenvolupa unes funcions específiques i diferents (que vindran donades i estaran mantingudes, en darrer terme, pel gens expressats a cada segment).

Dins la massa renal es poden identificar dues poblacions principals de nefrones: unes que posseeixen una nansa de Henle reduïda i unes altres amb una nansa de Henle molt més llarga, i que dependrà generalment de la posició (profunditat) en el còrtex dels seus corresponents glomèruls, distingint entre nefrones corticals i nefrones juxtamedul·lars.

El corpuscle renal

Els túbuls renals s'inicien en unes estructures pseudoesfèriques anomenades corpuscles renals. Aquests petits cossos arrodonits es componen de dues parts: un glomèrul central constituït per un cabdell de vasos i capil·lars, i una coberta membranosa –la càpsula glomerular o de Bowman–, que constitueix el

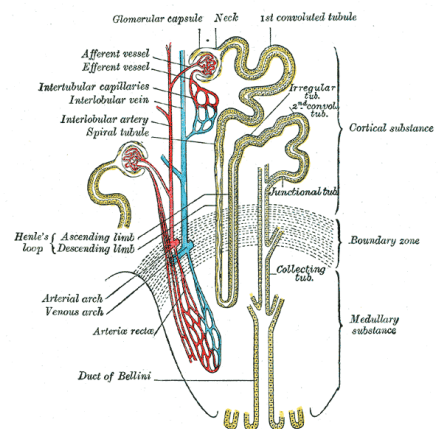


FIG. 3. Esquema del nefró. Es mostren els túbuls renals i la seva vasculatura associada. (Adaptat de: Henry Gray, "Anatomy of the human body", bartleby.com, [2])

començament del túbul proximal.

El GLOMÈRUL és una maranya lobulada de capil·lars sanguinis entortolligats, mantinguda unida per teixit connectiu espars. Aquest cabdell capil·lar deriva d'un petit brot arterial, el vas o arteriola *aferent*, que penetra dins de la càpsula (generalment per el punt oposat on aquesta connectarà amb el túbul) i emergeix de la càpsula pel mateix punt en forma de vena resultant, el vas o arteriola *eferent*; el vas *aferent* sol ser el més gran dels dos. La CÀPSULA DE BOWMAN, que embolcalla al glomèrul, consisteix en una membrana basal on s'assenten una capa contínua de cèl·lules epitelials aplanades. Aquesta capa cobreix la superfície sencera del glomèrul formant una delicada membrana, l'interior de la qual rebrà el drenat sanguini que circula i exsuda per les arterioles glomerulars.

El túbul proximal

Els tubs renals proximals neixen abruptament en el pol urinari dels glomèruls. Cada túbul individual consisteix, com el seu nom indica, en un llarg segment cilíndric (~8 mm de longitud en la rata, i uns 40 µm de diàmetre exterior) de trajectòria enmaranyada que desemboca a la nansa de Henle; pel seu interior circula i madura inicialment el filtrat glomerular que al final de tot el recorregut serà conegut com a orina. Topològicament es distingeix en dos components: en la seva part inicial cortical s'entortolliga conformant l'anomenada *pars convoluta*, que és la immediata continuació de l'epiteli parietal de la càpsula de Bowman; va seguida d'una part final més o menys rectilínia, la *pars recta*, que s'endinsa cap a zones més internes en les projeccions medul·lars.

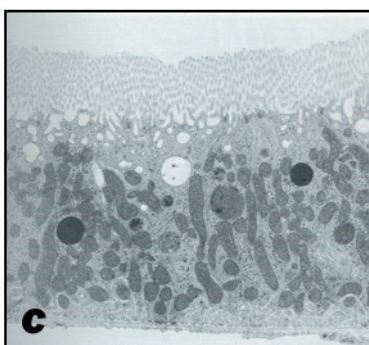
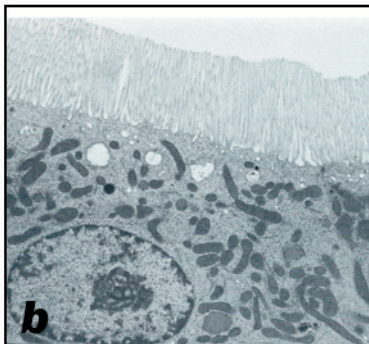
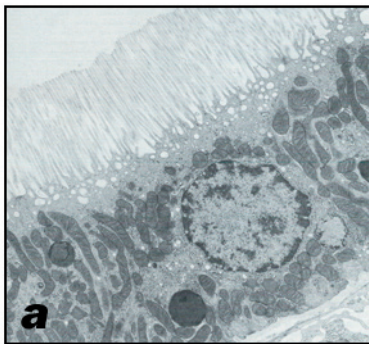


FIG 4. Segments del túbul proximal renal. Micrografies electròniques de transmissió dels segments S_1 (a), S_2 (b) i S_3 (c), del túbul proximal de rata (X10.600). (Adaptat i modificat de: Brenner, B.M., "The Kidney", [3])

En rata i ratolí, conill o en alguns simis (mona *Rhesus*)—però no en humans—, es poden distingir en el túbul proximal corresponent tres segments morfològicament diferenciats: el S_1 , el S_2 i el S_3 . El segment S_1 és la porció inicial del túbul proximal, que comença en el glomèrul i transcorre en la *pars convoluta*, constituint-ne aproximadament les 2/3 parts de la mateixa. El segment S_2 cobreix el remanent (l'últim terç) de la *pars convoluta* o contornejada i la part inicial de la *pars recta*. Finalment el segment S_3 representa l'últim tram del túbul proximal, concretament el que queda de la part recte, localitzat en el còrtex intern profund i la part externa de la medul·la externa.

Cadascun d'aquests tres segments en els que subdividim el túbul, està format pels seus propis tipus cel·lulars epitelials, coneguts també com a S_1 , S_2 i S_3 , les característiques morfològiques dels quals s'indiquen a la figura 4; en el ronyó humà, com s'ha dit, només es distingeixen positivament les parts contorta i recta.

La cèl·lula tubular epitelial prototípica és de forma columnar amb una membrana apical *brush border* altament desenvolupada. La cèl·lula reposaria sobre una membrana basal que li serveix d'adhesió i suport. El seu citoesquelet submembranós està molt organitzat i especialitzat per interaccions amb la membrana plasmàtica i amb proteïnes d'adhesió. La cèl·lula està remarcablement polaritzada, i aquesta compartimentalització apical-basolateral és essencial per la funció normal del túbul.

En la rata –i per extensió en el ratolí– les característiques estructurals que distingeixen els tres subsegments citats anteriorment han estat descrites amb detall [3]. El segment S_1 conté unes cèl·lules amb una ample membrana apical de tipus *brush border* i un sistema vacuolar-lisosomal ben desenvolupat. La membrana plasmàtica basolateral conforma extenses invaginacions laterals, observant-s'hi amb microscopia electrònica nombrosos esdeveniments i processos endocítics o pinocítics laterals. També s'aprecien concentrades en les immediateses de la membrana plasmàtica un alt nombre de mitocòndries de tipus elongat, arranament característic dels epitelis implicats en transport actiu. La ultraestructura del segment S_2 és similar al de les cèl·lules S_1 , però aquí la membrana *brush border* és més estreta, les invaginacions no són tan prominents i les mitocòndries són més menudes. En el segment S_3 , els fenòmens i processos laterals són virtualment absents, amb les mitocòndries són menors encara i repartides aleatòriament dins la cèl·lula.

PARS CONVOLUTA. Consisteix en la primera porció del túbul proximal sorgit des de el glomèrul i compren la totalitat del segment S_1 . Les cèl·lules individuals de la part contorta són de forma extremadament complexa. A partir del cos cel·lular principal, emergeixen grans crestes des de la superfície apical cap a la superfície basal de les cèl·lules. Les mitocòndries apareixen al microscopi electrònic llargues i tortuoses, localitzant-se en els processos cel·lulars laterals pròxims a la membrana plasmàtica. Les cèl·lules presenten una membrana apical molt desenvolupada, amb nombroses projeccions en forma de dit, els *microvilli*, que conformen l'anomenat *brush-border* o *membrana de respall*. Les cèl·lules de la part *convoluta* estan dotades d'un aparell endocític-lisosomal molt desenvolupat, amb un compartiment endocític prominent, implicat en la reabsorció i la degradació de les macromolècules del ultrafiltrat. També consten d'un gran nombre de lisosomes, que contenen una varietat d'enzims hidrolítics com fosfatases, hidrolases àcides i glicosidases.

PARS RECTA. La part recte del túbul proximal consisteix en la porció terminal del segment S_2 i el segment S_3 sencer. L'epiteli d'aquest últim segment és més simple que el dels dos segments previs, S_1 i S_2 (*veure figura 4*). Com ja s'ha dit, les seves cèl·lules manquen d'invaginacions laterals, disposen de mitocòndries més petites i escampades a l'atzar, i els espais intercel·lulars són menors i menys complexes. Totes aquestes característiques morfològiques suggereixen que aquest segment pot estar menys implicat en la reabsorció d'aigua i soluts. Els peroxisomes són comuns en les cèl·lules de la part recte, suposant que juguen algun paper en el metabolisme lipídic i en la β -oxidació d'àcids grassos. La *pars recta* també està implicada en la secreció d'àcids i bases orgàniques, resultant sovint danyada per compostos nefrotòxics –incloent-hi varies drogues i metalls pesats.

La nansa de Henle

Es tracta d'un segment del túbul renal en forma de nansa, situat entre el túbul proximal i el túbul distal, que penetra profundament en la medul·la renal. Està constituïda per una primera branca descendent, una branca prima ascendent i una branca gruixuda ascendent. Reabsorbeix prop d'un 25% dels ions sodi i clor filtrats i un 15% d'aigua. La sortida preferent de sodi en relació amb l'aigua determina una hipertonia de l'interstici renal, indispensable per a concentrar o diluir l'orina i mantenir el balanç hídric de l'organisme.

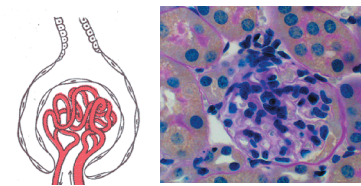


FIG 5. El glomèrul. il·lustració del corpuscle renal (a), al costat de la imatge d'una estructura glomerular observada al microscopi òptic (b), en un tall histològic renal de ratolí tenyit amb hematoxilina-eosina / PAS (X240)

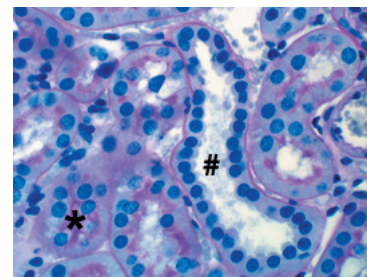


FIG 6. Secció histològica del ronyó (detall). Tall histològic renal de ratolí tenyit amb hematoxilina-eosina / PAS (X240). S'indica el lumen d'un túbul proximal (*), i d'un túbul distal (#), respectivament.

Els túbuls distals i col·lectors

El túbul distal, continuació de la nansa de Henle, és la part final dels túbuls excretors del ronyó, que drenen llur contingut d'orina en els tubs col·lectors. El túbul distal està compost morfològicament de tres segments diferenciats: la branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle, la màcula densa (localitzada a l'aparell juxtaglomerular), i el túbul contort distal.

MÀCULA DENSA. Zona de cèl·lules de tinció especial amb un aspecte diferenciat, localitzada a l'epiteli del túbul renal quan entra en contacte amb el pol vascular del glomèrul. Anatòmicament i funcionalment està associada a les cèl·lules juxtaglomerulars de l'arteriola aferent i la seva missió és d'actuar de quimiorceptor.

TÚBUL CONTORT DISTAL. És la porció tortuosa del túbul distal del ronyó, situada íntegrament al còrtex renal, que dreña el seu contingut en el tub col·lector. Reabsorbeix la major part dels ions sodi i clor filtrats que no han estat reabsorbits en el túbul proximal o en la nansa de Henle. La reabsorció del sodi és activa, mitjançant la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$, mentre que la reabsorció de clor és passiva. És poc permeable a l'aigua i gairebé insensible a l'acció de l'hormona antidiürètica, llevat de la seva porció més terminal. Secreta H^+ per mitjà d'una bomba de protons –funció potenciada per l'aldosterona. També secreta ions potassi de forma generalment passiva.

TUB COL·LECTOR. Estructura tubular del ronyó que recull l'orina procedent de diversos túbuls contorts distals, és a dir, de diverses nefrones, que conflueix amb altres tubs col·lectors i desemboca finalment en la papil·la renal amb la denominació de conducte papil·lar de Bellini. Es compon de dos segments, un de cortical i un altre de medul·lar. Reabsorbeix ions, sodi i clor, per bé que en menor proporció que en els túbuls renals. Reabsorbeix també aigua segons l'acció de l'hormona antidiürètica, determinant l'excreció final de sodi per l'orina i, per tant l'excreció d'aigua en relació amb les necessitats de l'organisme i el manteniment del balanç hídric. En el segment cortical es produeix secreció d'ions potassi, en relació amb la reabsorció de sodi, i secreció d'hidrogenions i ions amoni (acidificació distal del nefró). En el segment medul·lar també hi ha secreció d'hidrogenions i ions amoni alhora que es reabsorbeixen ions bicarbonat.

L'aparell juxtaglomerular

L'aparell juxtaglomerular està localitzat en el pol vascular del glomèrul, on una porció del tub distal de la mateixa nefrona entra en contacte amb el seu glomèrul parental. Aquell punt és on resideix la macula densa, que esdevé una regió especialitzada de la nansa prima ascendent de Henle (l'adjacent al glomèrul). L'aparell juxtaglomerular s'encarrega principalment de la regulació de la pressió arterial a través del control de l'eix renina-angiotensina (sistema RAS), mitjançant la secreció de renina.

1.3.3. Nefrogènesi

Degut a l'extraordinària complexitat estructural i funcional de la nefrona dels mamífers, no es gens estrany que llur procés de desenvolupament es produeixi en unes sèries d'esdeveniments fortament coordinades, que donaran lloc a la constitució d'un sistema urinari plenament actiu. En comparació amb altres òrgans, el desenvolupament del ronyó i el sistema excretor es realitza de manera tardana dins l'embriogènesi. Durant el desenvolupament i al llarg de la vida embrionària es succeeixen tres sistemes excretors, derivats inicialment a partir d'una massa cel·lular intermèdia mesodèrmica: el pronefre, el mesonefre i el metanefre (anomenat també *ronyó permanent*).

La major part d'informació de que es disposa sobre embriologia renal prové, per raons obvies, d'estudis realitzats en rosegadors. Resumidament, en el ratolí el desenvolupament metanèfric s'inicia aproximadament als voltants del dia 11 de gestació; l'esdeveniment clau és la transinducció mútua entre les cèl·lules mesenquimals metanèfriques i les cèl·lules epitelials del bulb uretèric (una branca caudal del conducte Wolffia). Un cop iniciada la inducció, les cèl·lules mesenquimals indiferenciades migren i es condensen al voltant de les puntes de la uretra naixent, patint aleshores una conversió cap un fenotip epitelial, transformant-se i diferenciant-se al final per a donar lloc a un corpuscle renal rudimentari (Fig. 7). Paral·lelament, el bulb uretèric o uretral s'expandeix i creix amb un patró centrífug, bifurcant-se pel còrtex en expansió. Tot el desenvolupament morfològic d'aquesta nefrona immadura es verifica més o menys cap al dia 17 gestacional, completant-se definitivament durant el període perinatal.

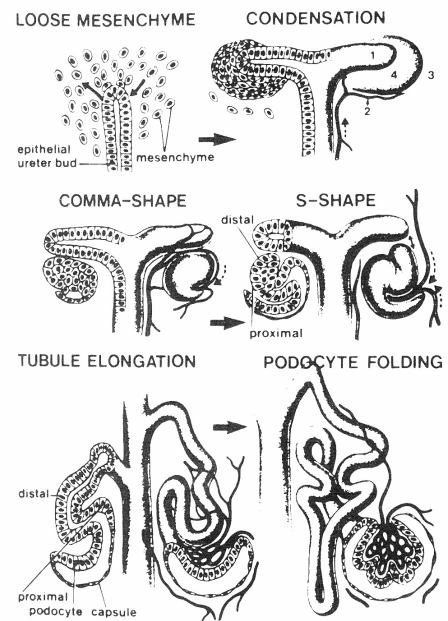


FIG 7. Desenvolupament esquematitzat de la nefrona. Com es descriu simplificadament en el text, de l'estimulació mútua entre el mesènquima metanèfric i el bulb uretèric en resulten una sèrie de passos molt ben definits que conduiran a la formació de la nefrona (Adaptat de: Brenner, B.M. "The kidney", [4])

1.4. Aspectes funcionals

El ronyó humà produeix diàriament ~150-180 L d'ultrafiltrat aclarit de proteïnes. Els túbuls renals processen aquests grans volums de filtrat essencialment per aconseguir tres objectius principals, resumidament:

- i) Conservar els nutrients essencials (glucosa, aminoàcids, vitamines, ions, intermediaris i metabòlits del cicle de Krebs i d'altres)
- ii) Eliminar els compostos i les substàncies potencialment tòxiques per l'organisme (àcids i bases orgàniques, NH_4^+ , K^+ , equivalents àcids, etc.)
- iii) Reduir al màxim les quantitats d'aigua i sal (Na^+ , Cl^-) excretades i per tan perdudes en l'orina final, usualment fins a menys d'un 1% del filtrat.

La conservació dels nutrients essencials ocorre primàriament en la primera porció del túbul proximal, mentre que la secreció d'anions i cations orgànics es duu a terme majoritàriament en la part mitjana del túbul. El bicarbonat (HCO_3^-) filtrat, en contrast, es reabsorbeix extensivament a tot el seu llarg. El fluid que abandona el túbul proximal després de recorre'l és una solució de NaCl que conté petites quantitats de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , urea, HCO_3^- i substàncies orgàniques secretades, havent-se reduït aproximadament a la meitat del volum filtrat inicialment –i mantenint més o menys la mateixa osmolaritat. En les parts més distals de la nefrona els processos de reabsorció predominants són els de clorur de sodi, el que habilita altres funcions de transport paral·leles: excreció de l'excés d'aigua com a orina diluïda / o conservació d'aigua a través de la producció d'orina conservada, reabsorció de calci i magnesi, i secreció de potassi i d'àcid (protons).

Aspectes metabòlics (del transport d'ions)

L'àvida reabsorció d'aigua i soluts per part del ronyó, així com la secreció activa de determinats metabòlits de desfet i xenobiòtics, és un procés que requereix energia. En el ronyó humà, aproximadament 180L d'ultrafiltrat passen diàriament per el lumen dels túbuls nefronals, del qual més d'un 99% serà activament reabsorbit per les cèl·lules epitelials abans de perdre's per l'orina. Per processar aquestes grans càrregues diàries de soluts filtrats i d'aigua, el ronyó té que mantenir unes taxes altíssimes de producció i utilització d'energia. Aquest elevat bescanvi energètic està corroborat pel consum d'oxigen del teixit, segon en importància després del cor. Com es veu, doncs, existeix una connexió directe entre el transport renal i el metabolisme, de manera que aquest últim està fortament acoblat a la generació d'energia pels processos metabòlics cel·lulars.

El transport actiu primari de ions està mediat per una família d'ATPases integrals de membrana que hidrolitzen ATP com a font d'energia, per transportar Na^+ , K^+ , H^+ i Ca^{2+} . D'entre totes elles, l'ATPasa de Na^+/K^+ o "bomba de sodi-potassi" és la que consumeix una major demanda energètica (60-80%). Per satisfer aquesta demanda primària d'ATP, el ronyó es recolza principalment en la fosforilació oxidativa mitocondrial, preferint substrats per oxidar com àcids grassos lliures, cossos cetònics, glutamina, o lactat; és a dir, el ronyó presenta fonamentalment un metabolisme oxidatiu (aeròbic) més que anaeròbic/glicolític. Tot i ser essencialment en conjunt un òrgan gluconeogenic més que glicolític –sobretot el còrtex renal (*i.e.* tubul proximal)–, i malgrat presentar unes taxes gluconeogèniques molt elevades, el ronyó exportarà finalment només una petita fracció de la glucosa generada en el seu si, com a conseqüència de que les cèl·lules del túbul distal consumeixen la majoria de glucosa sintetitzada als túbuls proximals. La gluconeogènesi, però, constitueix la característica metabòlica del túbul proximal.

En resum, és important destacar la concepció dinàmica de la base metabòlica del transport iònic per part de la nefrona, que pot adaptar-se a canvis en les condicions ambientals (dieta, fàrmacs, hormones) o fisiopatològiques, tot implicant modificacions en els processos de transport, bioquímics i de morfologia cel·lular.



2.1. Consideracions generals

La integració funcional d'un organisme complex està basada en gran part en el funcionament coordinat de totes llurs cèl·lules. L'establiment d'aquesta exquisida coordinació requereix una xarxa de senyalitzacions eficients, capaç de controlar o orquestrar d'una manera extraordinàriament precisa el funcionament cel·lular. Les senyals endocrines, constituïdes per les hormones, representa el principal grup de senyals bioquímiques que arriba a les cèl·lules. D'entre totes elles, les hormones esteroidals en constitueixen un grup particular que comprèn un nombrós conjunt de productes naturals estructuralment relacionats, implicat en el control de diversos processos de desenvolupament en eucariotes, ultra mediar respostes fisiològiques varies sota diferents estímuls.

Basant-se en la seva funció biològica, podem identificar principalment tres tipus principals d'esteroides:

- els esteroides exclusivament adrenals (mineralcorticoides i glucocorticoides)
- els esteroides sexuals i reproductius (andrògens, estrògens i progestàgens)
- la vitamina D i els seus metabòlits derivats

Els primers tenen influència sobre l'homeostasi del cos, intervenen en les respostes d'estrès, controlen el metabolisme glucídic, promouen la retenció per l'organisme d'aigua i de sodi, facilitant l'excreció de potassi. També tenen efectes escampats sobre el sistema immune i nerviós, intervenen en la inflamació, etc.

Les hormones sexuals són les responsables del desenvolupament i diferenciació embrionaris així com de l'adquisició dels caràcters sexuals secundaris. Finalment, la vitamina D, és requerida en el metabolisme del calci.

2.2. Regulació de l'expressió gènica per les hormones esteroidals

La regulació de l'expressió gènica mediada per les hormones esteroidals ha anat guanyant un progressiu interès en els últims anys, fins arribar a esdevenir un camp tradicional de l'endocrinologia molecular [5-8]. Les hormones esteroidals clàssiques, com els glucocorticoides, estrògens, andrògens, la progesterona i els minerlocorticoides, són sintetitzades i secretades per les glàndules endocrines, viatgen a través de la circulació sanguínia fins a les seves cèl·lules diana, penetrant-hi per difusió simple o facilitada. Un cop a l'interior cel·lular s'uneixen als seus receptors específics [7], generant les respostes biològiques que els hi són pròpies, essencialment mitjançant l'estimulació de la síntesi de mRNA a nivell de la iniciació de la transcripció gènica. Actualment s'accepta que els esteroides funcionen primàriament modulant la transcripció gènica en les cèl·lules diana. La regulació transcripcional exercida a aquest nivell constitueix, doncs, un dels principals mecanismes de regulació gènica en eucariotes.

La *figura 8* resumeix esquemàticament la seqüència d'etapes necessàries per fer efectiva l'acció de l'hormona: donada la natura lipofílica de la molècula esteroïdal, aquesta circula unida a proteïnes transportadores, de les que s'han de dissociar per tal de poder penetrar dins la cèl·lula; generalment es considera que l'hormona travessa la membrana plasmàtica per difusió simple, tot i que en alguns casos poden existir fenòmens d'exportació o de captació activa [9].

Un cop dins de la cèl·lula diana l'hormona pot interactuar amb el seu receptor, que és la molècula clau mediadora de l'acció hormonal. Els receptors desocupats poden trobar-se ja en el nucli o bé en el

citoplasma, complexats amb proteïnes de plegament que els mantenen en un estat “inactiu”. La unió del lligant hormonal al receptor provoca la dissociació de les chaperones associades, resultant un canvi conformacional al·lostèric que el fa competent per poder-se unir amb elevada afinitat a llocs acceptors de la cromatina, en el veïnatge dels gens diana. Això es produeix a través de la seva unió directe a receptors intracel·lulars, que són específics per a cada tipus d'hormona i que funcionen com a factors de transcripció induïbles per unió de lligant. La unió de l'esteroides provoca canvis conformacionals en el receptor que

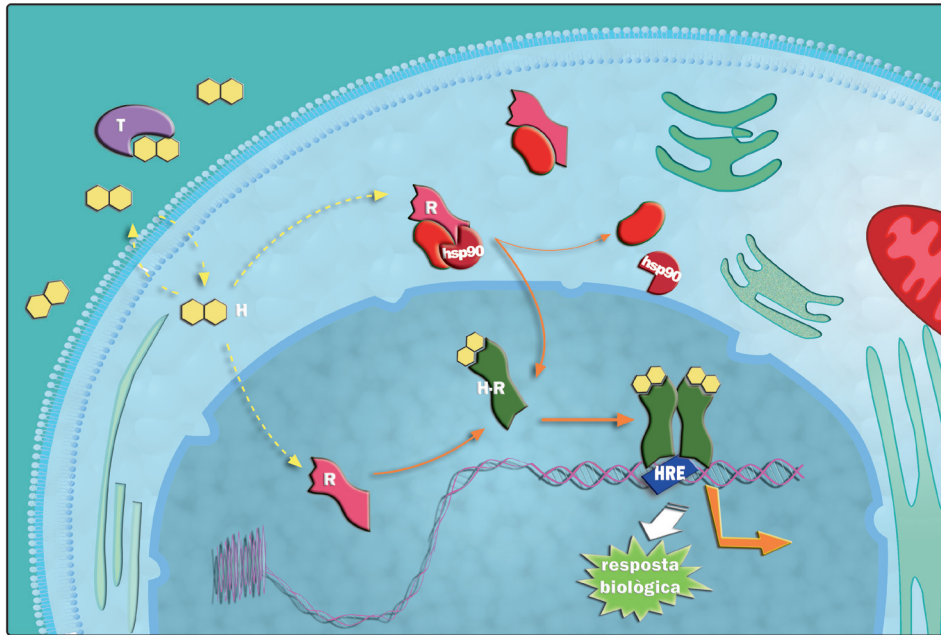


FIG 8. Model general simplificat dels mecanismes d'acció de les hormones esteroidals. Les hormones (*H*) circulen majoritàriament unides a proteïnes transportadores (*T*), penetrant dins la cèl·lula per difusió; un cop a dins interaccionaran amb llurs receptors específics (*R*), que poden residir en el nucli i/o en el citoplasma (segons el cas), existint en forma de complexos amb chaperonines com la hsp90. La unió de l'hormona provoca la dissociació del receptor del complex citoplasmàtic, la seva translocació a dins el nucli i dimerització. Els dímers hormona-receptor (*H-R*) s'uniran a elements de resposta específics en el DNA (*HRE*), provocant la transactivació dels seus gens diana.

resulten en una transició cap un estat “activat” en el qual el complex hormona-receptor presenta una elevada afinitat per determinats llocs acceptors de la cromatina. La interacció en el nucli entre el complex activat i els elements reguladors del DNA usualment produeix la inducció de la síntesi de RNA missatger del gen (o gens) pròxims, resultant finalment en la producció apropiada de proteïnes que alteraran la funció, creixement o diferenciació cel·lular. En certs casos (*i.e.* receptor de T_3), la unió del receptor al DNA serveix per inhibir més que per activar la transcripció gènica.

2.3. La superfamília de receptors nuclears

Els receptors nuclears d'hormones esteroidals/tiroidals/retinoides –mediadors de la majoria d'activitats biològiques de les corresponents hormones–, constitueixen una voluminosa superfamília gènica amb un nombre de membres sorprenentment elevat que la converteix en la família de factors de transcripció més gran coneguda en eucariotes [7]. Inclou entre els seus membres als receptors dels esteroides: estrògens (ER), andrògens (AR), progesterona (PR), glucocorticoides (GR) i de mineralcorticoides (MR). També s'hi inclouen els receptors d'hormona tiroidal (TR), de vitamina D_3 (VDR), d'àcids *–tot trans–* retinoic i 9-*cis*-retinoic (RAR i RXR, respectivament) i ecdisona (EcR) (per una revisió detallada veure [10-11]). A

més dels abans esmentats, que constitueixen només un petit *subset* de la superfamília, en els últims anys s'han clonat un nombrós contingent de nous gens d'estructura relacionada amb els anteriors, suggerint-se que es tractava de receptors críptics i que funcionarien d'una manera anàloga a la descrita pels receptors esteroïdals/tiroïdals clàssics. S'han anomenant receptors nuclears orfes o simplement “receptors orfes”, donat que per molts d'ells encara no es coneixen el putatiu lligants ni la funció. Com a exemples podem esmentar els receptors PPAR (*Peroxisome-proliferator Receptor*), el PXR (*Pregnane X Receptor*) o el AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) entre d'altres [12].

Tota aquesta vasta superfamília de receptors nuclears proveeix als organismes pluricel·lulars d'una manera directe de control de l'expressió gènica, en resposta a una gran varietat d'estímuls ambientals, fisiològics i epigenètics. Actualment està reconegut que la seva activitat pot estar controlada com a mínim mitjançant tres mecanismes diferents, essencialment:

- i) Unió del receptor (o del seu *acompanyant* en un complex heterodimèric) amb el seu petit lligant lipofílic.
- ii) Modificació covalent de la molècula receptora (usualment per fosforilació), promoguda per esdeveniments a nivell de membrana o durant el cicle cel·lular.
- iii) Interaccions proteïna-proteïna amb d'altres factors de transcripció, co-activadors o repressors.

Cal fer notar que algunes respostes generades pels receptors són massa ràpides per involucrar canvis en la transcripció gènica, considerant en aquests casos que es tractarien d'accions no genòmiques [13].

2.3.1. Característiques estructurals

Els receptors de la superfamília d'hormones esteroïdals/tiroïdals presenten una estructura característica altament conservada, composta per quatre mòduls funcionals independents però interactius entre ells. Un rigorós anàlisi seqüencial aminoacídica i múltiples experiments de mutagènesi han premès dissecar la seva anatomia en els següents dominis: (*indicat a la figura 9*)

- *El domini modulador N-terminal*. També anomenat *domini A/B*, és altament variable entre els diferents membres de la família, tan a nivell de seqüència primària com de llargària. Usualment, aquest domini conté la funció transactivadora coneguda com a AF-1 (*activation function domain 1*), responsable de l'activació dels gens diana presumiblement per interacció amb la maquinaria basal de transcripció, coactivadors o d'altres transactivadors.
- *El domini d'unió a DNA (domini C)*. És el domini més conservat entre tots els receptors nuclears. Està compost per dos dits de zinc de tipus II codificats per uns 66-70 aminoàcids, amb quatre cisteïnes cadascuna d'elles encarregades de coordinar-se amb els àtoms de Zn^{2+} i conformar el seu plegament característic; l'extensió del C-terminal d'uns 25 residus –anomenada CTE (*C-terminal extension*)– és el domini responsable de la unió al DNA i de la dimerització.
- *Domini frontissa (domini D)*. El domini C està seguit per una regió D menys conservada que actua de frontissa (*hinge*) flexible, el que permet la mobilitat i reconformació dels altres mòduls al produir-se la unió del lligant.



FIG 9. Estructura tridimensional del domini d'unió a DNA del Receptor d'estrògens (ER). S'indiquen les diferents parts del receptor implicades en l'interacció amb la doble hèlix de DNA. (Extret de http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec/dbd_big.gif a la web de la Universitat de Illinois <http://www.ks.uiuc.edu/>)

- *Domini d'unió a lligant (domini E)*. Es tracta d'un complex domini multifuncional de grandària relativament elevada (~250 aa) situat al extrem C-terminal del polipèptid que intervé en: la unió del lligant, la dimerització, la interacció amb *heat shock proteins*, la localització nuclear, i amb

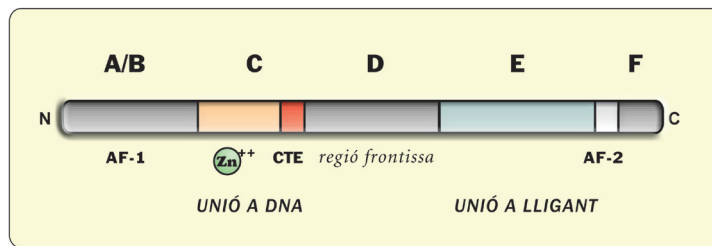


FIG 10. Estructura esquemàtica dels receptors d'esteroides. Es mostren els diferents dominis funcionals modulars en que pot dividir-se llur estructura. (veure el text per una descripció més detallada)

funcions transactivadores, entre d'altres. El domini major de dimerització situat en aquest mòdul funcional E és ric en leucines, que s'estructuren en forma de “cremallera de leucines” al donar-se la dimerització entre els dos receptors a través de l'esmentada regió. A l'extrem del domini E es situa la segona funció transactivadora de la molècula, anomenada AF-2.

- *Domini F*. Finalment, trobem localitzada a l'extrem final –només d'alguns receptors de la família– la regió variable F, per la qual encara no s'ha pogut establir una funció determinada.

2.3.2. Factors d'influència en l'activitat dels receptors nuclears

PROTEÏNES REGULADORES. Malgrat poder actuar per contacte directe amb la maquinària basal de transcripció, els receptors nuclears obtenen probablement un major impacte transcripcional mitjançant la interacció amb proteïnes reguladores o coreguladores que s'uneixen als receptors nuclears dins la cromatina, actuant de pont i d'enllaç amb la maquinària transcripcional. Segons l'efecte produït sobre la transcripció, podem distingir dos classes de proteïnes reguladores: els *coactivadors*, que tenen la capacitat d'augmentar l'activitat dels gens regulats pels receptors nuclears i les proteïnes amb capacitat silenciadora, els *corepressors*.

Aquest conjunt de proteïnes reguladores activadores interaccionen usualment sobre els receptors d'una manera dependent de lligant, interactuant amb els receptors ocupats pel seu lligant, però no amb els desocupats [14]; en altres casos la interacció es pot donar sense la presència de lligant, mitjançant fosforilació del receptor o a través del reclutament de coactivadors independentment de la prèvia unió del lligant hormonal. Els corepressors, també s'uneixen seleccionadament als receptors desocupats (o ocupats per fàrmacs antagonistes), en aquest cas produïnt la silenciament de llur activitat [15].

FOSFORILACIÓ. Un procés addicional majoritari que pot influenciar i augmentar l'activació dels receptors nuclears és la fosforilació del propi receptor. Els receptors d'hormones esteroidals són proteïnes altament fosforilades [7], l'estat d'activació de les quals pot estar estretament lligat no només a al grau d'unió al seu lligant sinó també al propi nivell de fosforilació. D'aquesta manera, la cèl·lula pot integrar tan les senyals nuclears directes produïdes pels diferents lligands hormonals com les senyals que provenen d'altres vies de senyalització, originades en els receptors de membrana.

EFFECTES DE LA CROMATINA. L'estructura de la cromatina pot jugar un paper modulador molt important *in vivo* en la transcripció gènica. L'interacció dels factors de transcripció amb els elements *cis* presents en el DNA es veu alterat per la conformació i organització local de la cromatina, així com de la disposició nucleosomal. Un exemple molt ben estudiat correspon al promotor del MMTV, en el qual s'ha demostrat que el receptor de glucocorticoides –en presència de l'hormona– pot interaccionar amb la regió *enhancer*

del promotor. La interacció indueix una remodelació nucleosomal que permetrà l'accés d'altres factors de transcripció, com el NF-1, per interaccionar amb llurs elements de resposta ara exposats, conduent a la transcripció del gen [16].

En definitiva, tots aquest aspectes reflexen la complexitat en la regulació de l'expressió gènica eucariòtica, que en el cas dels receptors nuclears, poden exercir la regulació sobre els seus gens diana a través d'un ampli rang de mecanismes i nivells reguladors.

2.3.3 Interaccions amb el DNA

Les seqüències genòmiques reguladores situades en els gens diana, que recluten al complex activat hormona-receptor i que medien la seva acció, s'anomenen elements de resposta a hormona (*hormone response elements*, HRE). Aquestes seqüències de DNA defineixen amb precisió els llocs acceptors específics on s'uniran els receptors.

Els "dits de zinc" del receptor formen la interfície principal entre el domini d'unió a DNA del receptor i els nucleòtids específics del HRE, que constitueix el seti acceptor. Diferències subtils en els aminoàcids constituents d'aquest domini poden determinar la preferència per un HRE o per un altre. Mitjançant tècniques espectroscòpiques ($^1\text{H-RMN}$) i cristal·logràfiques (difracció de raigs X) s'ha pogut descriure un model estructural de com es produeix la interacció específica entre el domini d'unió a DNA del receptor i el DNA. En aquest model, dos receptors ocupats i formant un dímer interaccionen –a través de l'hèlix A de cada receptor (que conté el dit de zinc)– amb el solc gran del DNA.

Els HRES es caracteritzen generalment per ser palíndroms imperfectes hexanucleotídics separats sovint per varis nucleòtids espaiadors, suggerint-se que els receptors s'hi uneixen com a dímers que interaccionarien cada un amb la corresponent part simètrica de l'element.

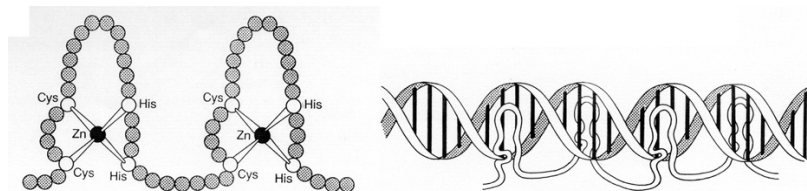


FIG 11. Dits de zinc dels receptors nuclears. Representació genèrica de la conformació proposada pels motius "dits de zinc", presents en els dominis d'unió dels receptors esteroidals. S'il·lustra esquemàticament la seva interacció amb el solc del DNA. (Modificat de: *Hormones*, 2nd Ed., pp.42, [17])

El primer HRE fou l'element de resposta a glucocorticoides (GRE) identificat en el *long terminal repeat* del virus de tumors mamaris murí (*mouse mammary tumor virus*, MMTV) [18], observant-se posteriorment que aquesta mateixa seqüència podia funcionar d'element de resposta també per altres receptors [19]. El GRE consisteix en dos curts palíndroms imperfectes, orientats de forma invertida i separats per tres nucleòtids. Els receptors de MR, PR i AR també reconeixen aquest mateix element [7]. L'element de resposta a estrògens és similar al GRE canònic, mantenint l'espaiador trinucleotídic. El grup de receptors d'hormones tiroïdals/retinoids/vitamina D₃ tenen uns requeriments menys estrictes en referència al espaiadors de llurs elements de resposta, podent variar des de no tenir-ne cap a tenir-ne fins a 7 nucleòtids separadors entre els mitjos palíndroms.

Mentre que els GR, AR, MR, PR i ER s'uneixen al DNA com homodímers i reconeixen elements de resposta palindròmics (repeticions orientades inversament), altres receptors com el TR, RAR, VDR o RXR reconeixen repeticions directes de la seqüència AGGTCA, espaiada per diferents longituds segons el cas (*veure taula 1*) (el bloc AGGTCA_nAGGTCA s'anomena DR-1, repetició directe amb un sol nucleòtid

espaiador; DR-2, dos nucleòtids espaiadors i així successivament). Cal notar que aquest últim grup de receptors s'uneix amb major afinitat com a heterodímers (de RXR) que com a homodímers. Tan aquest últim grup com en el dels receptors d'hormones gonadals/adrenals (excepte pel ER) existeix una certa promiscuïtat en la unió, podent unir-se varis receptors als mateixos elements amb afinitats similars.

Els HREs poden considerar-se elements estimuladors “enhancers” condicionals; confereixen induïbilitat hormonal a promotors que d'altra manera no serien sensibles tot estimulant la transcripció gènica, independentment de l'orientació respecte al promotor on actuïn, podent també localitzar-se en

TAULA I. Elements de resposta a hormones (HRE) de varis receptors esteroïdals.

Receptor	HRE Consens	Complex d'unió	Orientació
GR, PR, MR, AR	GGTACA n ₃ TGTTCT	Homodímer	Inversa
ER	GTACA n ₃ TGACC	Homodímer	Inversa
TR α , TR β	AGGTCA n ₂ AGGTCA AGGTCA n ₄ AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
RAR α, β, γ	AGGTCA n _{5,2,7} AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
RXR α, β, γ	AGGTCA n ₃ AGGTCA	Homodímer/ Heterodímer	Directe
VDR	AGGTCA n ₂ AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe
PPAR α, β, γ	AGGTCA n AGGTCA	Heterodímer amb RXR	Directe

Adaptat i modificat de *Williams Textbook of Endocrinology* (9th ed), pp.62, [20] i de *Hormones* 2nd ed, pp. 41, [17]

regions intròniques. També poden actuar sinèrgicament, havent identificat en molts casos múltiples còpies de HRES dins les regions flanquejants 5' dels gens de resposta hormonal. En aquests casos, la deleció o mutació d'una o dues còpies de HRE sovint provoca una davallada en la capacitat d'inducció del gen diana, suggerint que el grup de HRES estaria actuant cooperativament de manera sinèrgica [21]. El sinèrgisme es pot donar també heteròlogament entre diferents tipus d'elements de resposta, com per exemple el que es dona en la regió promotora del MMTV entre un GRE i un element d'unió a NF-1 (*nuclear factor 1*) [22].