

3.1. Comentaris generals

Els andrògens són les hormones esteroïdals implicades principalment en l'establiment de la funció reproductora masculina. Participen induïnt tan la diferenciació i la maduració dels òrgans reproductius, com en el desenvolupament de les característiques sexuals secundàries masculines. Les hormones androgèniques, a més, regulen directament un vast nombre d'esdeveniments fisiològics, incloent-hi la modificació de l'expressió gènica i el control del creixement i diferenciació cel·lular; exerceixen, doncs, una varietat d'efectes dins dels teixits mamífers.

Estructuralment es caracteritzen per ser esteroides de 19 carbonis amb un nucli de *ciclopentanperhidrofenantrè* –que consisteix en 3 anells ciclohexànics fusionats a un quart anell de ciclopentà–, i per la presència d'un grup funcional oxigenat en el carboni-3 i en el carboni-17.

La primera hormona androgènica identificada i caracteritzada fou l'androsterona, un esteroide 5α -reduït de 19 carbonis que va ser aïllat l'any 1931 pel professor Adolf Butenandt a partir de 25.000 litres d'orina masculina. Més endavant, E. Laqueur i col·legues demostraren 4 anys després que l'androgen secretat pels testicles i veritable hormona masculina era en realitat la testosterona (revisat a [23]).

Les dos hormones esteroïdals més importants en el mascle adult són la *testosterona* (T) i el seu derivat 5α -*dihidrotestosterona* (DHT). Les estructures d'aquests dos compostos s'il·lustren a la figura 12. La testosterona és el principal androgen produït i secretat pels testicles, a part d'altres intermediaris androgènics alliberats en petites quantitats, com l'androstenediona i l'androstendiol (veure figura 13). En la femella, els ovaris i la placenta també sintetitzen dèbilment quantitats d'androgens, i en ambdós sexes l'escorça adrenal pot produir, sota determinades circumstàncies, esteroides amb una feble activitat androgènica però fisiològicament significat.

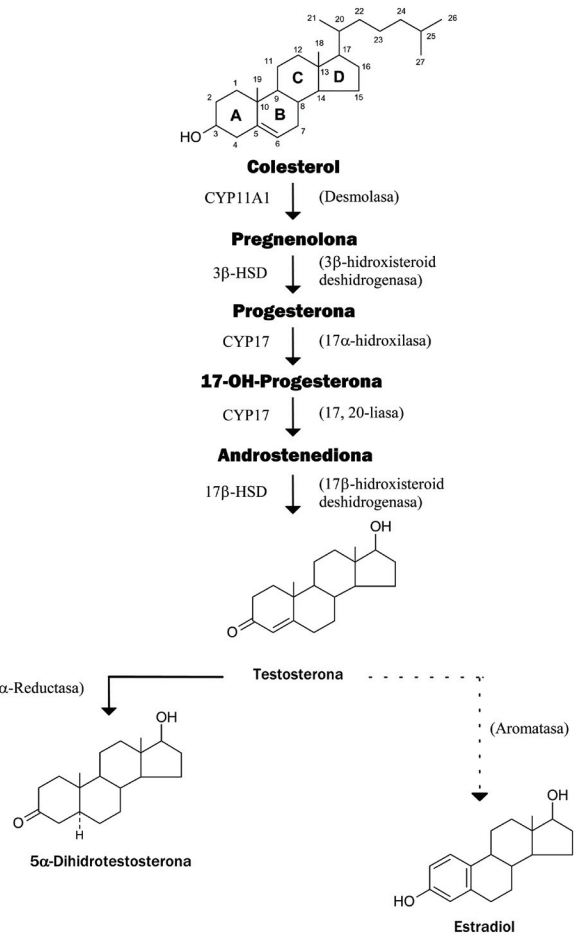


FIG 12. Estructura i ruta d'obtenció de la testosterona i els seus metabòlits actius. La ruta biosintètica d'obtenció de la testosterona té lloc al testicle, mentre que la seva conversió a DHT i estrògens pot donar-se també en els teixits perifèrics. (Adaptat i modificat de: *Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed., pp.824, [24]*)

3.2. Bioquímica, fisiologia i respostes biològiques dels andrògens

3.2.1 Biosíntesi

El colesterol –molècula precursora de les hormones esteroïdals– és el compost principal de partida en l'esteroidogènesi, derivant de la dieta o a partir de la síntesi endògena via acetat (sintetitzat de

novo a partir d'acetil coenzim A). En el primer cas, s'incorpora als teixits des del torrent sanguini, a partir de les lipoproteïnes LDL circulants, via endocitosi mediada per receptor. A la rata, la seva biosíntesi en les cèl·lules testiculars de Leydig és la font majoritària del substrat per la posterior síntesi de testosterona; en els humans en canvi, ambdues alternatives d'obtenció de colesterol esdevenen quantitativament importants [24].

La conversió del colesterol fins a testosterona es produeix amb la intervenció de varis processos enzimàtics. Essencialment consisteix en la ruptura de la cadena alifàtica lateral del colesterol per donar lloc a un esteroide C19, i a l'oxidació dels anells D i A respectivament, donant lloc finalment a un 3-oxo-17-hidroxiesteroide.

La cadena lateral del colesterol s'elimina en una primera etapa que transcorre dins la mitocondria de les cèl·lules de Leydig (i també al còrtex de les glàndules adrenals), passant de 27 a 19 carbonis. Aquesta reacció inicial està catalitzada per l'enzim *Desmolasa* donant lloc a la pregnenolona. La conversió subseqüent de la pregnenolona fins a la testosterona requereix d'una sèrie de quatre reaccions, que transcorren en dos rutes paral·leles: una coneguda com a ruta Δ^5 , procedint via la 17-hidroxipregnenolona,

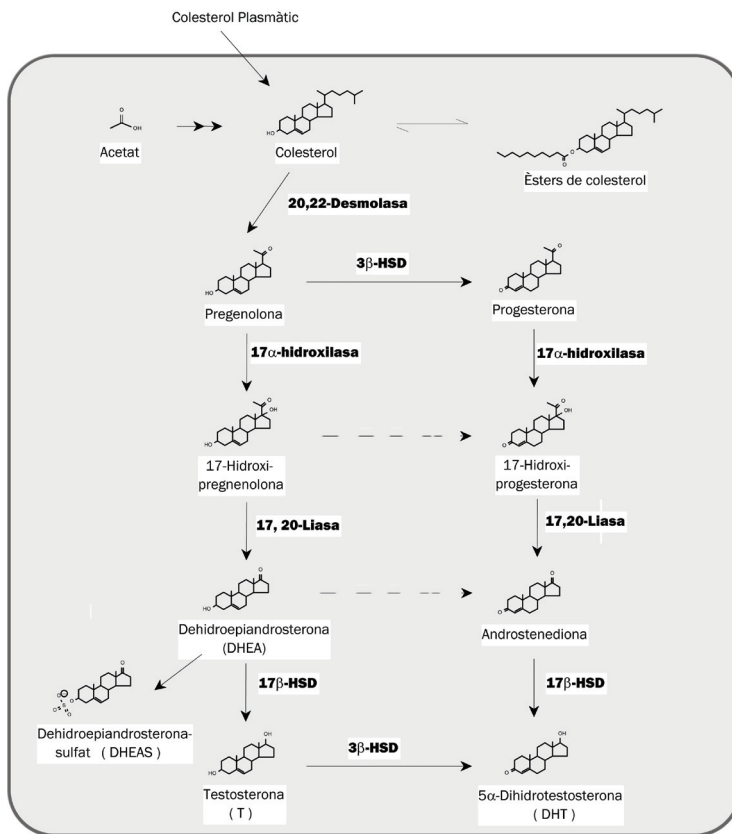


FIG 13. Ruta biosintètica dels andrògens a partir del colesterol (simplificat). (Adaptat i modificat de *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed., pp. 824, [24])

i l'altra anomenada ruta Δ^4 , verificant-se a través de la 17-hidroxiprogesterona. Les activitats relatives de cadascuna d'aquestes dos vies equivalents, varien entre les diferents espècies de mamífer. Mentre que en el cas dels testicles humans preval la ruta Δ^5 , en rosegadors sembla que la ruta dominant seria la Δ^4 [24]. Tot aquest grup de reaccions està catalitzat per membres de la família dels citocroms P450 (CYP), com per exemple la *17 β -Hidroxiesteroïd deshidrogenasa* (*17 β HSD*), verificant-se en la fracció microsomal de la cèl·lula.

La reacció limitant de tot el procés de síntesi és en la majoria de circumstàncies la conversió del colesterol a pregnenolona, de manera que la velocitat d'aquesta etapa controla el fluxe total de producció de testosterona. Com s'ha esmentat prèviament, malgrat que la testosterona n'és el

major producte, la dihidrotestosterona, androstendiona i d'altres, són altrament secretats pel testicle. Els principals llocs de formació i acció de la dihidrotestosterona són a nivell de teixits perifèrics; pel que fa a l'androstendiona, pot servir de precursor per la formació extraglandular d'estrògens.

3.2.2 Transport plasmàtic, metabolisme perifèric i excreció

Alhora d'analitzar els efectes dels andrògens a nivell cel·lular, cal tenir en compte que la biodisponibilitat de l'hormona a nivell sistèmic dependrà de factors com el seu transport i distribució per

l'organisme, l'aclariment metabòlic i finalment de la secreció. Aquests esdeveniments determinaran en última instància les concentracions efectives d'hormona a l'estat estacionari, disponibles a cada moment per exercir les seves accions en els teixits.

TRANSPORT. Els andrògens, com d'altres hormones esteroidals, són transportades des dels llocs de biosíntesi fins als seus òrgans diana a través del torrent sanguini. Donada la seva poca solubilitat aquosa intrínseca, no viatgen lliurement sinó que aquest transport és vehiculitzat mitjançant l'intervenció de proteïnes transportadores, que s'encarreguen de mantenir-les unides amb elevada afinitat. Pel cas de la *testosterona*, aquesta circula pel compartiment sanguini majoritàriament unida a proteïnes plasmàtiques com l'albumina i la globulina d'unió a testosterona (*SHBG/ABP, sex hormone binding-globulin/androgen-binding protein*); s'ha suggerit que aquesta última podria actuar de proteïna-reservori d'hormona unida que podria estar tamponant efectivament les oscil·lacions en l'hormona lliure.

METABOLISME PERIFÈRIC DELS ANDRÒGENS. Tot i que la testosterona pot actuar ella mateixa de forma hormonalment activa, també pot patir transformacions en els teixits extraglandulars que n'amplifiquin o en modifiquin els efectes. En aquest sentit, la testosterona circulant serveix de precursor per la formació de dos tipus de metabòlits actius que per la seva banda poden mediar moltes accions andrògenes. Per una banda, pot patir una reducció irreversible cap a esteroides 5α -reduïts, principalment dihidrotestosterona; aquesta, pel seu torn, pot ser metabolitzada cap a 17 -cetoesteroides i derivats polars excretats per l'orina. Alternativament, els andrògens circulants amb una configuració Δ^4 - 3 -*ceto* poden ser aromatitzats en els teixits perifèrics. A continuació es descriu breument els dos sistemes enzimàtics que intervenen en els dos processos anomenats.

La Testosterona 5α -Reductasa

Tot i que inicialment s'havia deixat la dihidrotestosterona en un segon terme com a hormona masculina paradigmàtica en benefici de la testosterona, aviat es va veure que la DHT és en realitat un potent androgen amb importants rols fisiològics, distingibles dels de la testosterona.

L'activitat enzimàtica responsable de la generació de DHT a partir de T és la *5 α -reductasa* (EC 1.3.99.5), que interpreta un paper important dins la fisiologia, farmacologia i biologia del desenvolupament masculí. L'enzim fou inicialment caracteritzat a la dècada dels anys 50 a partir de talls de fetge [25], veient-se posteriorment que era capaç de reduir una varietat de substrats esteroidals amb una estructura *3-oxo- $\Delta^{4,5}$* en l'anell A. Tan en humans com en rosegadors, existeixen dos isoenzims de la *5 α -reductasa*, la tipus I i la tipus II, codificats per dos gens independents. La *5 α -reductasa* tipus I actua en un rang de pH ampli (6-8,5), mentre que el pH òptim d'acció *in vitro* de la tipus II és més àcid (~5), ambdues localitzades en el reticle endoplàsmic.

El principal lloc no testicular de producció de la DHT és la pròstata (entre d'altres teixits on es pot generar minoritàriament com la pell). L'enzim responsable de la conversió de la T a DHT és una *Δ^3 -cetoesteroïd- 5α -oxidoreductasa* que requereix com a cofactor al NADPH. Es coneix a partir d'estudis moleculars que tan en humans com en rosegadors existeixen 2 gens independents per l'enzim; ambdós gens codifiquen per sengles isoenzims, el tipus I i el tipus II amb una homologia compartida del 50%, i amb algunes diferències en les capacitats catalítiques. S'ha postulat que l'isoenzim II seria el més rellevant metabòlicament en la generació d'andrògens "actius", mentre que el de tipus I no estaria tan directament implicat en l'amplificació en els teixits diana dels efectes de la T via DHT.

En la majoria d'òrgans reproductius masculins amb presència d'activitat *5 α -reductasa* la T és transformada a DHT, el que es pot considerar com una activació metabòlica *in situ* d'importància

vital per fenòmens com el desenvolupament de la pròstata i els genitals externs, el patró masculí de creixement de pèl o la calvície masculina. Paral·lelament, la T per ella mateixa sembla ser la responsable del desenvolupament dels òrgans derivats del conducte Wolffia, a excepció de les vesícules seminals que és dependent de DHT, les accions anabòliques a múscul i ronyó, o de l'estímul del comportament psicosexual masculí.

L'Aromatasa

L'aromatització de la testosterona a estradiol es produeix per mitjà de l'enzim *citocrom P450 19*, també conegut com a *Testosterona aromataza (CYP19, EC 1.14.14.1)*. L'aromatasa és la responsable a l'hipocamp cerebral de la determinació sociomental sexual. Els teixits dotats d'aquest enzim tindran la possibilitat d'estendre o transduir els efectes de la T via estradiol i a través dels seus corresponents receptors, els ER.

En algunes circumstàncies, tots aquests metabòlits esteroidals exerceixen accions locals en els teixits on són produïts, mentre que en d'altres poden reincorporar-se a la circulació actuant a distància.

ACLARIMENT METABÒLIC I EXCRECIÓ. La concentració plasmàtica dels l'esteroides andrògens estarà determinada tan pel balanç entre llur biosíntesi i la seva bioinactivació com per la seva velocitat d'excreció de l'organisme. Per facilitar l'excreció d'aquests potents agents hormonals, els mecanismes metabòlics no es limiten només a inactivar l'hormona sinó que sovint es requereixen oxidacions addicionals sobre el nucli esteroidal, afegits a la conjugació amb grups polars com el glucuronat o el sulfat, per augmentar-ne la solubilitat.

Les reaccions d'inactivació transcorren principalment en el fetge, que conté una gran quantitat d'enzims metabolitzadors i conjugadors rellevants, com vàries *hidroxilases*, les *UDP-Glucuronosiltransferases (UGTs)* o les *Sulfotransferases (STs)*. D'entre els primers, citar les *3 α -Hidroxiesteroid deshidrogenases (3 α -HSD)* i d'altres membres de la superfamília de les *Aldo-ceto reductases (AKR)*, enzims implicats en el metabolisme de les hormones esteroidals que serveixen, entre d'altres funcions, en la protecció contra un excés circulant d'hormones esteroidals [26].

El catabolisme de la testosterona genera com a derivats principalment a 17-cetoesteroides tals com l'androsterona o l'etiocolanolona, i els androstanendiols (entre d'altres conjugats). Els metabòlits d'excreció produïts a partir de la testosterona han perdut en gran mesura l'activitat androgènica i majoritàriament són excretats (>90%) per via renal a l'orina.

3.2.3. Fisiologia dels andrògens

Les funcions fisiològiques dels andrògens en els mascles s'extenen temporalment al llarg de tota la seva vida, des de la diferenciació sexual heterogàmica *in utero* de l'embrió, passant pel desenvolupament sexual secundari (on són els principals responsables del dimorfisme sexual extragenital), fins a l'establiment definitiu i manteniment de la funció sexual i la fertilitat adultes.

Llurs accions no només estan repartides al llarg del temps, sinó que també actuen en una varietat de teixits diana reproductors i no reproductors, com el teixit ossi, l'adipós, el nerviós, el múscul esquelètic, la pròstata, el fetge i el ronyó [27]. Tanmateix, és bastant sorprenent que aquestes accions extremadament diverses dels andrògens estiguin mediades en principi només per una única espècie molecular de receptor amb un singular mecanisme d'acció acceptat, *i.e.* a través de l'activació transcripcional dels elements de resposta a andrògens en els diferents gens diana [28].

A la *taula II* es mostren alguns dels nivells plasmàtics normals de testosterona i del seu metabòlit DHT en humans i rosegadors d'ambdós sexes.

TAULA II. Nivells plasmàtics d'andrògens, en humans i rosegadors

		TESTO (nM)	DHT (nM)	Referència
Humans	home	8,7 - 35	0,3 - 1,2	Hammond, G.L. <i>et al.</i> , [29]
	dona	<3,5	0,17 - 1	<i>Williams textbook of endocr.</i> , [30]
Rata	♂	6,7 ± 0,1		Urakami, Y. <i>et al.</i> , [31]
	♀	1,1 ± 0,1		“ “ “
Ratolí	♂	9,3 ± 1,5		Jones, R.D. <i>et al.</i> , [32]
	Tfm/Y(♂)	1,8 ± 0,3		“ “ “

3.2.4. Respostes biològiques

Els andrògens estan implicats en el desenvolupament, diferenciació i manteniment de les funcions reproductives masculines, com en la generació de les característiques sexualment dimòrfiques en teixits no genitals. L'acció nuclear dels andrògens està mediada a través del receptor d'andrògens (AR), membre de la superfamília de receptors nuclears que actuen de factors de transcripció induïbles per la unió del lligant hormonal.

Aquests receptors nuclears d'hormones esteroïdals –i tiroïdals– actuen incrementant o disminuint l'expressió dels seus gens diana (els gens sensibles a l'hormona, en definitiva); un cop units al lligant, adquireixen un nou estat conformacional que els habilita per poder interaccionar amb llurs elements de resposta específics, en el DNA. El receptor lligat també és capaç d'interaccionar amb altres factors de transcripció i activadors transcripcionals. Els coactivadors associats poden reclutar complexes amb activitats remodeladores de la cromatina tals com les *histona-acetiltransferases* o altres proteïnes, de manera que un dels mecanismes proposats per la coactivació mediada pels receptors nuclears és la modificació dirigida de l'estructura de la cromatina.

El fet que en virtualment cada teixit pugui donar-se algun tipus de resposta a la testosterona, ha portat que des de molt aviat s'intentés classificar els efectes d'aquesta hormona. Històricament, les respostes associades a la masculinització del tracte reproductiu s'han definit com a “respostes androgèniques”, mentre que aquelles altres caracteritzades per l'estimulació del creixement de teixits no reproductius –com el múscul, ronyó o els ossos entre d'altres–, s'han referit com a “respostes anabòliques” [33]. Gran part de l'interès en poder distingir entre aquestes dos accions venia de la necessitat clínica de desenvolupar nous esteroïdes amb activitats anabòliques enlloc d'androgèniques. No obstant, aviat es va observar que la preferència per un tipus d'acció o una altra venia donada més pel tipus de teixit que per l'esteroïde concret en sí [34]. Tenint presents doncs aquestes consideracions anteriors, podem dividir (o millor classificar) resumidament les respostes biològiques dels andrògens (sumaritzat a la *taula III*, pàg. següent) en:

- i) Efectes androgènics o promotors del creixement en el tracte reproductor masculí
- ii) Desenvolupament dels caràcters sexuals secundaris (en el mascle)
- iii) Accions en el sistema nerviós central
- iv) Efectes anabòlics o estimuladors en el pes corporal (múscul esquelètic, etc.) i en el balanç nitrogenat.

La virilització en els mamífers està mediada per dos hormones esteroïdals: la testosterona i la dihidrotestosterona; ambdues s'uneixen a un receptor esteroïdal típic, el receptor d'andrògens, activant gens que continguin elements de resposta pels andrògens (AREs) en llurs seqüències.

TAULA III. Respostes biològiques als andrògens[†]

Tipus de Resposta	Efactor [‡]
Accions androgèniques en el tracte reproductor masculí	DHT, T
Diferenciació i creixement sexual primari:	
Epídidim, pròstata, vesícules seminals, <i>vas deferens</i> , glàndules bulbouretrals	
Espermatogènesi	T
Estimulació androgènica dels caràcters sexuals secundaris	
Virilització externa	
Creixement del penis i l'escrot	T
Eixamplament de la laringe i engruïment de les cordes vocals	
Accions al Sistema Nerviós Central	Metabolisme de T a E
Diferenciació de regions cerebrals seleccionades	
Hipotàlem, àrea preòptica, còrtex cerebral	
Desenvolupament de la libido i <i>masculinització</i> neuropsicològica	T
Accions anabòliques	T
Creixement esquelètic	
Creixement muscular (esquelètic)	
Distribució subcutània del greix	
Creixement d'òrgans accessoris	T, DHT
Pròstata, vesícula seminal	
Dimorfisme sexual renal	T
Hipertròfia renal, secreció d'eritropoetina, estimulació de la secreció de certs metabòlits i xenobiòtics	
Dimorfisme sexual hepàtic	T
Metabolisme d'esteroides i xenobiòtics	
Secreció proteica	

[†]Efactor androgènic proposat; T, testosterona; DHT, dihidrotestosterona; E, estradiol. [‡]Adaptat i modificat de *Hormones 2nd ed. (1997), cap. 12, pp. 347, [17]*.

3.3 L'eix hipotalàmic-hipofisari-gonadal

Els nivells circulants i la secreció d'andrògens està regulada a nivell del que es coneix com l'eix hipotalàmic-pituïtari-gonadal, que s'encarrega de mantenir i adaptar la funció testicular a les diferents circumstàncies en la vida de l'individu com per exemple durant l'adveniment de la pubertat, en la qual es produiran una sèrie de canvis anatòmics, endocrins i fisiològics que donaran lloc a un ésser masculí apte per la reproducció sexual. Les principals hormones que intervenen en aquesta xarxa endocrina de regulació es classifiquen segons la glàndula que les produeixi:

- les hormones hipotalàmiques: GnRH
- les hormones pituïtàries: les gonadotropines (LH i FSH)
- les secretades pels testicles: inhibina, andrògens

HORMONES HIPOTALÀMIQUES. L'hipotàlem està lligat i interconnectat anatòmicament amb la pituïtària, tan a nivell de conductes neurals com per un sistema vascular portal; d'aquesta manera s'assegura una via eficaç d'alliberament de factors estimuladors de síntesi hormonal cap a l'adenohipòfisi, i així es proveeix al cervell de la ruta principal per la qual controla i governa la funció pituïtària. El *factor alliberador de gonadotrofines* (GnRH) és un decapeptid secretat de forma pulsativa per les neurones peptidèrgiques del hipotàlem, que estimula la secreció i alliberament de LH i FSH per l'adenohipòfisi.

HORMONES PITUÏTÀRIES. Els dos principals factors pituïtaris que regulen el funcionament de les gònades masculines són l'*hormona luteïnitzant* (LH) –també anomenada ICSH–, i l'*hormona estimuladora dels fol·licles i de les cèl·lules seminals* (FSH). Es tracta de glicoproteïnes heterodimèriques compostes per dos cadenes polipeptídiques, designades com a subunitat α i subunitat β , ambdues compartint una idèntica subunitat α . Són secretades pels gonadotrofs de la pituïtària anterior en resposta a l'estimulació via GnRH,

al nivell plasmàtic d'hormones esteroidals, i possiblement per altres factors no caracteritzats encara.

- La LH regula principalment la producció i secreció en el mascle adult de testosterona, per part de les cèl·lules testiculars de Leydig. L'hormona luteïnitzant interacciona amb receptors d'alta afinitat a nivell de membrana, provoca un augment en la formació de cAMP que desencadena una cascada de senyalització dins la cèl·lula de Leydig, i que es tradueix en una inducció dels enzims implicats amb la biosíntesi de la testosterona a partir del colesterol.
- En el mascle, l'epiteli dels túbuls seminífers testiculars és el lloc primari d'acció de la FSH, que en conjunció amb la testosterona actua a nivell de les cèl·lules de Sertoli intervenint en l'inici de l'espermatoïtògenesis i, entre d'altres, en l'estimulació de la síntesi de la proteïna d'unió a andrògens ABP/SHBG.

HORMONES TESTICULARS. A part de la producció dels principals andrògens com la testosterona i la dehidrotestosterona –i altres hormones esteroidals en menor quantitat com estradiol, etc., el testicle (concretament les cèl·lules de Sertoli) produeix un pèptid inhibitor de l'activitat gonadotròpa de la pituitària, especialment de la FSH, anomenat *Inhibina*. Aquesta hormona pertany estructuralment a la família del TGFβ, consistint en dos subunitats glicoprotèiques (dues cadenes alfa i beta unides per ponts disulfur) amb un pes molecular total de 32 kDa.

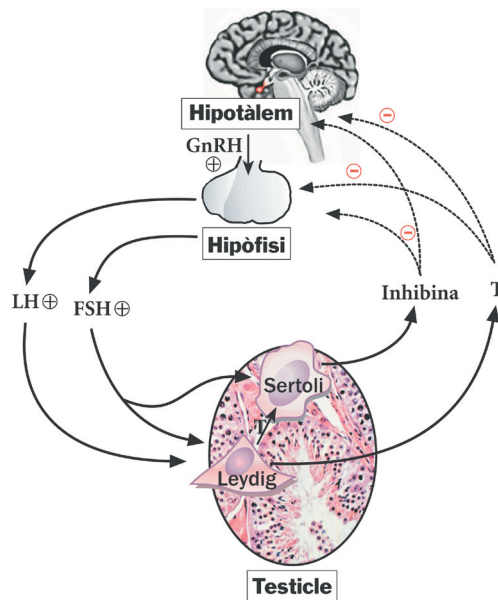


FIG 14. Diagrama esquemàtic de l'eix masculí hipotàlem-hipofiso-testicular. Es mostren els diferents sistemes principals que intervien en l'eix. (per una descripció detallada, veure el text)

Funcionament integrat de l'eix.

Esquemàticament es mostra l'eix a la figura 14.

La producció i secreció de LH està governada per la regió mediobasal de l'hipotàlem; neurones que s'originen en el sistema nerviós central descarreguen neurotransmissors localment en el hipotàlem resultant en la secreció episòdica de GnRH dins el sistema portal hipofiseal. La presència de GnRH activa receptors de membrana de determinades cèl·lules adenohipofiseals, el que resulta amb l'alliberament de LH per part d'aquestes. L'hormona luteïnitzant viatja sistemàticament fins a les cèl·lules testiculars de Leydig, on induirà la seva maduració i concomitant producció de testosterona. La inhibina i els esteroides gonadals realitzen un control en la secreció de LH i FSH per mecanismes de retroalimentació.

La síntesi i secreció pulsativa de GnRH des de l'hipotàlem indueix la secreció de LH i FSH en els gonadotrofs de la pituitària. Un cop secretats, la LH i la FSH estimulen la síntesi dels esteroides gonadals, estrogen i androgen. Aquests esteroides realitzen un *feedback* negatiu en la producció de gonadotropines, via els seus receptors respectius al hipòtalem i a la pituitària.

3.4 El Receptor d'andrògens

Les accions dels esteroides androgènics en els seus teixits diana venen donades a través de la unió amb el receptor d'andrògens (AR), una proteïna intracel·lular que pertany a la gran superfamília de receptors nuclears que com s'ha vist actuen de factors de transcripció induïbles pel lligant hormonal. El AR pot modular l'expressió gènica directament per la interacció amb elements específics presents

en les regions reguladores dels gens diana [35]; en alguns casos s'ha observat que també poden actuar indirectament per mitjà de l'activació de diverses vies de senyalització de factors de creixement [36].

El clonatge del cDNA de l'AR de diferents espècies [37-38] ha permès avançar en la caracterització cel·lular i molecular de molts aspectes diversos de la fisiologia i fisiopatologia dels andrògens. Tot i això, encara persisteixen algunes qüestions interessants referents a les funcions bàsiques dels andrògens i del paper del AR en la regulació gènica.

3.4.1. Estructura i funció del receptor d'andrògens

Com s'ha esmentat, l'AR pertany a la superfamília de receptors d'hormones esteroïdals/tiroïdals (també coneguda com a superfamília de receptors nuclears) i per tant presenta les característiques estructurals comunes als seus membres. Com ja s'ha vist també, aquestes proteïnes regulen la transcripció gènica mitjançant la interacció amb seqüències específiques de DNA d'una manera específica pel lligant.

Característiques estructurals

El receptor d'andrògens és una de les proteïnes més grans dins la superfamília de receptors nuclears. La seva seqüència aminoacídica deduïda conté 902-919 residus, amb una grandària molecular predita d'aproximadament 100 *kDa* pels receptors humà i de rata. Curiosament, el seu gen es troba localitzat en el cromosoma X.

De forma similar a d'altres receptors nuclears, l'AR presenta una disposició estructural modular, que consisteix en uns dominis d'unió a hormona, d'unió a DNA, de transactivació, de dimerització i localització nuclear, etc. [8]. Pel receptor d'andrògens s'han caracteritzat dos funcions transactivadores (AFs) en llur seqüència: AF1 en el seu domini *N-terminal* i AF2 en el seu domini d'unió a lligant (LBD); l'activitat AF1 –particularment– té una potent activitat constitutiva, ja que de la deleció del domini LBD en resulta una molècula amb una capacitat d'activar gens reporter similar a la de la proteïna *full-length* en presència de lligant, mentre que l'AF2 apareix com a més feble [39]. Els precisos residus i mecanismes que contribueixen a l'activitat AF-1 de l'AR no han estat aclarits del tot encara de manera conclouent.

Proteïnes coreguladores del AR

L'activitat transcripcional del AR es pot veure afectada per diferents coreguladors que poden interaccionar amb determinats dominis de la proteïna, influint en diverses propietats funcionals del receptor com la selectivitat de lligant i la capacitat d'unió a DNA. Aquests coreguladors participen en el remodelatge de la cromatina directament a través de la modificació d'histones, o indirectament tan pel reclutament de complexos modificadors de la cromatina, com de la maquinària basal de transcripció [40]. Cal esmentar la naturalesa promíscua d'aquests factors, que sovint poden interaccionar amb diversos receptors de forma simultània. Alguns dels coreguladors millor caracteritzats són membres de la família p160, ARA₇₀, ARA₅₅, Smad-3, etc. Per alguns d'ells, s'ha suggerit que funcionarien també de nexa pel *cross-talk* entre vies de transducció de senyals com la del TGF- β i l'acció dels andrògens/AR [41].

3.4.2. Mecanismes d'acció i localització del AR

El AR es troba localitzat en el citoplasma de la cèl·lula diana en forma inactiva, associat a un complex que inclou la *hsp90* (*heat shock protein 90*) i la *hsp70*, que el mantenen en un estat “inactiu-receptiu”; quan és ocupat pel seu lligant (usualment testosterona o dihidrotestosterona) s'allibera de les *hsps* translocant-se cap al nucli de la cèl·lula, on homodimeritza amb altres molècules de receptor activades per l'hormona, funcionant com una proteïna reguladora transcripcional activada per lligant.

Un cop unit a l'element hormonal de resposta (HRE), el dímer de receptor recluta coactivadors per formar un complex actiu de pre-iniciació, que interacciona amb la maquinària de transcripció basal per disparar l'expressió dels gens diana [42] (veure figura 8, pàg. 29).

Els complexos androgen-receptor formats, un cop a l'interior dels nuclis de les cèl·lules diana

TAULA IV. Especificitat de lligant del Receptor d'Andrògens

Esteroides	Índex competitiu relatiu* (%)
DHT	100
Testosterona	44
Acetat de cyproterona**	21
Progesterona	10
Estradiol	10
Cortisol	<0,0001

* L'índex competitiu relatiu (RCI) és la mesura de l'habilitat de cada lligant per competir per l'unió amb [³H]-DHT. El RCI per la DHT es situa a 100%; ** Sintètic (esteroide anabolitzant); Adaptat de *Hormones*, 2nd ed., cap.12, pp. 357, [17]

reconeixen regions reguladores dins o als voltants de gens específics, regulant –en conseqüència– l'expressió gènica. A la taula IV es mostren les potències androgèniques relatives de diferents hormones esteroïdals (en relació a llur afinitat pel receptor AR).

Varis gens o xarxes gèniques poden veure's influïdes concomitantment, en una seqüència temporal definida que eventualment resulta en l'expressió d'un fenotip induït per andrògens.

L'adquisició d'aquest fenotip s'esdevé d'una forma teixit i cèl·lula específica, involucrant principalment respostes de creixement hipertròfic i de creixement hiperplàstic –en els òrgans accessoris sexuals–, mentre que en els òrgans no reproductius només desemboquen en una resposta hipertròfica.

LOCALITZACIÓ. La localització subcel·lular primària de la forma unida i de la forma no unida a lligant dels receptors d'hormones esteroïdals difereix entre els varis membres de la família. En concret, el receptor d'andrògens es localitza en el nucli tan en llur forma unida com en la desunida [43], mentre que el AR i el receptor de glucocorticoides sense lligant es troben primàriament localitzats en el citoplasma (figura 15); després de la unió de DHT, el AR és translocat al nucli on s'unirà a llurs seqüències específiques de DNA [44]. L'eliminació del medi dels agonistes andrògens, pel contrari, allibera al receptor de la seva associació amb la cromatina i provoca l'exportació de retorn cap al compartiment citoplasmàtic, per reciclar-lo fins que l'hormona sigui reintroduïda.

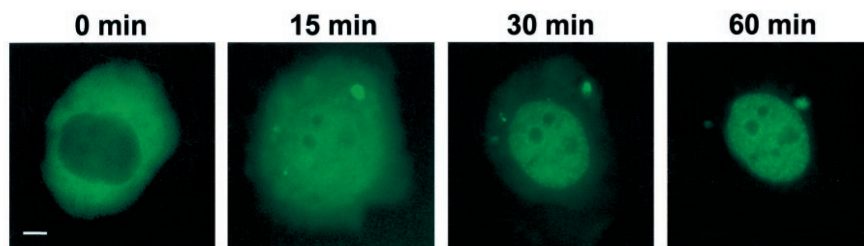


FIG 15. Translocació nuclear del AR dependent d'andrògens. Cèl·lules PC3 van ser transfectades amb la construcció GFP-AR, corresponent al receptor d'andrògens (AR) fusionat a la proteïna fluorescent verda (GFP), llavors es varen anar adquirint imatges *in vivo* de les mateixes cèl·lules a 0, 15, 30 i 60 min després del tractament amb 10⁻⁸ M DHT (Barra = 15µm). (Adaptat i modificat de Tyagi, R. et al., [45])

Discriminació en l'acció

El domini d'unió a DNA (DBD) de l'AR, exhibeix una elevada homologia en llur seqüència aminoacídica amb altres receptors nuclears com el de glucocorticoides (GR), mineralcorticoides (MR) o el de progesterona (PR); aquest fet tindrà com a conseqüència que els quatre receptors esmentats reconeguin elements de resposta hormonal (HRE, o també coneguts com a *steroid response elements*, SRE) molt semblants sinó idèntics, plantejant-se la paradoxa de com la cèl·lula que expressa més d'un receptor

discerneix entre senyals diferenciades que aparentment conflueixen en els mateixos llocs, i respon d'una manera específica a diferents hormones.

Dins la cèl·lula, la resposta selectiva d'un promotor gènic determinat a un receptor nuclear pot sorgir a través de com a mínim cinc mecanismes estratificats, que constitueixen diferents ordres de regulació (*veure figura 16*), incloent-hi la disponibilitat de constituents, existència de coreguladors, llocs proximals a factors de transcripció, unió cooperativa, i reconeixement del DNA diana,

- i) El primer i més simplista nivell regulador de selectivitat hormonal és la disponibilitat o no a la cèl·lula del receptor determinat o de l'hormona. Malauradament, en molts tipus cel·lulars coexisteixen dos o més tipus de receptors esteroïdals amb accessibilitat als seus respectius lligants [46].
- ii) El segon mecanisme de discriminació s'estableix amb la presència –específica de cèl·lula– de proteïnes coreguladores, que poden reconèixer un particular tipus de receptor i no un altre, participant per la seva banda en dirigir la resposta apropiada. En aquest sentit es pot citar com a

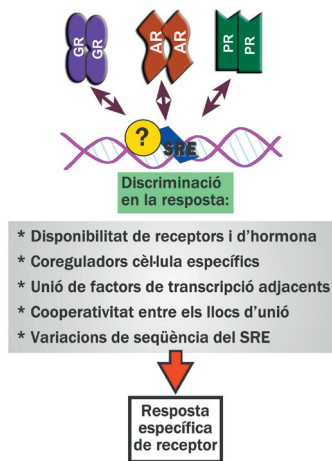


FIG 16. Esquema dels possibles nivells de discriminació entre les respostes específiques de receptor; SRE, *steroid response element*

exemple la proteïna coreguladora ARA₇₀, que en determinats contextos pot actuar de coactivador específic del AR [47].

- iii) Un tercer mecanisme correspondria a la presència d'altres factors de transcripció diferents amb llocs d'unió pròxims al HRE –dins un promotor relativament complex–, podent potenciar-se llavors la capacitat de resposta d'un tipus de receptor sobre un altre. Aquest fet ha estat demostrat pel receptor d'andògens, on varis promotors gènics regulats per ell han mostrat la presència de llocs d'unió adjacents per OCT-1 (*octamer transcription factor 1*), NF-1 (*nuclear factor 1*), o Sp1 (*specific protein 1*), involucrats en l'establiment de la plena resposta AR-específica en aquells contextos [48-49].

- iv) Un quart mecanisme de selectivitat hormonal pot derivar-se de l'arquitectura i distribució particular dels diferents llocs d'unió dins del promotor, per promoure respostes preferencials per un receptor determinat, com aquelles configuracions particulars de HRE dèbils

individualment però que poden actuar cooperativament per un tipus de receptor determinat. Aquest cas es dona en el promotor del gen prostàtic de la Probasina, el qual conté dos ARES que col·laborarien en la inducció del gen mediada per l'AR [50]. De tota manera, en el cas del promotor del MMTV, que és activat tan pel GR com per el PR i l'AR, la multiplicitat d'elements de resposta presents en ell fracassa en discriminar entre els varis tipus de receptor.

- v) Finalment, el cinquè nivell de discriminació de la resposta apareix al observar amb deteniment els promotors naturals, regulats específicament per un determinat exemplar de receptor esteroïdal: contenen HREs la seqüència dels quals varia respecte la seqüència idealitzada del HRE, apartant-se de la seqüència canònica averatjada a partir de diversos experiments. Aquestes variacions –sovint subtils– en determinades posicions nucleotídiques del HRE, com en els nucleòtids flanquejants del palíndrom, poden proporcionar una unió preferencial per un tipus de receptor (donada aquesta desviació única de la seqüència nucleotídica vers l'element de resposta) [51].

Distribució del AR

El receptor d'andrògens està present en la majoria de teixits. Mitjançant tècniques de *binding* amb andrògens marcats radioactivament amb triti, i mitjançant detecció immunohistoquímica, s'ha pogut establir la distribució de les activitats d'unió a andrògens en diferents teixits.

La *taula V* resumeix l'expressió del missatger del receptor d'andrògens (relativa als nivells d'expressió prostàtics), determinada per RT-PCR en diferents teixits de rata. Com pot observar-se a la taula, el receptor s'expressa en molts teixits –entre ells el ronyó–, no només en els directament implicats en la reproducció, fet que pot explicar les influències que duen a terme els andrògens en teixits no reproductius com la pell, ronyó, els fol·licles pilosos, múscul o cervell, entre d'altres.

TAULA V. Abundàncies relatives del mRNA del AR en varis teixits respecte als de la pròstata.

Teixit	Mascle	Femella
Pròstata	100	-
Hipotàlem	42	217
Glàndules adrenals	141	186
Epidídim	115	-
Glàndules tiroïdals	68	ND
Pituitària	56	9
Múscul (<i>quadriceps</i>)	35	ND
Glàndula prepucial	58	-
Ronyó	27	7
Vesícula seminal	25	-
Testicle	20	-
Fetge	18	9
Glàndula submaxil·lar	17	ND
Vagina	-	9
Cor	8	7
Ovari	-	4
Úter	-	4

Valors en percentatge; ND, no determinat; Adaptat i modificat de Keller, E.T., et al., (1996) *The androgen receptor: a mediator of diverse responses. Frontiers in Bioscience 1, d59-71 March 1.*

Unió selectiva del receptor d'andrògens al DNA

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el receptor d'andrògens s'uneix a un element de resposta a andrògens (ARE) per induir els efectes androgènics. La seqüència consens d'aquest ARE va ser identificada utilitzant el domini d'unió a DNA del AR, en un assaig de selecció de lloc d'unió al DNA [52], observant-se que era pràcticament idèntica a la seqüència consens de l'element de resposta a glucocorticoides (GRE). Més tard s'ha corroborat que tan el AR com el GR, juntament amb el MR i el PR, poden reconèixer *in vitro* uns mateixos elements de resposta organitzats en una repetició invertida –espaiada per tres nucleòtids– de seqüències semblants a 5'-TGTTCT-3' [53], que s'han anomenat també elements de *classe I*, als quals els receptors corresponents s'uneixen homodimèricament en una configuració “cara-a-cara” però amb baixa selectivitat [54]; d'altra banda, *in vivo* tots aquests receptors mantenen un conjunt específic de gens diana, mitjançant cadascun d'ells un grup de respostes específiques a través d'aquests aparentment inespecífics HRES.

L'estudi detallat dels promotors que responen als andrògens ha estat realitzat per alguns gens, la majoria dels quals són d'expressió prostàtica (ja que la pròstata és un òrgan dependent d'andrògens) o en teixits reproductius accessoris, però també en d'altres (veure *taula VI* per un llistat il·lustratiu). En varis casos, també han estat descrites interaccions subtils entre l'hormona-receptor i d'altres elements transcripcionals de resposta, o comunicació creuada amb vies diferents de senyalització cel·lular [55]. A continuació es mostra una breu descripció d'alguns dels gens presents en la *taula VII*:

PROBASINA (PB). Gen codificant per una proteïna nuclear i secretada de la pròstata dorsolateral de rata. Està regulada per andrògens *in vivo* i en menor mesura, per glucocorticoides. Es tracta d'un gen expressat específicament a les cèl·lules epitelials prostàtiques. Mitjançant diferents estudis s'ha demostrat la presència en el seu promotor de dues regions capaces d'unir específicament el AR. Funcionalment s'ha vist que aquests dos AREs potencials –altrament de baixa afinitat individualment– actuarien de manera cooperativa en la regulació del gen [50].

C3. Una de les 3 subunitats (C1,C2 i C3) de la proteïna prostàtica d'unió *Prostateïna*, que constitueix la principal proteïna secretora de la pròstata ventral de rata. Està composta per 2 heterodímers (C1:C2

i C2:C3). Les tres subunitats estan codificades per gens independents, amb l'expressió del mRNA de la subunitat C3 regulada per andrògens. S'han identificat regions potencialment reguladores en la regió 5' flanquejant del gen i en el seu primer intró, demostrant-se que l'element ARE present en el primer intró (element C o C3(1)-ARE) és el de major potència en la regulació del gen per andrògens [56].

TAULA VI. Alguns gens on s'han identificats elements de resposta a andrògens.

Espècie	Gen	Abrev.	Expressió*
RATA	PROSTATEIN/PROSTATIC BINDING PROTEIN (C3 (1) SUBUNIT)	C3	pròstata ventral
	PROBASIN	PB	pròstata dorsolateral
	CYSTATIN-RELATED PROTEIN 2	crp2	pròstata ventral, glàndula lacrimal
HUMANS	PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN	PSA	pròstata
	GLANDULAR KALLIKREIN	hK2	pròstata
	CYCLIN DEPENDENT KINASE INHIBITOR p21	p21	pròstata
RATOLÍ	SEX LIMITED PROTEIN	Slp	ronyó
	β-GLUCURONIDASE	GUS	ronyó
	KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN	KAP	ronyó
	MOUSE SVS PROTEIN 99	MSVSP99	vesícula seminal
	ANDROGEN-REGULATED MURINE EPIDIDMAL PROTEIN OF 24 kDa	arMEP24	epidídim
	GLUTATHION PEROXIDASE 5	GPX5	epidídim
	Pem HOMEBOX GENE	Pem	testicle, epidídim
	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	ronyó

*Teixit on es dona principalment la regulació per andrògens; Abrev., Abreviació.

predominantment en la glàndula prostàtica humana, regulada pels andrògens. Forma part de la família humana de kal·licreïnes, que també inclou (entre d'altres membres) la kal·licreïna pancreàtica/renal/urinària (hK1), i la PSA (hK3). El gen que codifica per la proteïna hK2 es designa segons la nomenclatura actual com a *hKLK2*, i s'ha identificat un ARE putatiu en el seu promotor.

KIDNEY ANDROGEN-REGULATED PROTEIN, KAP. Gen murí d'abundant i exclusiva expressió renal. Es troba sotmès a una complexa regulació multihormonal, principalment pels andrògens i per hormones tiroïdals, constituïnt el transcrit majoritari regulat per andrògens a ronyó de ratolí mascle [57]. En llur regió promotora, s'ha identificat una putativa seqüència de resposta a andrògens parcialment solapada amb la caixa TATA; assaigs de transfecció transitòria han demostrat que era capaç d'atorgar resposta a DHT a construccions reporteres, l'activitat dels quals minvava al mutar l'element [58].

p21 (INHIBIDOR DE KINASES DEPENDENTS DE CICLINES p21). Proteïna identificada inicialment com a un inhibidor de CDKs (*ciclin-dependents kinases*), i posteriorment relacionat amb altres processos biològics com el control del cicle cel·lular, reparació del DNA i activitats antiapoptòtiques [59]. Els andrògens sobrerregulen el gen en les cèl·lules prostàtiques humanes. Recentment s'ha vist que l'expressió de la p21 vindria activada pels andrògens a través d'un ARE canònic situat en la seva regió promotora proximal, i que el factor de transcripció Sp1 estaria també involucrat en aquesta inducció a través de múltiples llocs d'unió en el promotor [60].

GEN HOMEÒTIC Pem. Factor de transcripció homeòtic expressat sota control androgènic a testicle i epidídim. S'expressa també en d'altres teixits com ovari, múscul i placenta. El representant murí del gen Pem, conté dos elements de resposta a andrògens, que difereixen de la seqüència del HRE clàssic, funcionalment implicats en l'estimulació selectiva per andrògens [61].

CYSTATIN-RELATED PROTEIN 2. Gen que pertany a la família de les *cystatin-related proteins*, abundants glicoproteïnes quasi bé expressades exclusivament a la pròstata ventral i a la glàndula llacrimonial de rata mascle [62]. El gen *crp2* codifica per una proteïna de 20 kDa, està regulat positivament pels andrògens a

PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PSA).

L'antigen específic prostàtic és una serin proteasa prostàtica de la família de les kal·licreïnes que està sintetitzada quasi exclusivament per les cèl·lules de l'epiteli luminal de la pròstata humana. S'utilitza com a marcador tumoral en el càncer de pròstata. L'expressió del PSA no només és específic de tipus cel·lular sinó que també està fortament regulat pels andrògens; s'han identificat dos ARES funcionalment actius en el seu promotor proximal, ARE-I i ARE-II.

KAL-LICREÏNA GLANDULAR (hK2).

Es una serin proteasa expressada

la pròstata ventral. Curiosament, s'ha identificat un ARE putatiu en llur seqüència codificant –solapat amb l'ATG d'inici de traducció–, que és capaç d'unir el AR i de dotar de resposta androgènica a promotors reporters heteròlegs [63].

Particularitats del elements de resposta a andrògens (AREs)

Sovint, múltiples AREs es troben localitzats a les regions reguladores dels gens sensibles als andrògens, jugant probablement un paper important en la modulació fina de la resposta a aquesta hormona. A més a més, els promotors naturals presenten elements de resposta hormonal que divergeixen respecte la seqüència òptima d'unió, disminuint en conseqüència l'afinitat d'aquests element pels seus receptors però guanyant, per contra, especificitat i selectivitat de receptor.

Alguns dels AREs millor caracteritzats a nivell molecular corresponen a gens amb resposta androgènica com són el gen de l'antigen prostàtic específic (PSA), kalicreïna-2 (KLK-2), Probasina (PB) o la *sex limited protein* (Slp), entre d'altres (veure taula VII). Malgrat aquest fet i la creixent incorporació de nous elements de resposta a andrògens identificats en altres gens, els mecanismes moleculars mitjançant els quals s'assoleix *in vivo* una resposta selectiva i teixit específica encara resten bastant poc compresos.

TAULA VII. Seqüència core d'alguns elements de resposta a andrògens (ARE) naturals i similars.

ARE	Seqüència	Ref.
ARE CANÒNIC	AGAACA n ₃ TGTTCCT	Roche, PJ <i>et al.</i> , [52]
PB ARE-1	ATAGCA TCT TGTTCCT	Rennie, PS <i>et al.</i> , [50]
PB ARE-2	AGTACT CCA AGAACC	“ ”
PSA ARE-1	AGAACA GCA AGTGCT	Cleutjens, K <i>et al.</i> , [64,66]
PSA ARR	GGATCA GGG AGTCTC	“ ”
C3(1) ELEMENT C	AGTACG TGA TGTTCCT	Tan, JA <i>et al.</i> , [67]
SC ARE	AGCACC CTG TGTCCC	Haelens, A <i>et al.</i> , [68]
*TAT GRE2	TGTACA GGA TGTTCCT	Beato, M <i>et al.</i> , [5?]
KLK2	GGAAACA GCA AGTGCT	Murtha, P <i>et al.</i> , [69]
arMEP24 ARE	TGTTGA GAG AGAACA	Ghyselinck, NB <i>et al.</i> , [70]
p21 ARE	AGCACG CGA GGTTC	Lu, S <i>et al.</i> , [71]
Pem ARE-1	AGATCT CATTTC TGTTC	Barbulescu, K <i>et al.</i> , [61]
Pem ARE-2	AGCACA TCG TGCTCA	“ ”
GPX5	ATCCTA TGT TGTTCCT	Lareyre, JJ <i>et al.</i> , [72]
Crp2	AGAAGA AAA TGTACA	Devos, A <i>et al.</i> , [73]
Slp HRE-2	TGGTCA GCC AGTTCT	Adler, AJ <i>et al.</i> , [49]
Slp HRE-3	GAAACA GCC TGTTCCT	“ ”
Gus DHS-3	AGTACT TGT TGTTCCT	Lund, SD <i>et al.</i> , [74]
Odc ARE	AGTCCC ACT TGTTCCT	Crozat, A <i>et al.</i> , [75]
Kap ARE	GGTACA GGA TGTATA	Soler, M <i>et al.</i> , [58]
MVDP AREP	TGAAGT TCC TGTTCCT	Darne, CH <i>et al.</i> , [76]
*MMTV DISTAL	GTTACA AAC TGTTCCT	Gowland, PL <i>et al.</i> , [77]
*MMTV PROXIMAL	GGTATC AAA TGTTCCT	“ ”

Abreviacions: PB, *Probasina*; PSA, *prostatic specific antigen*; SC, *secretory component*; TAT, *tyrosine aminotransferase*; KLK2, *glandular kallikrein 2*; arMEP24, *murine epididimal protein 24kDa*; Gpx5 *glutathione peroxidase 5*; Crp2, *cystatin-related protein 2*; Slp, *sex-limited protein*; Gus, β -*glucuronidase*; Odc, *ornithine decarboxilase*; Kap, *kidney androgen-regulated protein*; MVDP, *mouse vas deferens protein*; MMTV, *mouse mammary tumour virus*; Ref., referències.

(Adaptat i modificat de Claessens F. *et al.*, [54], Nelson CC *et al.*, [51], i altres)

*Elements de resposta a glucocorticoides

Si bé fenòmens com l'expressió diferencial de diferents tipus de receptor o el metabolisme cel·lular de l'hormona poden contribuir a l'especificat d'acció (discutits en detall prèviament), pel que respecta al receptor d'andrògens, en determinades situacions la unió selectiva al DNA pot possibilitar en la regulació gènica un mecanisme específic d'hormona. De fet, apart dels clàssics elements de resposta no selectius de *classe I*, hi ha un grup addicional de seqüències de resposta a andrògens que són reconegudes exclusivament per l'AR, com el ARE-2 –present en el promotor del gen de rata de la probasina–, o els AREs -1 i -2 del promotor proximal del gen homeòtic murí *Pem*, entre d'altres [64, 61]. En aquest sentit, Claessens *et al.* proposen com a mecanisme general d'especificat androgènica un mecanisme de dimerització alternatiu per l'AR, que implica la unió a aquests AREs selectius –que fonamentalment poden ser vistos com a elements amb una configuració de repeticions directes–, mitjançant una dimerització amb orientació “cap-i-cua” (veure fig. 17), dotant el protagonisme al segon dit de zinc del receptor [65].

Accions reguladores post-transcripcionals

Si bé les hormones esteroïdals medien els seus efectes generalment a través de la interacció amb els seus receptors nuclears, que alhora s'uniran a seqüències específiques de DNA –en les regions reguladores de llurs gens diana– per activar-ne la transcripció, la regulació post-transcripcional de l'expressió gènica per part dels esteroides (principalment a través de mecanismes d'estabilització del RNA missatger) també està àmpliament documentada [78, 79].

Pel cas dels andrògens, s'ha descrit un component post-transcripcional en l'expressió renal del citocrom *Cyp2e1*, que es troba sexualment regulada en ratolins. També es coneix des de fa temps que les hormones andrògenes induïrien l'acumulació post-transcripcional del mRNA del EGF (factor de creixement epidèrmic) en les glàndules salivals submaxil·lars (SMG) dels ratolins mascles [80]. En aquest sentit, ha estat demostrat que els andrògens poden modificar en les SMG l'activitat de diverses proteïnes amb activitats d'unió a RNA, concretament en regions del 3'-UTR (3'-*untranslated region*) dels mRNAs riques en adenosines i uridines –les *AU-rich regions*– [81]; en models murins, els andrògens estarien regulant diferencialment els nivells i la distribució subcel·lular de diverses proteïnes d'unió a regions *AU-rich*, com la proteïna HuR o les isoformes de la AUF1, tan a les SMG com en altres teixits [82], influïnt d'aquesta manera en la vida mitja de determinats missatgers per una acció no directament transcripcional.

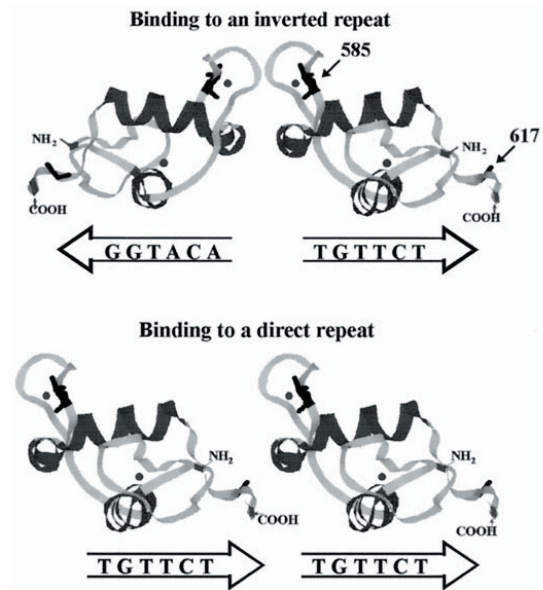


FIG 17. Models esquemàtics d'interacció del domini d'unió a DNA del AR al seu element de resposta en el DNA. En la figura superior es mostra la unió "cara a cara" a un element consens amb una configuració invertida, mentre que en la figura inferior, es mostra la unió del dímer en orientació "cap-i-cua" a l'element conformat per una repetició directa de l'hexàmer TGTTCT. (Extret i modificat de Schoenmakers, E. et al., [83])

3.5 Accions en els teixits reproductius i en els no reproductius

3.5.1 Accions en els teixits gonadals

Com ja s'ha vist en apartats precedents, les funcions principals dels andrògens inclouen la regulació de la secreció de gonadotrofines pel sistema hipotalàmic-pituitari, la iniciació i manteniment de l'espermatogènesi, la formació del fenotip masculí durant la diferenciació sexual, la promoció de la maduresa sexual en l'eclosió de la pubertat i, el control del comportament i potència sexual masculina. Moltes d'aquestes accions virilitzants tenen lloc en els teixits genitals primaris i secundaris, encarregats i responsables de l'èxit reproductiu (veure apartats 3.2.3 i 3.2.4).

3.5.2 Efectes en els teixits extragonadals

El dimorfisme sexual és obvi en la majoria d'espècies de mamífers, conseqüència del desenvolupament diferencial dels genitals interns i externs així com de les característiques "extragenitals" com la mida corporal, caràcters secundaris i components cel·lulars específics. El terme "dimorfisme sexual" fa referència a qualsevol diferència de forma –independentment que es manifesti o no– a nivell morfològic o a escala molecular. Fora dels teixits reproductius, els andrògens provoquen una sèrie de respostes que determinen la manifestació d'un conjunt de caràcters sexualment dimòrfics extragenitals.

Respostes en el fetge

Les diferències sexuals referents a expressió gènica al fetge s'han reportat en espècies diferents incloent la rata, el ratolí i en l'home. Aquestes diferències ocorren en enzims implicats en el metabolisme d'esteroides i de drogues, en el *imprinting* neonatal determinat per l'exposició a hormones sexuals i en proteïnes secretades com les MUPs (*major urinary proteins*).

La síntesi d'altres proteïnes hepàtiques com les monoxigenases de funció mixta també està estimulada pels andrògens, però les millor caracteritzades en rosegadors són les MUPs en el ratolí i la α 2-microglobulina. Els ratolins adults excreten a l'orina un grup de proteïnes amb característiques semblants a l' α -microglobulina; tan els mascles com les femelles n'excreten, però els primers ho fan en quantitats majors. El tractament de femelles amb andrògens produeix un increment en la seva excreció urinària d'aquestes proteïnes. la síntesi de les MUPs a nivell hepàtic vindria controlada hormonalment a nivell de mRNA.

Perfils dimòrfics de secreció de GH

L'hormona de creixement (GH) és una hormona polipeptídica secretada primàriament per la glàndula pituitària. Està implicada de manera principal en la regulació del creixement longitudinal, entre d'altres múltiples accions en la majoria de teixits.

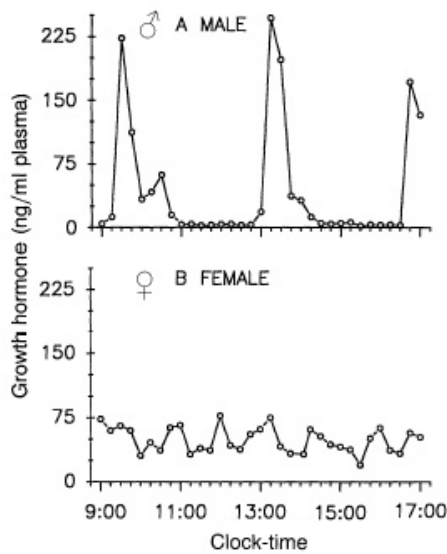


FIG 18. Perfil dels nivells plasmàtics de GH en rates mascles i femella adultes. (Extret i modificat de Waxman, DJ et al., [86])

La GH és secretada d'una manera polsant al llarg del temps, per promoure tan el creixement com diverses accions metabòliques. El patró de secreció sexualment dimòrfic observat de la GH, subministra un mecanisme important per la regulació transcripcional dels gens expressats diferencialment entre sexes en el fetge.

Les cascades de senyalització descrites per aquests mecanismes inclouen la proteïna kinasa JAK2 i membres de la família de factors de transcripció STATs, principalment a través de STAT5.

La mediació de l'expressió hepàtica sexualment dimòrfica –regulada pels polsos de GH– proposada per STAT5, està suportada per la presència d'elements de resposta a STAT5 en les regions promotores de varis gens específics masculins [84]. Additivament, la disrupció dirigida del gen *Stat5b* en ratolí comporta la pèrdua majoritària de les múltiples respostes sexualment diferenciades, associades amb la secreció pulsativa de GH [85].

En moltes espècies –incloses la humana, rates i pollastres–, la secreció de GH per part de la pituitària es produeix d'una manera intermitent i pulsativa [86], amb importants diferències entre sexes en la freqüència del polsos: en el cas de la rata femella adulta, una elevada freqüència en la pulsació secretora es tradueix en una presència continuada de GH en la circulació; aquesta situació contrasta amb el cas dels mascles púbers, en els quals la presència de GH al torrent sanguini és intermitent (amb períodes de 2-2,5 hores en els quals la GH circulant és pràcticament indetectable), degut al seu patró de secreció pulsatiu característic [87].

Estudis en rates i ratolins han demostrat que l'expressió –sexualment diferenciada– d'un nombre de proteïnes hepàtiques, inclosos els enzims metabolitzadors d'esteroides i xenobiòtics com els *citocroms*

P450 (CYPs), està determinat no tan directament pels andrògens, sinó que a nivell primari pels perfils plasmàtics de GH i només regulat de manera secundària per les hormones gonadals, a través dels seus efectes en l'eix hipotàlamo-pituïtàri i el seu control del patró de secreció de GH. Així, l'estimulació continuada del fetge per part de la GH versus l'acció intermitent és la responsable en primer terme del patró d'expressió d'enzims hepàtics sexe específic, com el cas de diverses isoformes de citocroms P450.

En ratolins, el patró plasmàtic de GH és pulsatiu en ambdós sexes; malgrat això, les respostes dimòrfiques específiques dels CYPs –que també es donen en ratolí– com a conseqüència dels patrons de GH, es poden discernir per les diferents freqüències de pulsació en mascles (interval entre polsos de ~2,5 h) i femelles (interval entre polsos < 1h), [88].

Respostes androgèniques en el múscul

El principal lloc d'acció de la testosterona extragenitalment és en el múscul esquelètic. Malgrat que la magnitud de l'efecte andrògenic en aquest teixit és relativament petita –a nivell de canvis en l'expressió gènica– en comparació amb la d'altres llocs extragenitals com el ronyó, part de la diferència entre el pes corporal entre homes i dones pot ser atribuït a la massa muscular diferencial. L'habilitat dels andrògens per estimular el creixement muscular correlaciona amb la seva habilitat per incrementar la retenció del nitrogen de la dieta. Aquesta darrer efecte és d'un interès històric ja que s'ha utilitzat per mesurar les respostes biològiques d'aquesta classe d'esteroides. La magnitud de la resposta varia entre espècies i entre músculs diferents; la testosterona no és metabolitzada extensivament en el múscul esquelètic excepte en el paquet muscular *levator ani* (dorsal bulbocavernós), que té una capacitat limitada per transformar la testosterona a 5 α -dihidrotestosterona, i a estrògens [34]. La base molecular per les accions miotròfiques dels andrògens en els músculs esquelètics i cardíacs han estat difícils d'entendre. La testosterona, més que la DHT, seria l'esteroides unit preferentment al receptor d'andrògens en aquests teixits, ja que la DHT és metabolitzada ràpidament a androstenediols.

Respostes androgèniques en d'altres teixits

A nivell perifèric, els andrògens també duen a terme una variada sèrie d'accions en altres punts de l'organisme, tan a nivell del sistema nerviós central, com en teixits tan diversos com la pell, l'eritòcit, la glàndula salival o el moll de l'òs. En aquest darrer teixit tindrien un cert impacte en el sistema immunològic, participant en el desenvolupament dels limfòcits B i dels T (això a nivell tímic) [89], entre d'altres efectes indirectes en el creixement ossi i en l'eritropoesi. Com a tall d'exemple, la síntesi d'hemoglobina en l'eritrocit pot ser controlada independentment tan per l'eritropoetina com per la testosterona. La secreció d'eritropoetina per part del ronyó pot ser incrementada per part dels andrògens i es creu que transcorre mitjançant la intervenció del receptor d'andrògens [34].

En rata i ratolí, ha estat descrita l'expressió estimulada per la testosterona de diverses proteïnes (algunes d'elles secretades) a la glàndula salival submaxil·lar, que és uns dels altres teixits no reproductius que mostren un elevat dimorfisme sexual en rosegadors [90, 91].

L'acció androgènica també es fa notar a nivell cutani, concretament al fol·licle pilós i a la glàndula sebàcia, que són dos dels llocs diana d'acció perifèrica de les hormones androgèniques a la pell, on estimulen la proliferació i el creixement de la unitat pilosebàcia [92].

3.6 Dimorfisme sexual del ronyó: aspectes fisiològics, cel·lulars i moleculars

3.6.1. El ronyó murí com a model per l'estudi de l'acció androgènica

Com ja s'ha vist, els efectes dels andrògens als teixits mamífers són nombrosos i variats. En el mascle, el seu rol fisiològic fonamental és el de regular el creixement i la diferenciació dels òrgans sexuals primaris i secundaris. En els teixits no genitals, tanmateix, moltes de les respostes sexualment dimòrfiques ocasionades pels andrògens es produeixen per mecanismes que són idèntics als transcorreguts en els òrgans del tracte reproductiu masculí, i per lo tant, la classificació dels efectes d'aquestes hormones esteroidals com a androgènics o anabòlics no té gaire sentit. Segons el teixit diana, la resposta als andrògens a nivell cel·lular inclourà hiperplasia (increment del número de cèl·lules mitjançant divisió i multiplicació), hipertròfia (engrandiment de les cèl·lules) o ambdues. Els òrgans sexuals accessoris del tracte reproductiu masculí, com la pròstata ventral i les vesícules seminals, són el típic exemple de teixit on l'exposició als andrògens genera tan respostes hiperplàstiques com hipertròfiques, mentre que en altres teixits com el ronyó predominarien les segones, amb mínimes variacions en la síntesi de DNA [93, 94].

El ronyó de ratolí, un dels teixits més andrògen-depenents [74], ofereix una sèrie de característiques que faciliten l'estudi dels efectes androgènics a nivell de transcripció gènica:

- i) Efecte hipertròfic dels andrògens, amb baixa estimulació de la síntesi de DNA. Fins i tot en condicions que indueixen l'expressió de gens enzimàtics elevant llur activitat fins més de 1000 vegades, la síntesi de DNA i la taxa divisòria de replicació observada és mínima [95]. Aquesta característica de patir una resposta eminentment hipertròfica –sense component proliferatiu important–, simplifica força l'estudi dels efectes androgènics en l'expressió gènica, ja que descarta el increment degut a un augment del nombre de cèl·lules, que podria emmascarar les variacions transcripcionals reals.
- ii) Activitat *testosterona 5 α -reductasa* mínima (generació de DHT negligible dins el teixit). Les cèl·lules renals expressen quantitats petites de l'activitat enzimàtica *5 α -reductasa*, encarregada de catalitzar la transformació de testosterona a *5 α -dehidrotestosterona*. Així doncs, en el ronyó murí la testosterona –i no la DHT– és l'efector fisiològic majoritari del fenotip androgènic induït [93], simplificant també la interpretació de les dades en l'estudi dels efectes primaris dels andrògens en llur cèl·lules diana.
- iii) Inducció de l'expressió –fins a nivells moderats/alts, òptims per ser analitzats– d'un nombre variat de gens per l'estudi. Dins el ronyó, el lloc principal d'acció dels andrògens recau sobre les cèl·lules epitelials del túbul proximal. L'hormona estimula la hipertròfia dels túbuls proximals i de les cèl·lules de la càpsula de Bowman [96]. Aquest procés bé acompanyat per marcats canvis estructurals i morfològics en els orgànuls subcel·lulars –observables sota microscopia electrònica– sobretot a nivell de mitocondries i del sistema lisosomal-vacuolar autofàgic [97].

La natura d'aquesta inducció afecta a l'expressió de varis enzims i proteïnes, l'activitat de les quals es veu augmentada per acció dels andrògens, o disminuïda en el cas d'una manipulació externa a la baixa dels nivells circulants de l'hormona. Aquestes induccions es verifiquen de forma primària a través d'increments en les concentracions dels corresponents RNA missatgers, fonamentament a nivell transcripcional tot i que s'han descrit també fenòmens de regulació post-transcripcional (*Odc*, *Cyp2e1*, [96, 163]).

- iv) Disponibilitat de soques murines genèticament defectives en determinats gens, com la *Tfm/Y*, que presenta una alteració en el AR que la fa insensible als andrògens. El ratolí s'ha revelat útil

en l'anàlisi de l'expressió gènica; un gran nombre d'espècies, subespècies, soques consanguínies i salvatges està disponible, amb importants diferències d'expressió de determinats marcadors, i una interessant diversitat assolida al llarg de l'evolució dins el gènere *Mus*. Per altra banda, la utilització del ratolí com a model animal per a realitzar els estudis ofereix les avantatges de fàcil manipulació i possibilitat de realitzar múltiples intervencions farmacològiques, a més d'oferir un ventall de soques amb característiques particulars d'utilitat.

En resum, el fenotip masculí en un teixit diana concret pot ser interpretat com a conseqüència de la suma de l'expressió del conjunt de gens regulats pels andrògens en aquell teixit. En aquest sentit cal esmentar que a nivell individual existeixen variacions en les cinètiques de resposta i temps d'inducció dins una mateixa cèl·lula, entre diferents gens regulats per andrògens [93], suggerint al respecte que la interacció del receptor d'andrògens amb cada gen diana individual és única, caracteritzant-se per diferents afinitats pels llocs d'unió, configuracions locals de la cromatina, o pel requeriment de diferents quantitats de receptor i proteïnes accessòries per produir cada resposta.

La inducibilitat d'aquests gens mostra importants variacions genètiques entre les diferents soques i espècies de ratolí; aquesta variació deriva d'alteracions i peculiaritats tan en elements genètics en *cis* com d'actuació en *trans*. Entendre les bases moleculars d'aquest control genètic és de considerable interès i ha esdevingut particularment important en l'estudi de la genètica i l'evolució dels patrons d'expressió gènica en els organismes superiors [98].

Dimorfisme sexual en el creixement i mida renals

Ontogènia i influència dels andrògens neonatals

El ronyó dels mascles és més gran que el de les femelles en moltes espècies animals, inclosos els ratolins [99]; en aquests últims, les diferències observades en la mida renal s'atribueixen a l'estatus androgènic de l'animal, ja que la castració dels mascles i l'administració de testosterona a femelles –o a mascles castrats– fa disminuir i créixer la grandària dels ronyons, respectivament [100].

Durant el període neonatal, s'esdevé un prominent pic circulant de testosterona en els mascles, tan en ratolins com en rates, que no s'observa en les femelles corresponents. Posteriorment els nivells masculins decauen i es mantenen mínims fins al període puberal en que tornaran a ascendir assolint els nivells típics dels adults, mentre que en femelles, els nivells androgènics són molt menors que els corresponents als dels mascles d'edat similar. En l'etapa puberal també s'establiran i es consolidaran els patrons diferencials de secreció de GH típics masculins i femenins.

La presència d'andrògens en aquest període neonatal crític es creu que està implicada en la programació del tipus de característiques pròpies masculines i en la fixació de les respostes androgèniques de l'adult. De tota manera, la hipòtesis de l'empremta neonatal responsable de la diferència sexual en la mida renal produïda pels andrògens no es coneix del tot a fons, ni tampoc els mecanismes ni el paper dels andrògens en els patrons de creixement renal, que donen lloc a aquest dimorfisme observat en els adults.

Situacions d'hipertrofia renal

Dins la fisiopatologia renal, els processos de hipertrofia i de creixement compensatori mereixen un especial interès ja que es produeixen en varies situacions fisiològiques com l'embaràs, o en processos patològics com la nefropatia diabètica o la malaltia renal crònica (en resposta per compensar la pèrdua

de teixit funcional renal). El tractament amb andrògens produeixi hipertròfia renal provocant la inducció de l'enzim sigui l'ornitina decarboxilasa (Odc), implicada en la síntesi de poliamines. Aquestes molècules juguen un paper fonamental en el creixement i la proliferació cel·lular, que juntament amb l'estreta interrelació entre l'eix gonadal i l'eix hipotalàmic-somatotròfic, pot donar una idea de les complexes interrelacions existents entre les hormones sexuals masculines i alguns dels processos abans esmentats. Malgrat això, la naturalesa exacta dels fenòmens moleculars que els caracteritzen no s'ha pogut establir encara detalladament.

Per intentar mimetitzar els processos de creixement renal, s'han desenvolupat en rata i ratolí diferents models de hipertròfia renal mitjançant intervencions farmacològiques o quirúrgiques. D'aquesta manera s'intenta poder caracteritzar millor els mecanismes de creixement, avaluant el possible paper que poden jugar-hi els andrògens, l'Odc i les poliamines –juntament amb components del sistema GH/IGF-I–, entre d'altres factors.

Alguns models de hipertròfia renal i creixement renal compensatori:

- i) Hipertròfia compensatòria promoguda per nefrectomia parcial o unilateral
- ii) Diabetis experimental induïda amb stanozolol (per reproduir la nefropatia diabètica)
- iii) Hipertròfia renal induïda per tractament androgènic
- iv) Creixement renal associat a hipertiroïdisme: tractament amb tiroxina
- v) Creixement hiperplàstic: model de dany i regeneració renal induït per folat o drogues anàlogues

Per comentar alguns d'aquests models citats, començarem amb el model de creixement renal compensatori (*compensatory renal growth, CRG*) post-nefrectomia unilateral (UNX), (i), desenvolupat en rata: l'eliminació quirúrgica d'un dels dos ronyons en la rata provoca un engrandiment i un augment de la capacitat del ronyó restant, per compensar la pèrdua de funcionalitat. L'estudi detallat del procés de creixement compensatori ha revelat que els mecanismes utilitzats varien segons es tracti de rates mascles adultes o de rates prepuberals i/o femelles adultes, es a dir, dependrà primàriament de la presència o no d'uns nivells suficients d'andrògens a la circulació [101-104]. A nivell temporal es pot desglossar els processos que desemboquen en aquest creixement renal en dues fases progressives,

–primera fase (fase inicial), verificada en les ~18-48h post-UNX

–segona fase (o fase tardana), que transcorre durant les ~48-72h post-UNX

Segons el sexe dels animals i els seu estat androgènic aquestes dues fases tindran característiques diferenciades, pel que cal distingir entre animals prepúbels i animals adults:

1) En les rates juvenils (tan mascles com femelles) tindrem,

fase inicial. una primera fase de creixement caracteritzada per:

- creixement extremadament ràpid
- independència de la intervenció de l'hormona de creixement (resulta insensible al bloqueig de la secreció de GH),
- component important d'hiperplasia amb influència paracrina de l'eix IGF-1/IGF-1R (autònomament de la GH),

En aquesta situació, l'acció mitogènica del IGF-1 (*insulin-like growth factor*) a través del seu receptor IGF-1R, induiria la transcripció de gens de resposta matineria com *c-jun* i *c-fos* (constituents del factor de transcripció AP-1), fet que es traduiria en un clar efecte mitogènic d'estimulació de síntesi de DNA i divisió cel·lular.

fase tardana. La segona fase vindria marcada per una fase hipertròfica amb taxes de creixement menors.

2) En el cas de les rates mascles adultes (*i.e.* amb andrògens presents, i amb el consegüent patró masculí pulsàtil de secreció de GH establert), en canvi,

fase inicial. la primera fase del CRG és clarament hipertòfica amb un increment important en els pics de secreció pituitària de GH i sense augments en l'expressió del IGF-1.

segona fase. vindria descrita per una petita component hiperplàstica (augment en l'índex mitòtic) probablement relacionada amb augments dels nivells renals d'IGF-1.

En resum podríem parlar d'una primera fase del CRG purament hipertròfica en el cas dels mascles adults i d'una primera fase amb un component inicial hiperplàstic (*i.e.* de mitogènesi) en rates prepuberals (d'ambdós sexes). El paper i la presència dels andrògens en aquests processos sembla doncs que és determinant, ja que l'arribada de la pubertat –en la qual augmenta la secreció de testosterona i es fixen els patrons masculins de secreció de GH en les rates–, produeix un canvi en el mecanisme de resposta compensatòria, passant-se d'un tipus de respostes a unes altres ambdues conduents a un mateix fi regeneratiu.

Altres models en els que es produeix un dany del teixit renal són en la nefrectomia parcial de 5/6 parts dels ronyons o en la nefropatia diabètica [105-107], en la que es produeix una progressiva reducció funcional renal amb augment de la fibrosi tubulointerstitial i de glomerulosclerosi. En aquests dos casos, s'identificaria una primera fase ràpida de creixement hipertròfic amb augment de la filtració glomerular, que evolucionaria cap a una fase escleròtica tardana de progressiu detriment renal, amb la participació de factors com el TGF- β , TNF- α o IGF-1.

Menció especial mereix el model de creixement hiperplàstic per dany renal i regeneració [108,109]: el tractament amb folat o amb el fàrmac CB3717 indueix dany als túbuls renals (per precipitació i formació de cristalls que malmeten l'epiteli tubular). Aquesta agressió aguda bé seguida per una resposta reparadora de creixement caracteritzada per una hiperplasia regenerativa, amb una considerable inducció de l'enzim Odc i de la síntesi de poliamines. La presència de testosterona potenciarà aquest efecte ja que per ella mateixa també indueix l'expressió de Odc. En aquest model també intervindria el sistema del *hepatocyte growth factor*, HGF i el seu receptor cel·lular, *c-met*, que estaria implicat en la regeneració tissular, l'embriogènesi i la reparació de ferides entre d'altres. La interacció entre la via de senyalització activada pels andrògens i mediada pel AR amb la via de senyalització que transcorre a través de HGF/*c-met* (activada en models de dany i regeneració renal), al ronyó de ratolí resulta en un antagonisme que reverteix en una modulació negativa de l'expressió renal d'Odc i de *c-met*.

S'han descrit, a més, interaccions *cross-talk* entre els efectes dels andrògens via el seu receptor, amb altres vies de senyalització lligades a receptors de membrana com la de les catecolamines [110].

El dany renal agut provoca respostes inflamatòries mediades per citokines com l'IL-6, que a través de la unió paracrina al seu receptor desencadenaria una cascada de senyalització (via STATs); entre d'altres gens, induïria la transcripció de HGF i del seu receptor *c-met*. L'expressió d'aquests dos factors mitogènics i morfogènics estimularien la síntesi de DNA i la divisió cel·lular per reparar el dany inicial. Els andrògens a través de la sobre-regulació de l'expressió de *c-met* podrien estar intervenint en aquests processos, fet que suggereix una resposta sexualment diferenciada en els ronyons de ratolí en front del dany sofert [110].

En el cas de l'hipertròfia renal associada a hipertiroidisme, el tractament de ratolins amb tiroxina induïria un creixement renal amb elevació de l'índex mitòtic, a través del sistema de la renina-angiotensina,

incrementant els nivells transcripcionals de la renina i en conseqüència augmentant la producció renal de angiotensina II, que a part de llurs accions en el to vascular també produeix accions mitogèniques influent en la proliferació cel·lular [111].

Per tant la importància dels andrògens i la seva íntima interrelació amb altres vies de senyalització com la de l'hormona de creixement / IGF-1, TGF- β o altres és remarcable, donant una idea del grau d'afinament i de complexitat que caracteritza el creixement renal en resposta adaptativa a diferents situacions fisiopatològiques. La resposta de creixement particular renal dependrà doncs del programa genètic intrínsec que serà específic de cada tipus cel·lular i vindrà establert durant el desenvolupament i durant la pubertat, així com dels factors endocrins, paracrins i altres factors de creixement presents en l'ambient local en unes determinades circumstàncies.

Dimorfisme sexual en el metabolisme i l'excreció d'anions i cations orgànics

La manera amb la que el ronyó processa certs compostos presenta, en algunes espècies, trets diferencials segons el sexe . Ja des de fa molt temps es coneix que existeixen diferències lligades al sexe en el transport d'ions orgànics per part del ronyó [112]. En aquesta línia s'ha suggerit que la testosterona tindria un efecte estimulador en varies funcions cel·lulars renals, entre elles la secreció d'anions i cations orgànics. En general, la secreció renal d'anions orgànics és superior en individus mascles que en femelles, com a conseqüència d'això molts dels xenobiòtics –però no tots– que són excretats per l'organisme a través d'aquesta via són eliminats més ràpidament per animals mascle que per animals femella.

L'existència de diferències en l'expressió degudes al sexe ha estat descrita per varis transportadors d'anions i cations orgànics: per exemple, l'Oat2 (*Slc22a2*) i l'Oatp1 (*Slc21a1*) de rata es troben molt més expressats en el ronyó de mascles que en el de femelles; pel contrari, en el cas de Oat2 (*Slc22a7*), les rates femella mostren una expressió molt major en els tubuls proximals renals que la corresponent en rates mascle.

També s'ha descrit l'existència de dimorfisme sexual en l'aclariment renal, la farmacocinètica i l'excreció tubular de varies substàncies i fàrmacs com el *zenarestat*, l'àcid perfluorooctanoic (PFOA), l'estradiol-17 β -glucuronid (E₂17G), *p*-aminohipurat (PAH) (*figura 10*), tetraetilamoni, i poliamines, entre d'altres [113-118]. Aquesta divergència entre sexes presenta dos comportaments ja que alguns compostos presenten una excreció urinària superior en femelles, i d'altres molècules pateixen una excreció urinària netament superior en mascles. La dualitat observada pot justificar-se amb la interacció efectiva d'aquests soluts orgànics amb múltiples entitats transportadores –situades a dominis tubulars oposats (luminal o contraluminal–, i d'expressió eventualment diferencial entre sexes.

Aquesta última característica determinarà el fluxe net de transport absolut per aquella substància (*i.e.* secreció activa i/o reabsorció), segons domini un component o un altre; en qualsevol cas, tan el tipus de compost tractat com les diferències d'expressió i localització de les activitats transportadores, determinaran en darrer terme la manifestació o no d'una excreció diferencial entre sexes.

Agrupant les evidències observades que suggereixen un paper estimulador pels andrògens de certs processos metabòlics, i el fet de la modulació de les hormones androgèniques en l'excreció renal de certs ions orgànics i xenobiòtics, es pot concloure que possiblement existeixi un enllaç i una actuació concertada entre el metabolisme renal sexualment dimòrfic i l'aclariment i secreció corresponents, amb una sèrie

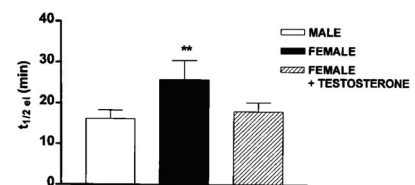


FIG 19. Efecte de la Testosterona en la vida mitjana d'eliminació (t_{1/2}) del *p*-aminohipurat (PAH). Estudis farmacocinètics realitzats en rates anestesiades. **P < 0.01. (Extret i modificat de Reyes JJ et al., [114])

d'activitats enzimàtiques i de transportadors coordinadament modulats pels andrògens, determinant patrons renals fisiològics i farmacocinètics sexualment específics.

Hormones sexuals i hipertensió

Les hormones sexuals tenen una influència important en la pressió sanguínia. En animals de laboratori, tan les rates mascle de les soques SHR (*spontaneously hypertensive rats*), *Dahl salt-sensitive* o *New Zealand genetically hypertensive rats*, tenen pressions sanguínies més elevades en comparació amb les femelles corresponents [119-121]. En aquests models animals de hipertensió, la pressió sanguínia dels mascles sovint s'atenua per castració, mentre que –pel contrari– no s'incrementa en les femelles ovariectomitzades. Aquest fet suggereix que les diferències en la pressió sanguínia associades al sexe també poden venir donades per canvis en les hormones androgèniques testiculars. Similarment als rosegadors, aquestes diferències sexualment determinades també es manifesten en humans; per exemple, durant l'adolescència apareix un dimorfisme sexual en la pressió arterial que persistirà al llarg de tota l'edat adulta [122].

Diversos estudis en animals han suggerit que la testosterona és una hormona pro-hipertensiva que podria estar contribuint a la patogènesi de les malalties cardiovasculars, tot afectant una sèrie de factors humorals, i intervenint en diferents mecanismes vasculars, cardíacs o renals [123].

El ronyó, en concret, juga un paper majoritari en la regulació de la pressió arterial, de forma que anormalitats renals poden contribuir al desenvolupament i manteniment de hipertensió [124]. Un defecte comú observat en fenòmens de hipertensió a nivell renal és un viratge cap la dreta en els perfils de la relació pressió/natriuresi, amb diferències observades en l'hemodinàmica renal associades al sexe.

A través de les evidències recopilades en estudis animals s'accepta que la testosterona disminueix l'habilitat d'excretar sal per part dels ronyons i per tant predisposant-los cap a la hipertensió. Si això mateix pot estar passant en humans no es coneix amb seguretat [122].

Els ratolins *knock-out* pel *Cyp4a14*, monooxigenasa de funció mixta expressada a ronyó i activa en el metabolisme oxidatiu de l'àcid araquidònic, desenvolupen hipertensió que es manifesta més severament en mascles que en femelles [125]. Els nivells renals del mRNA de l'angiotensinògen són majors en rates mascles que en femelles, reduint-se per castració de les primeres [126,127].

Els andrògens poden afectar, doncs, mecanismes renals que poden influenciar adversament la funció del ronyó i la pressió sanguínia, desembocant eventualment en hipertensió.

3.6.2. Gens regulats pels andrògens a ronyó

El tractament amb andrògens indueix l'expressió renal d'una sèrie de productes gènics principalment a les cèl·lules del túbul proximal. Fruit de l'ús extensiu del model renal per a l'estudi de les accions androgèniques, al llarg dels anys han estat descrits i estudiats tradicionalment una sèrie de gens l'expressió dels quals s'indueix en el túbul proximal en resposta a la testosterona [96]. Entre ells trobem gens de proteïnes enzimàtiques com la β -glucuronidasa (β -gluc), l'alcohol deshidrogenasa, l'ornitina decarboxilasa (ODC), o gens que codifiquen per a proteïnes de funció desconeguda, com la Kidney androgen-regulated protein (KAP) o la D7Rp2 (abans RP-2). A tots aquests gens "clàssics" regulats pels andrògens s'han anat afegint nous gens identificats en els darrers anys tan en ratolí com en rata (*vide infra*), que també mostren una expressió renal dimòrfica entre sexes, augmentada en mascles.

Entre tot aquest conjunt de gens andrògen-depenents (*taula VIII*), alguns dels quals són tractats en aquesta tesi, trobem proteïnes de funcionalitats diverses com són enzims de la fase I i II del

metabolisme de xenobiòtics –l' arilamina *N*-acetiltransferasa-2 (*Nat2*) i l'alcohol deshidrogenasa-1 (*Adh-1*)–, o també algunes monoxigenases de funció mixta implicades en el metabolisme oxidatiu d'àcids grassos, eicosanoides i xenobiòtics com els Citocroms P450 2e1, 4b1 i 4a12; enzims que intervenen en el metabolisme d'aminoàcids i síntesi de poliamines com l'Odc i la SSAT; enzims hidrolítics com la β -glucuronidasa o del metabolisme d'àcids grassos com l'acil-CoA sintetasa, S_A , i receptors de factors de creixement com *c-met*. Altres gens l'expressió dels quals està estimulada per la testosterona corresponen a transportadors integrals de membrana, de la família dels transportadors d'anions –com *Oatp1*, *Oatp-d*–, i de cations –com *Oct2*[†]– orgànics; també hi figura el gen de l' Angiotensinògen^{*}, *Ang-n*, prohormona peptídica implicada en els sistemes de regulació de la pressió arterial. (*regulació descrita en rates).

TAULA VIII. Classificació funcional d'alguns gens murins regulats per andrògens a ronyó

Categoria funcional	Gen		Ref
Enzims hidrolítics	<i>Gus</i>	β -Glucuronidasa	[134]
Metabolisme aminoàcids /poliamines	<i>Odc</i>	Ornitina decarboxilasa	[135]
		Arginasa	[136]
	<i>SSAT</i>	<i>Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase</i>	[137]
Enzims de la Fase I del metabolisme oxidatiu	<i>Cyp2e1</i>	Citocrom P450 2e1	[138]
	<i>Cyp4b1</i>	Citocrom P450 4b1 [†]	[139]
	<i>Cyp4a12</i>	Citocrom P450 4a12	[125]
	<i>Adh-1</i>	Alcohol deshidrogenasa 1	[140]
Enzims de la Fase II del metabolisme oxidatiu	<i>Nat2</i>	arilamina <i>N</i> -acetiltransferasa 2	[141]
		UDP-glucuronosiltransferases (UGTs) [*]	[142]
Metabolisme de lípidis/ xenobiòtics	S_A	(Acil-CoA sintetasa)	[133]
Sistema RAS (renina-angiotensina)	<i>Ang-n</i>	Angiotensinògen [*]	[126]
Transport (d'anions i de cations orgànics)	<i>Oatp1</i>	<i>Organic anion transporting polipeptide 1 (Slc21a1)</i> [†]	[143]
	<i>Oatp-d/mjam</i>	<i>Organic anion transporting polipeptide-d (Slc21a11)</i> [†]	
	<i>Oct2</i>	<i>Organic cation transporter 2 (Slc22a2)</i> [*]	[31]
Altres	<i>Slp</i>	<i>Sex-limited protein</i>	[144]
	<i>Kap</i>	<i>Kidney androgen-regulated protein</i>	[145]
	<i>D7Rp2e</i>	"androgen-inducible RP2 mRNA"	[146]
Senyalització cel·lular	<i>c-met</i>	" <i>c-met</i> , Receptor de HGF"	[110]

^{*}En rates; [†]Aquest treball

La majoria dels estudis iniciats s'han enfocat en la caracterització dels elements moleculars que medien aquesta expressió gènica en resposta als andrògens en el ronyó murí. Malgrat tot, l'esclariment d'aquests mecanismes ha resultat difícil. Tot i disposar d'un creixent grup de gens marcadors de l'acció androgènica, llur característiques i respostes particulars presenten força heterogeneïtat, tan en les cinètiques d'inducció, temps i grau de resposta, i participació d'altres factors hormonals en llur regulació [74, 96, 128-130]. A més a més, fins ara tampoc es disposava d'un sistema cel·lular adequat que respongués eficientment a l'estimulació amb andrògens, per tal de poder-hi realitzar estudis *in vitro* amb gens reporters que permetessin començar a discernir els elements en *cis* i en *trans* involucrats en la resposta específica de transactivació gènica, mitjançada pels andrògens.

Aquesta mancança s'ha pogut resoldre amb l'establiment de dos línies epitelials immortalsitzades –les PKSV-PCT i les PKSV-PR– derivades de túbul proximal de ratolí, i que corresponen al segment

contornejat (*pars convoluta*) i al segment recte (*pars recta*) del túbul, respectivament [131,132]. Aquestes cèl·lules representen un atractiu sistema per analitzar les accions específiques dels andrògens dutes a terme en el túbul proximal de ratolí, havent-se demostrat que ambdues línies han retingut moltes de les característiques de les cèl·lules parentals de les quals deriven, com l'expressió de receptors d'andrògens o la regulació de gens indicadors com *Kap* i β -*Glu*, sota tractament amb DHT [94].

Recentment han estat utilitzades satisfactòriament en el nostre laboratori per realitzar estudis del promotor del gen *Kap*, analitzant llurs elements de resposta en la inducció teixit específica androgènica [58].

Identificació i estudi de nous gens amb regulació andrògena al ronyó de ratolí

Donat que la naturalesa molecular de la regulació gènica pels andrògens específica de teixit encara no ha estat ben definida, s'han vingut realitzant escomeses per tal d'identificar nous gens de regulació andrògena com a models alternatius als marcadors clàssics (com *Odc*, *Kap*, etc.), que presenten unes respostes complexes i heterogènies, per que puguin ser més informatius.

Mitjançant una aproximació combinada amb les tècniques de RAP (*random arbitrarily primed PCR*) i del RDA (*representative differential analysis of cDNA*) s'ha aconseguit identificar una sèrie de nous gens de ratolí, l'expressió a ronyó dels quals està controlada coordinadament per DHT sota idèntiques condicions d'inducció i en les mateixes mostres [133].

Entre aquests gens murins (*veure taula VIII*) reconeixem al d'un dels citocroms P450 (*Cyp4b1*), el gen S_A (diferencialment expressat a ronyó de rates hipertenses SHR i normotenses WKY), el d'un transportador d'anions orgànics (*Oatp*) i un nou gen identificat, que no s'assemblà significativament a cap altre després d'enfrontar-lo a les bases de dades, al que s'anomenà MJAM, i que posteriorment s'ha vist que es tractava d'un altre membre de la família dels *Oatp*'s. El cDNA complet dels dos primers membres de la llista, ja havia estat clonat prèviament en ratolí, mentre que els cDNAs de la resta (en el moment d'iniciar-se aquesta tesi) no havien estat clonats fins ara en l'espècie esmentada.

Donat que no es coneix el significat fisiològic de l'acció androgènica a ronyó, alguns d'aquests gens identificats a ratolí podrien aportar informació que permetria entendre el significat del dimorfisme sexual renal des del punt de vista fisiopatològic.

En resum, s'ha vist com el ronyó del ratolí representa un sistema experimental únic per l'estudi de la regulació de l'expressió gènica induïda per les hormones esteroidals andrògenes, amb l'existència de varis gens en aquest teixit que responen d'una forma específica a l'estimulació amb testosterona. Malgrat que ens els últims temps s'ha progressat en l'estudi dels aspectes bioquímics i genètics de l'expressió gènica –induída pels andrògens al ronyó de ratolí–, encara es desconeixen bastants qüestions sobre els possibles factors i mecanismes moleculars responsables de les respostes d'inducció, i de la seva variació entre espècies i soques murines.