



#### 4.1. Descripció

Els citocroms P450 (CYP) constitueixen una vastíssima superfamília d'enzims crucials per el metabolisme oxidatiu, peroxidatiu i reductiu d'un grup divers de compostos fisiològics endògens, com els esteroides, àcids biliars, àcids grassos, eicosanoides, i d'un rang encara major de xenobiòtics, inclosos la majoria de drogues i fàrmacs terapèutics així com molts contaminants químics ambientals [147].

Les primeres evidències experimentals en relació amb els CYPs daten de finals de la dècada dels 50 on els treballs pioners de Axelrod, Brodie, Garfinkel, i Klingberg entre d'altres, identificaren un pigment en els microsomes hepàtics que era capaç d'unir monòxid de carboni produint un espectre amb un pic d'absorció característic a 450 nm (*veure* <<http://www.issx.org/hisnov.html>>).

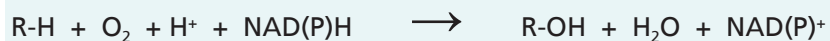
La primera via metabòlica en que es va demostrar la participació de P450 va ser en l'hidroxilació del carboni-21 dels esteroides corticoïdals produïda a les glàndules adrenals [148], confirmant-se el seu paper com a oxidases terminals en el sistema microsomal hepàtic de mamífer, d'on havien estat identificats originàriament. Més tard han estat descoberts virtualment a cada classe d'organisme. En mamífers, tot i ser majoritaris al fetge, s'han identificat P450s també en molts altres òrgans.

En els humans, són els principals responsables de la metabolització i detoxificació de moltes drogues i fàrmacs, de manera que tradicionalment aquestes proteïnes han despertat un gran interès entre farmacòlegs i toxicòlegs.

#### 4.2. Estructura i propietats enzimàtiques

El citocroms P450 (EC 1.14.14.1), també anomenats oxigenases de funció mixta, són enzims monomèrics\* principalment microsomals que poden catalitzar l'oxidació d'un amplíssim ventall de substrats essencialment lipofílics, que pot anar des de petites molècules orgàniques com l'etilè ( $M_r$  28) fins a compostos de la grandària de la ciclosporina A ( $M_r$  1201). La majoria de reaccions catalitzades pels CYPs procedeixen amb l'estequiometria típica de les monooxigenases [149].

Entre les reaccions catalitzades per aquest grup d'enzims trobem hidroxilacions, epoxidacions, *N*-oxidacions, sulfoxidacions, *N*-, *S*-, i *O*- desalquilacions, desulfatacions, desaminacions i reduccions de nitro, azo i *N*-òxid grups. Actuen conjuntament amb les *NADPH*-ferrihemoproteïn reductases (EC 1.6.2.4), flavoproteïnes encarregades de subministrar als CYPs els equivalents de reducció provinents del *NADPH*, formant el sistema pròpiament dit de les monooxigenases de funció mixta. La seva reacció catalítica típica és la següent:



El mecanisme catalític de monooxigenació pot ser considerat en dos parts, activació de l'oxigen molecular i oxidació del substrat. Les reaccions totals d'oxigenació inclouen els processos d'hidroxilació de carboni i dels heteroàtoms N, S i I, desalquilació d'amines i èters, i epoxidació. Totes aquestes reaccions poden ser racionalitzades en termes de dos etapes, abstracció d'un àtom d'hidrogen (o d'un electró) i unió d'oxigen (recombinació del radical) [149].

\*contenen un grup *hemo* de tipus *b* (ferro-protoporfirina IX)

Els P450s solen ser proteïnes d'uns 400-530 aminoàcids, amb l'excepció del CYP103 de *Bacillus Megaterium*, flavocitocrom que té 1048 residus, producte de la fusió del P450 pròpiament dit amb un domini C-terminal corresponent a una *NADPH-P450 reductasa* (veure figura 20).

La gran majoria de citocroms P450 disposen d'una cisteïna altament conservada en la part C-terminal de l'enzim, implicada en la unió del grup *hemo*, que es situa en la cinquena posició de coordinació amb el tiolat.

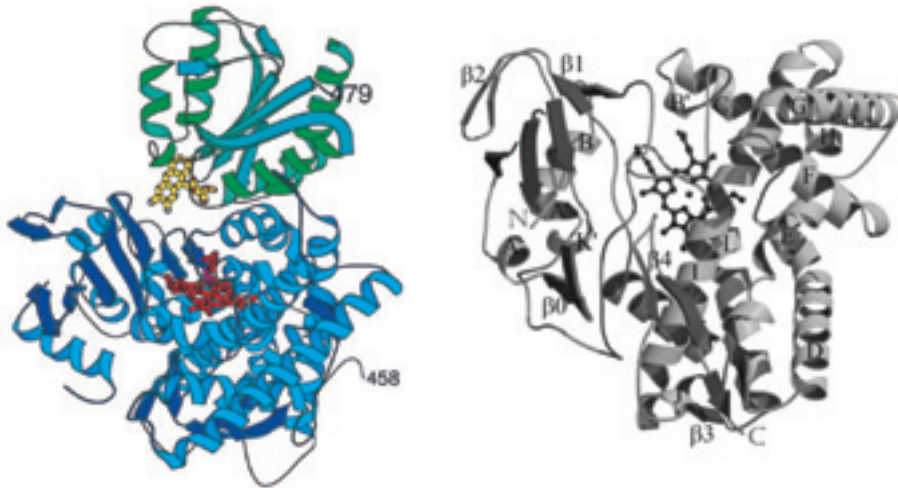


FIG 20. Plegament i model de l'estructura tridimensional dels CYPs. Representacions tridimensional de l'estructura de la proteïna P450-like codificada pel gen OxyB, d' *Amycolatopsis orientalis*. (extret i modificat a partir de Zerbe, K et al., [150]) –dreta–, i estructura del complex entre els dominis *hemo* i FMN del flavocitocrom de *Bacillus megaterium* P450BM-3 –esquerra–, (adaptat i modificat de Sevrioukova, IF et al., [151])

### 4.3. La superfamília dels P450

Tradicionalment, els CYPs han despertat un ampli interès –donada la seva significància com a enzims– en una gran varietat de disciplines, que van des de la genètica, la bioquímica i la toxicologia fins a la química biorgànica. També a nivell històric, s'ha considerat que aquesta família d'enzims havia de ser-ne una de molt gran, vistos altres exemples de famílies multigèniques amb nombrosos membres com la dels receptors nuclears, les *Glutatió-S-transferases* i les *UDP-Glucuronosiltransferases* implicades en el metabolisme de drogues [152].

La superfamília gènica dels citocroms P450 comprèn actualment més de 1200 membres repartits per tot el domini de la vida entre més de 85 espècies eucariotes (de plantes fins a vertebrats) i en més de 20 espècies diferents de procariotes [153] (taula IX). Aquesta multiplicat de gens s'agrupa en famílies i subfamílies en base a l'homologia a nivell de llurs seqüències proteïques. En mamífers trobem representades unes 14 famílies les quals es subdivideixen en més de 29 subfamílies, que alhora comprenen els gens individuals (des d'un únic gen fins a una agrupació de gens, segons el cas).

#### 4.3.1. Aspectes generals

Els citocroms P450 són proteïnes enzimàtiques encarregades de la metabolització de drogues i de la biosíntesi de colesterol, esteroides i altres lípids importants com les prostaciclins i el tromboxà A<sub>2</sub>, ambdós metabòlits derivats de l'àcid araquidònic. En els humans, mutacions en els gens dels citocroms P450 o deficiències en alguna de les seves activitats enzimàtiques poden ser responsables de varies malalties i patologies. L'inducció de certs P450s en alguns teixits és un factor de risc en varis càncers, ja que aquests

enzims P450 induïts poden convertir eficientment procarcinògens en substàncies carcinogèniques.

El nom de citocrom P450 deriva del fet de que aquestes proteïnes contenen un grup hemo que els confereix un peculiar espectre d'absorció. Inicialment van ser descoberts en preparacions microsomals hepàtiques de rata, en les quals es va identificar un pigment que un cop reduït amb monòxid de carboni (bombollejant el gas per la mostra), presentava una prominent banda d'absorció a 450 nm en l'espectre de diferència (el CO es complexa fortament amb el grup hemo ferrós, produint una diferència en

TAULA IX. Distribució d'espècies de les famílies de Citocroms P450 (abreujada)

Família CYP	Classe	Subfamília
1	Mamífers Peixos (condroïcits i osteocits) Aus	A,B A A
2	Mamífers Peixos (osteocits) Aus Crustacis Amfibis	A-G,J K,M,N,P H L Q
3	Mamífers Peixos (osteocits)	A
4	Mamífers Insectes Peixos (osteocits)	A,B,F C-E,G,H,J- N,P-S T
5	Mamífers	A
6	Insectes	vàries
7-8	Mamífers	A,B
9	Insectes	A,B,C
10	Moluscs	A
11	Mamífers Peixos Amfibis	A,B A B
12	Insectes	A,B
13-14	Nemàtodes	A
17	Mamífers Peixos Aus	A
19	Mamífers	A
21	Mamífers	A
24	Mamífers	A
28-29	Mamífers	A
30	Moluscs	A
31-37	Nemàtodes	vàries
40	Mamífers	A
51	Mamífers Angiospermes Llevats Bacteris	A
51-66	Llevats i fongs	vàries
71-99	Plantes amb flors	vàries
101-111	Bacteris	A
119	Arqueobacteris	A

Taula simplificada i adaptada de <<http://p450.abc.hu/classdistrib.html>>, (1997), web allotjada al *Directory of P450-containing systems* <<http://p450.abc.hu/>>, [155]

l'absorbància respecte la cubeta que conté la mostra sense CO). Altres proteïnes que contenen com a cofactor al grup hemo no absorbeixen d'aquesta manera característica dels CYPs, ja que en aquests últims el lligant CO es coordina amb els grups atòmics de l'hemo en una posició i d'una manera diferent.

Els citocroms P450 (CYP) de mamífers són proteïnes integrals de membrana, mentre que els de procarïotes són solubles. Actualment s'han resolt per difracció de raigs X, l'estructura tridimensional d'alguns CYPs bacterians. El primer CYP cristal·litzat fou el *P450<sub>CAM</sub>* (*Camforasa*, CYP101) de *Pseudomonas putida* [154], enzim responsable en aquest bacteri de la metabolització de la càmfora. En general s'assumeix que el plegament dels CYPs de mamífer, units a membrana, es correspondrà al plegament determinat per la camforasa procarïòtica, amb l'afegit d'un cua N-terminal d'ancoratge a la membrana.

Donada la intervenció d'aquests enzims en reaccions de detoxificació i biotransformació de drogues i fàrmacs, la indústria farmacèutica ha mostrat un gran interès en l'elucidació estructural de cristalls de CYPs humans acomplexats als seus substrats, fet que permetrà i facilitarà el disseny de nous fàrmacs candidats amb un potencial farmacològic major.

Els P450 catalitzen molts tipus de reaccions, entre les quals tenen una especial importància les reaccions d'hidroxilació. Aquests enzims s'anomenen oxigenases de funció mixta o monoxigenases, donat que incorporen un àtom d'oxigen molecular en el seu substrat (l'altre àtom d'oxigen va a parar a una molècula d'aigua).

Els compostos químics ambientals o drogues s'anomenen també xenobiòtics. Els citocroms P450 juguen un paper important en el metabolisme d'aquests xenobiòtics, especialment per les drogues lipofíliques (que ho són la majoria). El metabolisme d'aquests compostos dèbilment solubles es realitza en dos etapes: La primera etapa, o fase I, consisteix en la modificació química del substrat amb l'addició d'un grup funcional al qual, en la segona etapa o fase II, es pugui afegir un conjugat més polar que dotarà al conjunt de la molècula transformada final una solubilitat major, de manera que podrà ser excretada del cos més fàcilment generalment a través de l'orina. Molts P450s afegeixen un grup hidroxil en la Fase I del metabolisme de fàrmacs; aquest hidroxil servirà de lloc acceptor de conjugació en posteriors modificacions dutes a terme pels enzims de la fase II del metabolisme de fàrmacs.

Per poder actuar sobre els seus substrats, els citocroms P450 necessiten d'una font d'electrons. L'addició de dos electrons (reducció) al ferro del grup hemo, cofactor de l'enzim, fa possible que es verifiqui el trencament de la molècula d'oxigen. Aquest poder reductor és subministrat al CYP per una altra proteïna que interacciona breument amb el P450 just per transferir-li els electrons. Aquesta cadena de transferència electrònica es produeix en últim terme des de una molècula de NADPH. Pels CYPs localitzats a les membranes del reticle endoplàsmic, la proteïna donadora d'electrons és l'anomenada *NADPH-Citocrom P450 reductasa*, que consta de dos dominis on a cada un dels quals es troba una flavina i que també es troba ancorada a la membrana amb la major part de la proteïna residint al cantó

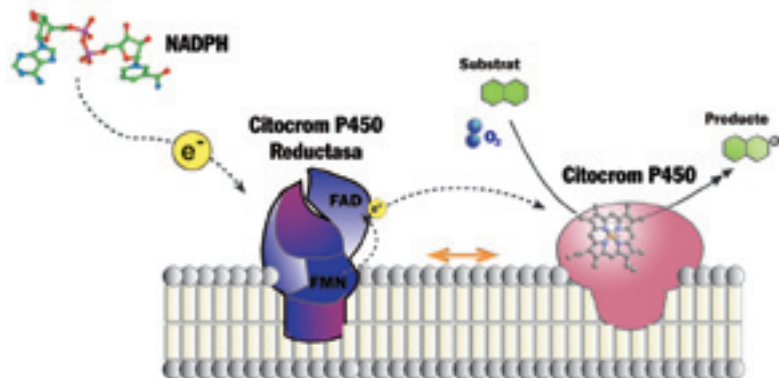


FIG 21. Esquema del sistema format per la NADPH citocrom P450 reductasa i el citocrom P450 microsomal, constituents conjuntament del sistema de les monooxigenases de funció mixta.

citoplasmàtic. Els electrons s'adquireixen del NADPH i migren del FAD al FMN (en la *P450 reductasa*), passant llavors al àtom de ferro del grup hemo en el citocrom P450 (veure figura 21). En la mitocondria –on també es troben alguns P450– la cadena de transferència electrònica es un xic diferent, iniciant-se amb la participació de la *ferredoxina* (el NADPH és també aquí la font d'electrons).

#### 4.3.2. Les famílies de citocroms P450 humans

Per a tenir una idea de la grandiositat de la superfamília de citocroms P450, a hores d'ara es coneixen al llarg de tot el domini viu (plantes i procariotes inclosos) més de 1200 seqüències diferents, i s'estima que poden existir-ne moltíssimes més [155]. La notable diversitat d'enzims CYP ha donat lloc a que les diverses formes individuals es classifiquin sistemàticament en famílies i subfamílies. Les proteïnes P450 es categoritzen en famílies i en subfamílies depenent del grau de semblança entre llurs seqüències. Les seqüències de membres individuals que comparteixen més de un 40% d'identitats a nivell d'aminoàcids són considerades que pertanyen a una mateixa família; dins de cada família, els membres que sobrepassen el 55% de identitats (en *aa*) entre les seves seqüències, s'agrupen en subfamílies.

Actualment s'estima que els humans tenen aproximadament com a mínim 53 CYP gens diferents i 29 pseudogens. A nivell de classificació, els citocroms P450 humans s'organitzen en 18 famílies, conformades per un total de 43 subfamílies gèniques (veure taula X).

Els enzims en les famílies 1-3 són els més actius en el metabolisme de xenobòtics, mentre que la resta de famílies tenen importants funcions en el metabolisme endògen. Com ja s'ha dit, mutacions inactivadores en CYPs amb funcions fisiològiques poden portar a malalties serioses, mentre que mutacions en CYPs metabolitzadors de xenobòtics rarament produeixen patologies severes, malgrat poder afectar

el patró d' aclariment metabòlic de fàrmacs del individu en qüestió i la seva susceptibilitat a patir algunes malalties. [156].

TAULA X. Les famílies de CYP humans i llur principals funcions. Adaptat i modificat de Nelson, D., [160].

Família CYP	Composició	Funció principal
CYP1	3 SUBFAM, 3 G, 1 PG	Metabolisme de fàrmacs
CYP2	13 SUBFAM, 16 G, 16 PG	Metabolisme de fàrmacs i d'esteroides
CYP3	1 SUBFAM, 4 G, 2 PG	Metabolisme de fàrmacs
CYP4	5 SUBFAM, 11 G, 10 PG	Metabolisme de l'àcid araquidònic o d'àcids grassos
CYP5	1 SUBFAM, 1 G	Tromboxà A <sub>2</sub> sintasa
CYP7	2 SUBFAM, 2 G	CYP7A: Biosíntesi d'àcids biliars (7 $\alpha$ -hidroxilasa) CYP7B: 7 $\alpha$ -hidroxilasa específica de cervell
CYP8	2 SUBFAM, 2 G	CYP8A: Biosíntesi de prostaciclins (Prostaciclina sintasa) CYP8B: Biosíntesi d'àcids biliars
CYP11	2 SUBFAM, 3 G	Biosíntesi d'esteroides
CYP17	1 SUBFAM, 1 G	Biosíntesi d'esteroides (17 $\alpha$ -hidroxilasa)
CYP19	1 SUBFAM, 1 G	Biosíntesi d'esteroides (Aromatasa, dona lloc als estrògens)
CYP20	1 SUBFAM, 1 G	Funció desconeguda
CYP21	1 SUBFAM, 1 G, 1 P	Biosíntesi d'esteroides (21-hidroxilasa)
CYP24	1 SUBFAM, 1 G	Degradació de la vitamina D
CYP26	3 SUBFAM, 3 G	CYP26A: Àcid retinoic hidroxilasa CYP26B: Probable àcid retinoic hidroxilasa CYP26C: Probable àcid retinoic hidroxilasa
CYP27	3 SUBFAM, 1 G	CYP27A: Biosíntesi d'àcids biliars CYP27B: Vitamina D3 1 $\alpha$ -hidroxilasa CYP27C: Funció desconeguda
CYP39	1 únic membre	Funció desconeguda
CYP46	1 únic membre	Colesterol 24-hidroxilasa
CYP51	1 SUBFAM, 1 G, 3 P	Biosíntesi del colesterol (lanosterol 14 $\alpha$ -demetilasa)

SUBFAM: subfamílies; G: gens; PG: pseudogens.

### 4.3.3. Diferències entre humans i rosegadors

No tots els mamífers disposen del mateix conjunt d'enzims P450. Cadascun d'ells tendeix a mantenir les formes individuals altament específiques per la biosíntesi d'esteroides i d'àcids biliars, però no sempre posseeixen els mateixos P450 metabolitzadors de xenobiòtics. La subfamília 2D n'és un exemple interessant: en humans només existeix un únic citocrom P450 2D actiu (l'enzim CYP2D6), responsable de l'oxidació de varies drogues i fàrmacs; en rates, en canvi, existeixen 6 o 7 formes diferents d'enzims P450 CYP2D. Aquestes peculiaritats tenen rellevància alhora dels assaigs de toxicitat de drogues en animals, de manera que l'efecte d'una droga en rates o ratolins no té necessàriament que ser el mateix en humans, donada llur diferent dotació en CYPs responsables de la metabolització de fàrmacs [156].

En definitiva, en rates i ratolins es tendeix també a agrupar llur CYPs en famílies i subfamílies (a imatge i per semblança amb les humanes). Algunes d'elles contindran enzims clarament ortòlegs amb els seus equivalents humans (i amb funcions catalítiques equiparables), però també constaran de formes addicionals no presents en la nostra espècie. També cal destacar que poden existir diferències d'expressió d'una mateixa forma individual de P450 segons l'espècie, el teixit, l'edat i el sexe, de manera que l'extrapolació de dades entre espècies s'ha de realitzar amb precaució.

#### 4.4. Inducció dels P450 per esteroides i xenobiòtics

Una gran part dels citocroms P450 són els responsables de la fase I del metabolisme oxidatiu, encarregada de la detoxificació d'una gran varietat de substrats estructuralment diversos. Diàriament estem exposats a nombrosos contaminants ambientals en forma de molècules químiques estranyes a l'organisme (xenobiòtics) i a tota una sèrie de compostos naturals d'estructura diversa provinents de la dieta que poden ser potencialment tòxics per l'organisme, en cas d'acumulació. La majoria d'aquestes substàncies sovint són d'una natura lipofílica de forma que la seva eliminació pot ser difícil –podent-se acumular fins a nivells nocius– a no ser que siguin metabolitzades en productes derivats més hidrosolubles, d'excreció més favorable. Els citocroms P450 sovint catalitzen el passos inicials en aquests processos de detoxificació. En mamífers existeixen múltiples formes de citocroms P450; aquests enzims són notables en la seva capacitat d'intervenir en una ampla varietat de reaccions i substrats. Tot i que generalment transformen les molècules sobre les que actuen en derivats menys tòxics, en determinades circumstàncies poden bioactivar perniciosament els seus substrats en productes carcinogènics, citotòxics o amb activitat mutagènica. Evidentment, també participen en reaccions del metabolisme endogen, contribuint al metabolisme oxidatiu i biosintètic de nombroses hormones, àcids grassos i citocines [157].

Alguns gens de CYPs s'expressen constitutivament, mentre que d'altres són d'expressió induïble (particularment els implicats en el metabolisme de xenobiòtics). En molts casos, les substàncies responsables de l'inducció són alhora substrats dels mateixos enzims induïts, quina activitat es manté elevada només quan es necessita. Així doncs, la inducció enzimàtica dels CYPs, sovint duta a terme a nivell transcripcional, augmenta la detoxificació, esdevinguent un mecanisme protector sota moltes condicions [158].

A continuació s'exposen sumàriament alguns mecanismes de inducció de la transcripció dels citocroms P450, per part de xenobiòtics i de inductors endògens:

**HIDROCARBURS AROMÀTICS.** Els hidrocarburs policíclics aromàtics, com els procarcinògens *3-metilcolantrè* (3-ME), el *benzo(a)pirè*, o les dioxines, són inductors prototípics de varis P450s, molt notablement dels 1A1/1A2 i del 1B1. Aquesta inducció enzimàtica reflexa primàriament un increment en la transcripció dels gens, tot i que també poden existir fenòmens d'estabilització post-transcripcional. El mecanisme d'inducció sembla ser que aniria amb la intervenció del receptor d'hidrocarburs aromàtics *AhR*, un factor de transcripció activat per lligant de la família de les bHLH (*basic helix-loop-helix*), que caldria que heterodimeritzés amb la proteïna *Arnt* per tal d'actuar unint-se als elements de resposta adequats en el DNA [159].

**PROLIFERADORS PEROXISOMALS.** Els fàrmacs com el *clofibrat* provoquen proliferació peroxisomal sobretot en els fetges dels rosegadors, que bé acompanyat amb la inducció d'una sèrie de P450s. Aquesta inducció transcripcional vindria provocada per l'unió i activació d'aquestes drogues amb el receptors PPAR (*peroxisome proliferator activator protein*), membres de la família de receptors nuclears, que heterodimetzaria amb el receptor RXR (*retinoid X receptor*) interaccionant amb regions específiques reguladores dels gens necessaris per la generació de peroxisomes, entre ells alguns CYPs com el 4A1, que és una hidroxilasa d'àcids grassos [160].

**BARBITURATS.** L'activitat inductora d'enzims metabolitzadors d'esteroides i drogues per part del *phenobarbital* (PB) va ser una de les seminals observacions que van despertar l'interès de la comunitat científica pels citocroms P450 [157]. Aquesta inducció es produiria per la intervenció del receptor CAR (*constitutive androstane receptor*), també membre de la família de receptors nuclears que actuaria amb un mecanisme anàleg al del PPAR, en aquest cas unint-se en el DNA a elements de resposta al *phenobarbital* [161].

**ESTEROIDES.** Les hormones esteroidals com els andrògens o els glucocorticoides, poden induir directa o indirectament alguns membres hepàtics i renals dels CYP. En la majoria de casos la inducció seria transcripcional, amb l'intervenció del corresponent receptor nuclear esteroidal, però en d'altres no es descarten efectes post-transcripcionals [162-163].

Com es veu, tots aquests mecanismes d'inducció dels citocroms P450, permetent d'incrementar específicament la detoxificació dels organismes superiors, seguida d'una exposició prèvia a xenobiòtics. D'altra banda, si bé s'ha proposat doncs que els gens dels CYPs han evolucionat durant els "conflictes animal-planta" com un mecanisme mitjançant el qual els animals podien protegir-se metabòlicament dels polucionants ambientals i de la dieta [157], no està clar que aquests mecanismes reguladors s'hagin mantingut o hagin evolucionat a partir de vies reguladores ja presents a les cèl·lules per altres raons. En aquest sentit, la visió més actual es que la regulació gènica soferta pels CYPs també ha evolucionat com una fórmula per mantenir una homeostasi metabòlica en relació a substrats lipofílics endògens (e.g. esteroides, àcids grassos, etc.), que actuarien de lligants endògens regulant als CYPs [158].

#### 4.5. Els citocroms P450 renals

##### Aspectes generals de la capacitat metabòlica renal

El balanç entre l'activació metabòlica i la detoxificació de drogues i altres compostos químics per part de les formes individuals de citocrom P450 en diferents espècies o teixits és un factor important alhora d'explicar la toxicitat específica en un determinat òrgan o en una espècie donada. Els CYPs també duen a terme tasques "fisiològiques" òrgan-específiques com per exemple, en la síntesi dels esteroides adrenals i els testiculars o en la generació de tromboxans per part dels P450 plaquetaris.

Els citocroms P450 renals, apart de certs xenobiòtics que n'induirien alguna forma renal, catalitzen eficientment la hidroxilació de prostaglandines i d'àcids grassos com l'àcid lauric, metabolitzant mínimament esteroides com la testosterona o substàncies com la *aminopirina* i la *7-etoxicumarina*, clarament acceptats pel sistema de monoxigenases hepàtiques [164]. Menció apart mereix la capacitat

dels CYPs renals per convertir l'àcid araquidònic en  $\omega$ -hidroxiaraquidonats (o en  $\omega-1$ ) i en epoxieicosatrienoats (via epoxigenació), contribuint de manera significativa en l'important funció renal moduladora desenvolupada pels derivats de l'àcid araquidònic i per les prostaglandines.

Durant molt de temps s'havia reconegut que en el ronyó, les dos vies de metabolització de l'àcid araquidònic eren les que depenien de l'enzim *ciclooxigenasa* i de la *lipoxigenasa*, per a donar lloc respectivament a les prostaglandines, prostaciclins, tromboxans i als leucotriens (*veure figura 22*), tots ells productes amb una gran influència en la funció tubular i vascular renal. Una tercera via, però, esta últimament prenent força com a principal ruta de metabolització de l'àcid araquidònic, sobretot a còrtex renal, i és la catalitzada pel sistema dels citocroms P450 que produirà derivats hidroxilats

**FIG 22. Esquema de les vies metabòliques de l'àcid araquidònic (AA).** HPETE: àcid hidroxiperòxieicosatrienoic; EET: àcid epoxieicosatrienoic; HETE: àcid hidroxieicosatetraenoic

com el 20-HETE (àcid 20-hidroxieicosatrienoic) o els EETs (àcids epoxieicosatrienoics)(Fig. 22), que jugarien un paper fonamental com a segons missatgers, en la regulació del to vascular renal, el *feedback*

tubuloglomerular i la reabsorció tubular de sodi, arribant a eclipsar fins i tot el rol dels productes generats en les dos vies anteriors citades, [165].

Donada la importància del metabòlits del àcid araquidònic produïts pels citocroms P450 en el control de la funció renal, és molt probable que canvis en aquest sistema contribueixin al desenvolupament d'anormalitats en la funció del ronyó tals com la hipertensió, la diabetis o el síndrome hepatorenal.

### Expressió de CYPs a ronyó de ratolí

Tradicionalment la detecció de formes individuals de citocroms P450 en un teixit (sobretot a fetge) s'ha dut a terme mitjançant mètodes convencionals, com la purificació de proteïnes a partir de la fracció microsomal, quantificació espectroscòpica, estudis d'activitat catalítica i per *western-blot*. En teixits on l'abundància de CYPs és limitada en comparació amb la dels nivells hepàtics, l'estudi de l'expressió a nivell de mRNA mitjançant *northern-blot* o amb tècniques més sensibles com la RT-PCR ha permès la detecció

**TAULA XI. Abundància de citocroms P450 en diferents llibreries renals de ratolí.** S'han ordenat de major a menor presència (informació extreta de les bases de dades de ESTs del NCBI, a 1 d'octubre 2002 / revisat febrer '03)

<b>Llibreria</b>	<b>NCI_CGAP_Kid1</b>	<b>15.873 clons seqüenciats</b>	
<i>dbEST Library ID# 7268</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=7268">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=7268</a>		
<b>gen</b>	<b>hits</b>	<b>% d'abundància</b>	
<i>Cyp4b1</i> <sup>†</sup>	191	1,2	
<i>Cyp2e1</i>	58	0,37	
<i>Cyp2j5</i>	26	0,17	
<i>Cyp4a12</i>	25	0,16	
<i>Cyp2a4</i>	17	0,11	
<i>Cyp4a10</i>	7	0,04	
<i>Cyp2d9</i>	5	0,03	
<b>Llibreria</b>	<b>RIKEN <i>full-length enriched, adult male kidney</i></b>	<b>15.573 clons seqüenciats</b>	
<i>dbEST Library ID# 7215</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&amp;LID=7215">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&amp;LID=7215</a>		
<b>gen</b>	<b>hits</b>	<b>% d'abundància</b>	
<i>Cyp4b1</i> <sup>†</sup>	160	1,03	
<i>Cyp2j5</i>	39	0,25	
<i>Cyp2e1</i>	20	0,13	
<i>Cyp2d9</i>	16	0,10	
<i>Cyp2a4</i>	13	0,08	
<i>Cyp4a12</i>	8	0,05	
<i>Cyp4a14</i>	8	0,05	
<b>Llibreria</b>	<b><i>Mus musculus</i> C57BL/6J kidney</b>	<b>4.559 clons seqüenciats</b>	
<i>dbEST Library ID# 1764</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=1764">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=1764</a>		
<b>gen</b>	<b>hits</b>	<b>% d'abundància</b>	
<i>Cyp4b1</i>	6	0,13	
<i>Cyp4a10</i>	4	0,09	
<i>Cyp4f13</i>	2	0,04	
<i>Cyp3d9</i>	1	0,02	
<b>Llibreria</b>	<b>Sugano <i>mouse kidney</i> mkia</b>	<b>22.150 clons seqüenciats</b>	
<i>dbEST Library ID# 1300</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=1300">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?all=yes&amp;ORG=Mm&amp;LID=1300</a>		
<b>gen</b>	<b>hits</b>	<b>% d'abundància</b>	
<i>Cyp2j5</i>	72	0,33	
<i>Cyp2e1</i>	27	0,12	
<i>Cyp4a14</i>	20	0,09	
<i>Cyp4a10</i>	17	0,08	
<i>Cyp4b1</i>	9	0,04	
<i>Cyp2d9</i>	5	0,02	

<sup>†</sup>Altament representat en aquesta llibreria; *hit*, nº de vegades que ha aparegut.

de quantitats ínfimes de missatge en mostres de teixit. Cal remarcar, però, que encara que la detecció de mRNA no implica automàticament la presència de la proteïna corresponent és un bon indicador de



l'existència de proteïnes funcionals en el teixit.

Entre els CYPs expressats a ronyó murí trobem al *Cyp4b1* (altament expressat) i a d'altres membres de la família Cyp4a com el *Cypa12*, el *Cypa14* i el *Cypa10*, tots ells actius en l'hidroxilació  $\omega$ -terminal de l'àcid araquidònic per donar lloc a 20-HETE; altres exemples inclouen al *Cyp2e1* –amb activitat sobre xenobiòtics com el *paracetamol*, que indueix la seva expressió a fetge, al igual que l'etanol–, i que com el *Cyp4b1* es troba regulat positivament a ronyó pels andrògens, el *Cyp2j5*, que és una epoxigenasa del àcid araquidònic (dona lloc a diferents EETs) expresada primàriament a ronyó, o membres de la família Cyp2, com el *Cyp2a4* (*esteroide 15 $\alpha$ -hidroxilasa*) i el *Cyp2d9* (*testosterona 16 $\alpha$ -hidroxilasa*). (veure taula XI)

Malgrat que la majoria d'estudis sobre citocroms P450 –tan en humans com en rosegadors– s'han centrat en les formes hepàtiques, la informació disponible sobre els CYPs en teixits extrahepàtics entre ells el ronyó (que apareix com els següent teixit\* en importància en contingut de P450s després del fetge) és molt menor.

\*Contingut de P450 en microsomes renals: ~20-25% dels nivells a fetge (Ma, J *et al.* [166])

#### 4.6 La família CYP4 de mamífers

La família gènica CYP4 inclou nombrosos representants distribuïts pels regnes dels vertebrats i dels invertebrats [167], que filogenètica i funcionalment estan relacionats amb les hidroxilases d'àcids grassos procariontics. En els mamífers, la família CYP4 està constituïda per tres subfamílies: la 4A, la 4B i la 4C [168, 169]. A nivell estructural, una característica peculiar d'aquesta família respecte les altres, seria la de que en les proteïnes CYP4 de mamífers l'enzim tindria unit covalentment el grup prostètic hemo al centre actiu, a diferència de la resta de CYPs que el mantenen associat mitjançant interaccions no covalents [170]. A continuació s'exposen algunes característiques de cada subfamília particular,

- **CYP4A.** La subfamília CYP4A va ser inicialment descoberta com enzims amb activitat  $\omega$ -hidroxilasa d'àcids grassos, induïts per proliferadors peroxisomals [171]. Es coneixen varis membres d'aquesta subfamília tan en humans com en rosegadors, considerant-se de que fonamentalment duen a terme una tasca important en el metabolisme d'àcids grassos i eicosanoides, i participant en l'homeostasi dels lípids.

- **CYP4B.** La subfamília CYP4B consta, fins a la data, d'un únic representant individual que s'ha designat com a CYP4B1, tan en humans com en conills, rates i ratolins (en majúscula o minúscula segons l'espècie):

*CYP4B1.* Les primeres espècies a on es va identificar aquest citocrom van ser en conills i en rata, d'on es va clonar i seqüenciar el cDNA corresponent; posteriorment els corresponents ortòlegs de d'humans i de ratolí s'han incorporat a la família [172-174, 139]. Malgrat que aquestes proteïnes CYP4B1 de diferents espècies comparteixen unes homologies relativament altes (d'entre el 84-90%), cal dir que existeixen diferències significants interespècie en quan a especificitat de substrat, particularment l'isoforma humana, així com en llurs nivells d'expressió i d'inducció que segueixen un patró específic d'espècie i de teixit [172].

A nivell funcional, els enzims corresponents d'aquestes espècies estarien implicats majoritàriament en el metabolisme de xenobiòtics i l'activació mutagènica de certes substàncies procarcinogèniques (veure figura XXIII). Entre els diferents substrats sobre els quals s'ha demostrat activitat del CYP4B1, trobem amines aromàtiques com la *benzidina*, la *2-naftilamina*, el *2-aminofluorè* o el *3-metoxi-4-aminoazobenzè* (un potent carcinògen hepàtic en rates), derivats del furà com el *4-ipomeanol* (droga utilitzada contra el

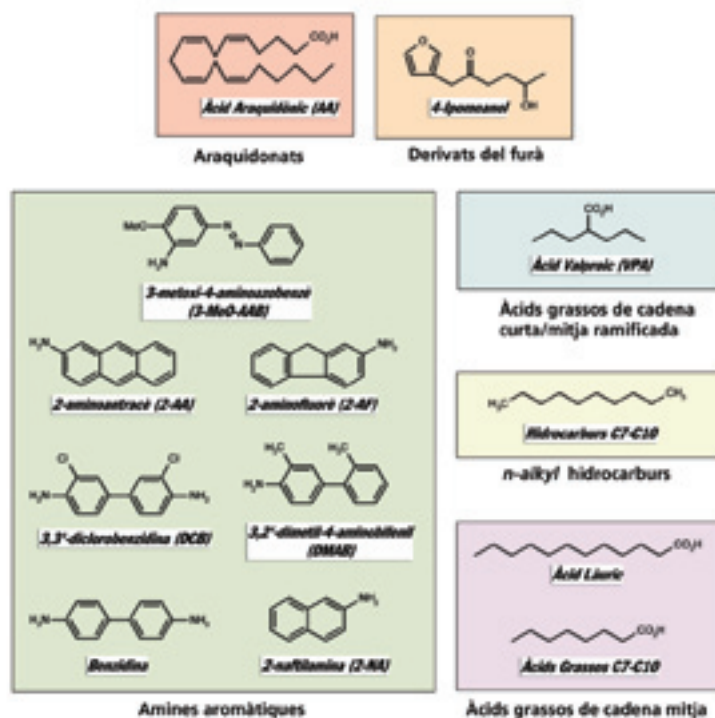


FIG. 23. Substrats dels enzims CYP4B1. Estructura química d'alguns substrats representatius sobre els que actuen els Citocroms P450 4B1 de diferents espècies.

càncer de pulmó), hidrocarburs lineals de C7-C10 i àcids grassos de cadena mitjana com l'àcid lauric, de cadena ramificada com el àcid valproic (utilitzat com a anticonvulsiant), o poliinsaturats com l'àcid araquidònic.

Catalíticament i mecanística, sobre els seus substrats *n*-alquílics i àcids grassos actuarien com a  $\omega$ -hidroxilases, mentre que sobre les amines aromàtiques com a *N*-hidroxilases; pel que respecta a l'araquidonat, evidències indirectes insinuen que podria metabolitzar-lo per donar lloc a 12(R)-HETE [175].

- *CYP4F*. Finalment, la subfamília CYP4F ha estat descrita com a  $\omega$ -hidroxilases d'eicosanoides –com el leucotriè B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), un potent mediador de la inflamació [176].

#### 4.6.1. Els CYP4B1 individuals

##### *CYP4B1* de conill

Va ser identificat inicialment l'any 1977 a partir de microsomes pulmonars de conill, anomenant-lo com a *P450 isozyme 5* [177, 178], sent objecte en els anys subseqüents d'un estudi i caracterització extensius. En els pulmons de conill, aquest citocrom representa el 50% del total d'activitats P450 microsomals pulmonars, trobant-se expressat també a fetge i a la còrnia ocular.

El tractament de l'animal amb *paracetamol* incrementaria la seva expressió a nivell hepàtic, mentre que en l'epiteli corneal s'induiria sota les situacions de hipòxia.

##### *CYP4B1* de rata

En la rata, el CYP4B1 s'expressa constitutivament a pulmó i, a diferència del conill, no es detecta a fetge –amb independència del tractament. També s'expressa a ronyó, intestí i a la mucosa de la bufeta urinària, on sembla ser que podria estar implicat en la activació mutagènica de certs carcinògens [179]. Estudis dels mateixos autors han demostrat que les rates mascle contenen nivells superiors de CYP4B1 a

la bufeta que les rates femella, possiblement degut a que pateix una regulació androgènica en aquest teixit i, donada la seva potencial activitat sobre procarcinògens com la 3,3'-diclorbenzidina (DCB), el CYP4B1 podria estar contribuïnt a la carcinogènesi de bufeta, a tenor de la major incidència observada en mascles que en femelles [180].

*CYP4B1 humà*

La isoforma humana s'ha obtingut a partir de diferents fonts, entre elles pulmó i placenta. A més s'ha trobat expressat a pulmó, ronyó i bufeta, encara que no s'ha lograt detectar a fetge. El seu missatger s'ha trobat addicionalment a còlon i a la mucosa de l'esòfag [181-182]. A nivell funcional, al igual que les formes de conill i de rosegadors, mostraria preferència per xenobiòtics com el 2-aminofluore, mentre que els resultats previs que suggerien una activitat *6β-hidroxilasa* sobre la testosterona, han resultat ser erronis degut a una contaminació de les mostres amb CYP3A5 [183].

*Cyp4b1 de ratolí*

El cDNA del citocrom P450 4b1 murí va ser clonat l'any 95 per Imaoka S. i col·laboradors, que van purificar la corresponent proteïna a partir de microsomes renals de ratolí mascle. Aquests microsomes presentaven, en relació als de les femelles, unes elevades activitats mutagèniques del procarcinogen 3-metoxi-4-aminoazobenzè [139]. El Cyp4b1 es troba també present als microsomes pulmonars tan de mascles com de femelles. En la bufeta murina s'ha detectat activitat mutagènica sobre la DCB, que en rates és específicament activada pel CYP4B1 [184]. Al igual que la resta de formes animals de CYP4B1, estaria majoritàriament implicat en la bioactivació de diferents xenobiòtics i procarcinògens estructuralment diferents, però també estaria intervenint en el metabolisme endogen de determinats àcids grassos i d'araquidonat [185], tot i que encara queda per definir amb claredat el seu rol especialment a ronyó de ratolí, on seria un dels P450 més expressats en el mascle. (veure *taula XI*, pàg 65)

## 5. ELS POLIPÈPTIDS TRANSPORTADORS D'ANIONS ORGÀNICS (OATP)



## 5.1 Descripció, nomenclatura i característiques generals

Els polipèptids transportadors d'anions orgànics, OATP's (*organic anion transporting polypeptide*) constitueixen una creixent superfamília de proteïnes integrals de membrana, amb funció de transportadors poliespecífics de substrats aniònics amfipàtics. Presenta múltiples isoformes identificades fins la data (actualment consisteix en més de 15 membres clonats en humans/rata/ratolí), i que s'expressen en un gran nombre de teixits a nombroses espècies de mamífers. A nivell filogenètic s'han localitzat homòlegs llunyans a peixos condirectis [186], *C. elegans* i a *Drosophila*, de manera que es tractaria d'una família de proteïnes bastant conservades però que difereixen notablement en llur especificitats de substrat i distribucions tissulars.

La majoria d'OATP/Oatp's representen glicoproteïnes amb un pes molecular aparent d'entre 80 i 90 kDa. A nivell estructural, s'assumeix que s'organitzarien topològicament en 12 segments transmembrana, amb els extrems *N*- i *C-terminal* situats intracel·lularment. Una característica comuna als OATPs/Oatp's, en funció de la disposició topològica esmentada, és l'existència d'un gran llaç extracel·lular entre els dominis transmembrana IX i X; en aquest *loop* es trobarien situades varies cisteïnes molt conservades en tots els membres de la família, que per homologia conformarien un motiu estructural que s'identifica amb un domini de tipus *kazal*, [187]. Es desconeix la finalitat de la presència en els OATPs d'aquest domini propi dels inhibidors de les serin proteases. Alguns OATPs localitzats a la membrana apical de les cèl·lules tubulars renals, com l'Oatp1 i l'Oat-K1 de rata, presenten el motiu T/S-X-V/I/L en llurs extrems carboxy-terminals. Aquests segments terminals identificats corresponen a la seqüència consens dels dominis d'interacció amb proteïnes PDZ [188], els quals s'ha suggerit que intervindrien en la localització i direccionament subcel·lular de proteïnes de membrana.

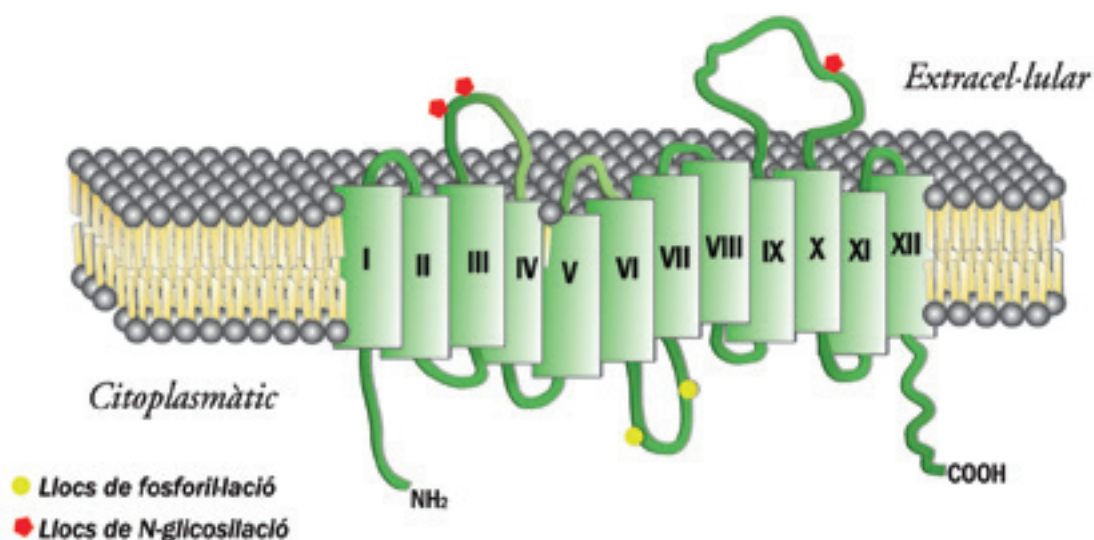


FIG 24. Representació esquemàtica de la topologia de membrana dels membres de la família dels Oatps. S'indica la situació aproximada dels diversos llocs putatius de fosforil·lació i de N-glicosil·lació, així com els dotze dominis transmembrana predits amb la majoria d'algoritmes

A nivell funcional, els oatp's medien el transport facilitat independent de Na<sup>+</sup> d'una àmplia diversitat de compostos orgànics amfipàtics, sovint amb especificitats de substrat solapades. Entre aquesta varietat de substrats (*figura 25*) s'inclouen anions orgànics (*e.g.* sals biliars, conjugats esteroïdals, prostaglandines, bilirrubina, hormones tiroïdals, oligopèptids lineals i cíclics i nombroses altres drogues i fàrmacs), esteroides no carregats (*e.g.* glicòsids cardíacs com la *digoxina* i la *ouabaina*) i fins i tot alguns cations orgànics lipofílics (*e.g.* *N-metilquinina*, *roucuronium*) [189].

A nivell de nomenclatura, han estat classificats momentàniament pel *Human Gene Nomenclature Committee*<sup>1</sup> dins la superfamília gènica de transportadors de soluts (SLC) com a "SLC21A". Donada la semblança del transportador de prostaglandines (PGT/Pgt) amb els transportadors d'anions orgànics, a vegades també s'ha anomenat al conjunt com a superfamília OATP/PGT, amb la pressuposició –equivocada– de que es podia tractar de dos famílies diferents. En realitat, basant-nos en criteris d'homologia aminoacídica, totes dos branques pertanyerien a la superfamília SLC21, que de fet inclou totes aquelles proteïnes amb suficients semblances estructurals i d'homologia, i a la vista de les diferents propietats funcionals exhibides per cada membre, és preferible classificar-les i agrupar-les en una únic gran grup (*i.e.* SLC21) no tant per les propietats funcionals individuals de cada representant.

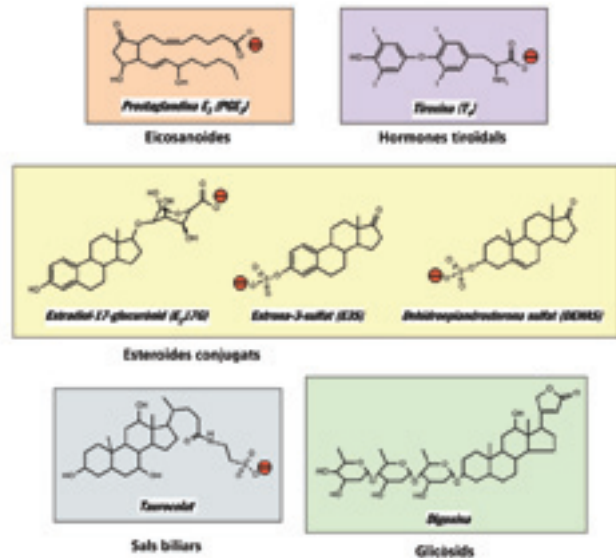


FIG 25. Estructura d'alguns substrats seleccionats de la família dels OATP/Oatp. Es mostra l'estructura química de varis anions orgànics i neurtes representatius, indicant-se la família de compostos a la qual pertanyen

Tradicionalment aquests gens s'han anat anomenant alfabèticament amb lletres o números consecutius –segons es tractés de membres de humans o de rosegadors, respectivament– segons s'anaven clonant els respectius cDNAs. Per evitar ambigüitats en la designació dels diferents membres en varies espècies, s'ha proposat anar abandonant progressivament la designació tradicional (però no en tots els casos). Així doncs, s'ha introduït una nova nomenclatura: *SLC21Ax* / *Slc21ax* ( $x \equiv n^{\circ}$ ), pels gens humans –majúscula– o per rosegadors, respectivament.

En les pàgines següents s'ofereix un alineament entre un nombrós grup de Oatps de diferents espècies (*figura 26*) i un llistat tabulat dels membres de la superfamília amb les seves característiques més rellevants així com de les seves propietats funcionals (*taules XII i XIII*).

<sup>1</sup> (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenklature>).

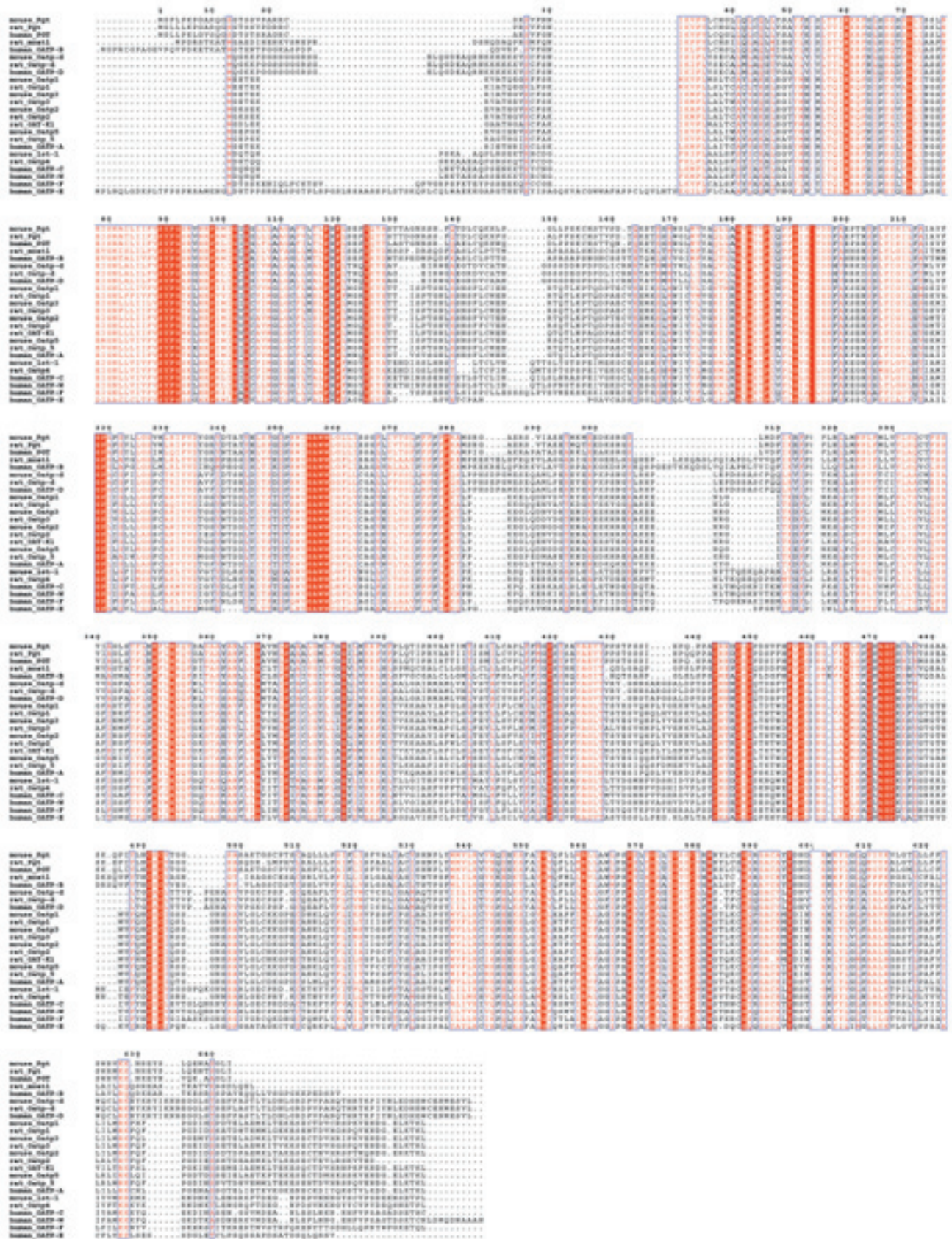


FIG 26. Alineament múltiple entre els membres de la família dels Oatp. L'alineament inclou representants d'humans i rosegadors. En blanc sobre fons vermell es destaca els residus conservats entre la totalitat de proteïnes i enquadrats en blau (amb lletres en vermell) els de conservació moderada. L'alineament s'ha realitzat amb el programa *ClustalW*.

TAULA XII. Descripció i característiques moleculars dels diferents Oatp's.

Espècie	Gen	Sinònims	Símbol gènic	Localització cromosòmica	Clonat inicialment a partir de	Any clonatge	Proteïna (aa)	M <sub>r</sub> deduída (kDa)	Referència
HUMANS	OATP-A	OATP	SLC21A3	12p12	fetge	1995	670	74	[226]
	OATP-B		SLC21A9	11q14	cervell	2000	709	76,7	[231]
	OATP-C	LST-1, OATP2	SLC21A6	12p12	fetge	1999	691	76,5	[215]
	OATP-D	(OATPRP3)	SLC21A11	15q26	ronyó	2000	710	76,9	[231]
	OATP-E	(OATPRP1)	SLC21A12	20q13	ronyó	2000	722	77,2	[239]
	OATP-F	(OATPRP5)	SLC21A14	12p13	cervell	2002	712	78,7	[234]
	OATP8		SLC21A8	12p12	fetge	2000	702	77,4	[235]
	PGT		SLC21A2	3q21	ronyó	1996	643	70,1	[226]
	OATPRP4	(OATP-1)	SLC21A15	8		2000 <sup>db</sup>	848	91,8	
	RATA	Oatp 1	Oatp	Slc21a1		fetge	1994	670	74,1
Oatp 2			Slc21a5		cervell	1997	661	73,2	[201]
Oatp 3			Slc21a7		retina	1998	670	74,6	[205]
OAT-K1			Slc21a4		ronyó	1996	669	73,9	[220]
OAT-K2 <sup>†</sup>					ronyó	1999	498	55,2	[222]
Oatp 4		rlst-1	Slc21a10		fetge	1999	687	76,7	[216, 217]
Oatp 5			Slc21a13		ronyó	2000 <sup>db</sup>	670	74,4	
Pgt		(matrin F/G)	Slc21a2		fetge	1995	643	70,5	[197]
Oatp 9		moat1	Slc21a9		cervell	1999	682	74,2	[224]
Pgt2		Oatp-d	Slc21a11	8 <sup>†</sup>		2000 <sup>db</sup>	710	76,8	
Oatp-E			Slc21a12		retina	2001	723	77,6	[211]
BSAT-1		'Oatp-f'	Slc21a14			2001	716	78,6	[225]

TAULA XII. (Continuació)

Espècie	Gen	Sinònims	Símbol gènic	Localització cromosòmica	Clonat inicialment a partir de	Any clonatge	Proteïna (aa)	M <sub>r</sub> deduïda (kDa)	Referència
	<i>Oatp 1</i>		<i>Slc21a1</i>	6	fetge	2000	670	74,4	[240]
	<i>Oatp 2</i>		<i>Slc21a5</i>	6 G1-G3	fetge	2002	670	73,9	[242]
	<i>Oatp 3</i>		<i>Slc21a7</i>	6	cervell	2000	670	74,7	[209]
	<i>Oatp 4</i>	1st-1	<i>Slc21a10</i>		fetge	2000	689	76,7	[209]
	<i>Oatp 14</i>	Oatp- <sup>†</sup> r <sup>†</sup> , (Oatp2)	<i>Slc21a14</i>	6 G1	còclea	2000 <sup>db</sup>	715	78,3	
	<i>Oatp 5</i>		<i>Slc21a13</i>	6	ronyó	2001	670	74,1	[219]
	<i>Oatp d</i>	MJAM	<i>Slc21a11</i>	7	ronyó	2000 <sup>db</sup>	710	76,9	
	<i>Pgt</i>	mPGT	<i>Slc21a2</i>	9	pulmó	1999	643	70,1	[241]
	<i>Oatp-e</i>	Oatp12	<i>Slc21a12</i>		retina	2002 <sup>db</sup>	723	77,6	

<sup>db</sup> Informació i seqüència només present a les bases de dades; <sup>†</sup> Representa una variant per *splicing* alternatiu del mateix gen OAT-K1; <sup>‡</sup> Aquest treball.

TAULA XIII. Expressió i propietats funcionals dels diferents Oatp's.

Espècie	Nom	Expressió**	Localització	Substrats (K <sub>m</sub> )	Referències
HUMANS	OATP-A ( <i>SLC21A3</i> )	CERVELL, FETGE, RONYÓ, PULMÓ i TESTICLE	En el cervell, en les cèl·lules capil·lars endotelials de la <i>Blood-Brain Barrier</i>	Taurocolat (60 μM); BSP (20 μM); E3S (59 μM); DHEAS (7 μM); Ouabaina (5500 μM); N-metilquinina (5 μM); E3S (6 μM); BSP (0,7 μM); DHEAS	[215, 229, 236, 232, 261]
	OATP-B ( <i>SLC21A9</i> )	Àmplia distribució (principalment a FETGE)			[231, 232]
	OATP-C ( <i>SLC21A6</i> )	FETGE (exclusivament)	Membrana basolateral dels hepatòcits	Colat (11 μM); Glicocolat; DHEAS (22 μM); E3S (13 μM); T <sub>3</sub> (3 μM); LTC <sub>4</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; Pravastatina (14-35 μM); DPDPPE; monoglucuronosil bilirrubina (100 nM); E3S; PGE <sub>2</sub> ; benzilpenicil·lina;	[231, 232, 228, 262, 215, 263, 229]
	OATP-D ( <i>SLC21A11</i> )	UBIQUA		E3S; PGE <sub>2</sub> ; benzilpenicil·lina;	[231]
	OATP-E ( <i>SLC21A12</i> )	UBIQUA		Taurocolat (15 μM); T <sub>3</sub> (1 μM); E3S; T <sub>4</sub> ; Prostaglandina E <sub>2</sub>	[231, 211]
	OATP-F ( <i>SLC21A14</i> )	CERVELL i TESTICLE		T <sub>4</sub> (90 nM); rT <sub>3</sub> (130 nM); E <sub>2</sub> 17G; E3S	[239]
	OATP8 ( <i>SLC21A8</i> )	FETGE (exclusivament)		Taurocolat (6 μM); E <sub>2</sub> 17G (5 μM); T <sub>3</sub> (6 μM); LTC <sub>4</sub> ; CCK-8 (11 μM); Digoxina; Metotrexat (25 μM); Rifampicina (2 μM); Monoglucuronosil bilirrubina (500 μM)	[232, 262-264]
	PGT		Àmplia distribució	Prostaglandina E <sub>2</sub> ; Prostaglandina D <sub>2</sub> ; Tromboxà E <sub>2</sub>	[235]



TAULA XIII. (Continuació)

Espècie	Nom	Expressió**	Localització	Substrats (K <sub>m</sub> )	Referències
RATA	Oatp 1	(Slc21a1)	Hepatòcits, BLM Túbul proximal S3, Apical Epiteli del plexe coroïdal, Apical	Colat (54 μM); Taurocolat (19-50 μM); Aldosterona (15 nM); DHEAS (5 μM); T <sub>3</sub> ; T <sub>4</sub> ; LTC <sub>4</sub> (270 nM); Deltorfina II (137 μM); Enalapril (214 μM); gadoxetat (3,3 mM); N-Metilquinidina	[190, 268, 269, 261, 265, 266, 227]
	Oatp 2	(Slc21a5)	Hepatòcits, BLM Epiteli del plexe coroïdal, BLM	Colat (46 μM); E17G (3 μM); T <sub>3</sub> (6 μM); T <sub>4</sub> (7 μM); Digoxina (240 nM); DPDPE (19 μM); Pravastatina.	[208, 261, 227]
	Oatp 3	(Slc21a7)	BUDELL PRIM, ULL	Glicocolat (40 μM); Taurodeoxicolat (6 μM); DHEAS (162 μM); T <sub>3</sub> (7 μM); T <sub>4</sub> (5 μM); PGE <sub>2</sub> (35 μM); BSP (8 μM).	[205, 209, 201, 213]
	OAT-K1	(Slc21a4)	RONYÓ	Metotrexate (1-2 μM); Taurocolat (10-31 μM); <i>Ochratoxin A</i> (6-17 μM); PGE <sub>2</sub> ; folat.	[220-223, 267]
	Oatp 4	(Slc21a10)	FETGE	Taurocolat (27 μM); DHEAS (5 μM); LTC <sub>4</sub> (7 μM); BSP (1 μM); PGE <sub>2</sub> (13 μM);	[213, 264]
	Oatp 5	(Slc21a13)	RONYÓ		
	Oatp 9	(Slc21a12)	FETGE, PULMÓ, COR, RONYÓ CERVELL, RETINA,	PGD <sub>2</sub> (35 nM); LTC <sub>4</sub> (3,2 μM); Taurocolat (17,6 μM); PGE <sub>1</sub> ; Tromboxà A <sub>2</sub>	[224]
	Pgt	(Slc21a2)	UBIQUA	Tromboxà B <sub>2</sub> (423 nM); PGE <sub>1</sub> (70 nM); PGE <sub>2</sub> (94 nM); PGD <sub>2</sub>	[235, 197]
	Oatp 1	(Slc21a1)		Taurocolat (12 μM); E3S (5 μM); BSP; Gadoxetat; Ouabaina.	[240]
	Oatp 2	(Slc21a5)		Digoxina (5,7 μM); E3S; DHEAS; BQ-123	[243]
lst-1	(Slc21a10)	EXCLUSIU FETGE		[244]	
Oatp 5	(Slc21a13)	RONYÓ		[245]	
Oatp-d	(Slc21a11)	UBIQU			
Pgt	(Slc21a2)	PULMÓ, FETGE, RONYÓ, (MÚSCUL ESQUELÈTIC)	PGE <sub>2</sub>	[241]	

\*Es mencionen només les dades referents als Oatps dels quals es disposa de major informació; \*\*Principals teixits on s'ha demostrat expressió (no és exhaustiu).

## 5.2. Membres individuals en humans i rosegadors

A continuació s'exposa una descripció més o menys bibliogràfica dels membres de la superfamília dels OATPs identificats fins ara en humans, ratolins i rates.

### 5.1.1. Els Oatp's de rata

**Oatp1** Es tracta del primer membre identificat de la família de transportadors d'anions orgànics OATP/PGT. Durant els intents de caracteritzar els sistemes moleculars responsables de la captació hepàtica (independent de sodi) d'àcids biliars, Jacquemin *et al.* van aconseguir aïllar a partir de fetge de rata –per expressió funcional en base al transport de bromosulfaleïna (BSP)–, un nou transportador al que anomenaren *organic anion transporting polypeptide 1*, *Oatp1 (Slc21a1)* [190]. En els successius anys ha esdevingut un dels membres millor estudiats i coneguts de la família de la qual és fundador i que no ha parat d'augmentar amb nous gens clonats tan en humans com en rosegadors.

L'Oatp1 consisteix en una proteïna de 670 aminoàcids que representen una glicoproteïna amb 12 dominis transmembrana predits. El seu pes molecular aparent natiu és d'uns 80 *kDa* en vesícules hepàtiques de rata, però s'ha descrit una forma de pes menor en les membranes renals [191]. S'expressa majoritàriament a fetge, ronyó i cervell, localitzant-se selectivment a la membrana basolateral dels hepatòcits, la membrana apical de les cèl·lules S<sub>3</sub> del túbul proximal, i a les cèl·lules epitelials del plexe coroïdal [191, 192].

A nivell funcional transporta una gran varietat estructural de substrats, com sals biliars, conjugats d'hormones esteroidals, BSP, leucotrié C<sub>4</sub>, múltiples fàrmacs, drogues i toxines com pravastatina, ouabaïna, enalapril, pèptids sintètics, inclòs algun substrat catiònic (*veure taula XIII*). S'ha suggerit com a possible mecanisme de transport que Oatp1 podria estar actuant com a bescanviador, acceptant glutatió com a contraió fisiològic [193].

La seva expressió a ronyó presenta un elevat dimorfisme sexual, trobant-se llur missatge molt més abundant en mascles que en femelles [194, 195]. Aquesta característica unida a l'alta afinitat que presenta per l'estradiol-17-glucuronid, havia fet que es postulés inicialment que podria estar actuant en el control del balanç d'hormones androgèniques/estrogèniques en el mascle, mitjançant la secreció preferencial de les segones. Resultats recents posen en dubte aquesta hipòtesi, ja que s'ha vist que en realitat la seva expressió renal al domini apical tubular podria estar –contràriament– mitjançant la reabsorció d'aquests conjugats esteroidals [196].

**Pgt** Un any després de la identificació pionera de Oatp1, Kanai, N. *et al.* ampliaren la família amb el transportador de prostaglandines, *Pgt (Slc21a2)* [197]. Conegut originàriament com a *Matrin F/G*, es tractava d'un cDNA de rata que havia estat clonat anys enrere a partir d'una llibreria d'expressió hepàtica, i que es creia que correspondria a una proteïna de matriu nuclear, àdhuc no haver pogut ser demostrat [198]. Amb una homologia moderada del 37% (*aa*) amb l'Oatp1 de rata, la re-examinació de la seqüència de l'esmentada Matrín F/G va permetre definir un nou ORF el perfil d'hidropatia de la qual s'ajustava millor a una proteïna transmembrana que no pas a una hipotètica proteïna nuclear [198]. A la llum d'aquesta nova possibilitat el grup de Schuster V.L. i col·laboradors demostraren finalment que en realitat, aquell cDNA codificava per un transportador que era capaç de mediar el transport saturable i extremadament ràpid de PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>) i que clarament corresponia a un transportador de prostaglandines, passant-se a anomenar conseqüentment *Pgt* [197]. Es tractava de la descripció d'una

de les primeres entitats moleculars clonada, responsable de transportar prostanoides [199], podent-se considerar també (donada llurs relacions estructurals i funcionals) com a membre de la família de transportadors d'anions orgànics *oatp*, o més pròpiament *OATP/PGT*.

Recentment s'han generat anticossos específics contra un putatiu *loop* extracel·lular de la proteïna, que ha permès de localitzar-la dins el ronyó de rata en les cèl·lules endotelials glomerulars, mesangials i arteriolars, en les cèl·lules intersticials medul·lars i a tub col·lector, mentre que el túbul proximal en canvi, mostra una tinció negativa; Les plaquetes de rata també expressen abundant Pgt [200].

**Oatp2** El segon membre en ser identificat de la família *Oatp* en rates, sense considerar al transportador de prostaglandines, va ser l'*Oatp2* (*Slc21a5*), clonat a partir d'una llibreria de cDNA de cervell total [201]. Conegut també com a transportador cerebral de digoxina, donada la seva excepcional elevada afinitat pel glucòsid cardíac *digoxina* ( $K_m \sim 0,25 \mu\text{M}$ ). Està compostat de 661 aminoàcids i presenta una identitat del 77% (*aa*) amb *Oatp1* [201]. En el cervell la trobem a les cèl·lules epitelials del plexe coroidal (en el pol basolateral) i a les cèl·lules endotelials capil·lars que conformen la barrera hematoencefàlica [202, 203]. Dins el teixit hepàtic, s'expressaria a la membrana basolateral (canalicular) dels hepatòcits. A part de fetge i cervell, també s'ha detectat la seva expressió a retina, on sembla ser que es concentraria principalment a la capa de fibres del nervi òptic [204]. Respecte a l'expressió d'*Oatp2* a ronyó, informada inicialment a nivell de mRNA [201], existeixen dades contradictòries sobre la seva possible presència en el teixit [205].

L'especificitat de substrat d'*Oatp2* en general es solapa força amb la d'*Oatp1*, potser mostrant una eficiència menor pel transport d'anions a favor de molècules orgàniques no carregades. Accepta sals biliars (taurocolat, colat), esteroides (DHEAS, E17 $\beta$ G), drogues antihiperlipidèmiques com la pravastatina [206-208], o la ja esmentada, digoxina. Pel contrari, no transporta els típics substrats carregats d'*Oatp1*, BSP o el leucotrié C4.

**Oatp3** El cDNA de *Oatp3* (*Slc21a7*) va ser clonat independentment per dos grups, a partir de retina [205] i de íleum de rata [209]. Els 670 aminoàcids de la proteïna per la qual codifica presenta una homologia del 80% i del 72% (*aa*) amb *Oatp1* i *OATP-A*, respectivament. S'expressa a la membrana apical de les cèl·lules epitelials de l'intestí prim, a cervell, pulmó, retina, i dèbilment a melsa i fetge [209]. Recentment s'ha localitzat la seva expressió dins el teixit òptic, circumscrivent-se –a nivell de proteïna– en la superfície apical de l'epiteli pigmentari de la retina [204]. Al igual que pel cas de l'*Oatp2*, existeix una certa controvèrsia sobre la seva expressió a ronyó: si bé Walters et al. no eren capaços de detectar *Oatp3* al ronyó de rates Sprague-Dawley [209], en el treball on es descriu inicialment el seu clonatge, detecten una forta senyal renal del seu mRNA [205]. Altres grups han aconseguit aïllar el seu cDNA a partir de ronyó d'una soca mutant de les rates Wistar [210]. Una possible explicació a aquesta aparent disparitat de resultats podria explicar-se per l'existència de diferències específiques de soca en l'expressió d'aquests transportadors, com es dóna en rosegadors; en qualsevol cas, si *Oatp3* realment s'expressa a ronyó, no es disposa encara d'informació sobre la seva localització a la membrana ni sobre llur distribució nefronal.

A nivell funcional, l'*Oatp3* de rata, juntament amb l'*Oatp2*, va ser un dels primers transportadors identificats molecularment com a transportador d'hormones tiroïdals (tot i que després es va veure que altres membres de la família dels *Oatp/PGT* també podien transportar-ne [205, 211,212]). Entre els seu substrats trobem (a més de  $T_3$  i  $T_4$ ), a àcids biliars, esteroides, glucòsids cardíacs i oligopèptids [209, 205, 213]. Donada la seva expressió en els enteròcits al llarg del tracte de l'intestí prim, localització luminal, i llur alta afinitat per substrats com el TCA ( $21 \mu\text{M}$ ) [214], s'ha suggerit que

seria el transportador intestinal responsable de la reabsorció facilitada (independent de  $\text{Na}^+$ ) dels àcids biliars de retorn cap a la circulació enterohepàtica [209, 214]. Queda per establir si el transport de salts biliars es via un mecanisme de bescanvi amb un altre anió, com per ex. el  $\text{HCO}_3^-$ .

**Oatp4 / *rlst-1*** L'equivalent en rates del transportador d'anions orgànics humà específic de fetge, LST-1/OATP-C/OATP2 (SLC21A6) [215] es va aïllar com a dos isoformes de llargades desiguals a partir de teixit hepàtic, anomenant-se en consonància com a *rat liver specific organic anion transporter (rlst-1)* codificava per una proteïna de 652 aminoàcids, sensiblement més curta que el corresponent homòleg humà citat (691 aa de longitud), amb el que compartia un 60,2% d'identitats aminoacídiques [216]. D'aquesta manera, l'anàlisi computacional d'hidropatia predeia només 11 regions transmembrana (en front dels 12 dominis postulats per la majoria de membres de la família OATP/PGT) per aquesta forma curta, amb la consegüent inversió topològica de l'extrem C-t que ara passava a ser (predictivament) extracel·lular. La segona forma isolada de rata isolada, considerada com la verdadera *full-length*, es va anomenar Oatp4 (Slc21a10) i en comparació amb el *rlst-1* previ contenia 35 aminoàcids extres (687 aa totals) en el putatiu domini transmembrana n° IX, encaixant ara si en el model predit de 12 dominis transmembranosos [217]. L'expressió de les dos formes es restringeix exclusivament a fetge, havent-se localitzat la forma sencera, Oatp4, a la membrana basolateral dels hepatòcits. [213]. Mitjançant assaigs de protecció a la ribonucleasa es va aclarir que el transcrit predominant en el fetge de rata era el d' Oatp-4, mentre que la forma delecionada, *rlst-1*, representava una variant de *splicing* menor [217]. De manera independent, una variant de *splicing* addicional de 654 aa, designada com a *rlst-1c*, també ha estat descrita per un tercer grup, corroborant però que la forma hepàtica expressada de forma majoritària i funcionalment més rellevant seria la de 687 aminoàcids Oatp4 [218].

Respecte a les habilitats funcionals presentades per aquestes diferents variants hepàtiques, les de *rlst-1* han resultat estar molt mermades respecte la forma Oatp4. Fins a la data, només s'ha pogut demostrar que transporti taurocolat, en contrast amb l'especificitat de substrat més ample

de la variant d'expressió principal, que inclouria hormones esteroïdals conjugades, BSP, prostaglandina  $\text{E}_2$ , hormones tiroïdals [213, 217].

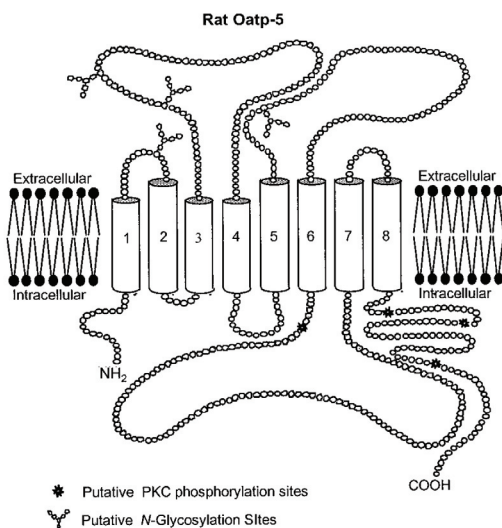


FIG 27. Predicció de la topologia per la proteïna Oatp5 de rata. Els dominis transmembrana s'indiquen amb cilindres. (Ex-tret i modificat de Choudhuri S. et al., [219])

**Oatp5** D'aquest nou membre tan sols es té una informació mínima apareguda recentment en les bases de dades de seqüències: designat com a Oatp5 (*Slc21a13*) (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. NP\_570092), es tractaria (putativament) d'un transportador específic de ronyó amb una mida de 670 aminoàcids, amb d'homologies del 77%, 75% i 74% amb Oatp2, Oatp3 i Oatp1 de rata, respectivament. A diferència de la majoria d'Oatp's, per l'Oatp5 de rata es prediuen només 8 dominis transmembrana, amb la presència d'un segon *loop* extracel·lular relativament gros, i d'un *loop* intracel·lular molt gran [219]. (Fig. 26)

**OAT-K1** Es tracta d'un altre dels membres "històrics" de la família identificat abans que es produís el boom de clonatges que ha engrandit i gairebé completat la superfamília en els darrers temps. El OAT-K1 (*Slc21a4*), representa un altre membre de la família Oatp de

rata amb una distribució de teixits força restringida. Conegut com a transportador renal de metotrexat, va ser clonat inicialment a partir de ronyó [220]. Amb una semblança del 72% (*aa*) amb Oatp1, la seva expressió és específica de teixit renal, localitzant-se especialment en les membranes apicals de les cèl·lules del túbul proximal recte [221]. D'aquesta proteïna, al igual que per Oatp4, se n'ha descrit un variant de mida menor, també específica de ronyó, entre elles **OAT-K2**, de només 498 *aa* (li mancarien els primers quatre dominis transmembrana del *N-t* predits per la forma llarga K1) i amb una homologia del 91% en la resta, [222].

OAT-K1 presentaria una especificitat de substrat bastant restringida, que inclouria al folat i al farmac anticancerígen *methotrexate* (MTX). Per altra banda, la variant curta OAT-K2 oferiria una especificitat més ampla de transport, acceptant apart d'aquests dos substrats citats altres anions orgànics com el taurocolat i la PGE<sub>2</sub> [221]. De moment, queda per determinar si intervé en l'*efflux* o en la reabsorció en el túbul.

Durant la preparació d'aquest manuscrit s'ha anunciat l'aparició d'un treball que descriu la identificació de diverses variants més de *splicing* de OAT-K1, [223].

**Oatp-E** L'equivalent en rates de l' *OATP-E* humà (*SLC21A12*) ha estat clonat recentment a partir de retina per Fujiwara K, *et al.* [211], designant-lo amb el nom afí *Oatp-E* (*Slc21a12*). Definit com a transportador d'hormones tiroïdals, els seus 723 aminoàcids comparteixen una identitat del 72,6 % amb el representant humà, mentre que amb altres membres de la superfamília dels OATP/PGT l'homologia decau per sota del ~31 %. Donat que constitueixen una branca relativament separada en l'arbre filogenètic, els autors han suggerit que OATP-E/Oatp-E constituïrien una subfamília dins els transportadors d'anions orgànics, podent-se considerar que es tractaria de gens ortòlegs [211].

Apart de la seva obtenció a partir de retina, no es disposa de més informació sobre la seva expressió en els teixits de rata. Respecte la seva possible funció, s'ha demostrat que Oatp-E és capaç de mediar la captació de triiodotironina (T<sub>3</sub>) i taurocolat en oòcits microinjectats, encara que amb induccions modestes.

**Oatp9** Anomenat originàriament com a transportador multiespecífic d'anions, moat1 [224], el seu cDNA ha estat clonat a partir de cervell de rata, detectant-se un transcrit d'unes 4,4 *kb* principalment a fetge però també en al majoria de teixits, cervell inclòs. Mitjançant hibridació *in situ*, els mateixos autors han demostrat que està distribuit ampliament en moltes regions cerebrals, especialment en el còrtex cerebral, el hipocamp i el cerebel. La seva caracterització farmacològica en oòcits de *xenopus* ha demostrat que transporta diverses prostaglandines, leucotriè C<sub>4</sub>, tromboxà B<sub>2</sub>, taurocolat, però no digoxina [224]. Li ha estat assignat el símbol gènic *Slc21a9*, pel que preferim designar-lo com a Oatp9. Presenta unes homologies moderades amb altres membres de la família, constituint-ne una branca separada; respecte a possibles ortòlegs en humans i en ratolí, les proteïnes més properes serien l'OATP-B humà (76% d'homologia) i el *Slc21a9* murí (91% d'homologia), respectivament.

**BSAT1** Aquest cDNA clonat a partir d'una llibreria de capil·lars cerebrals de rata, ha estat anomenat inicialment com a transportador d'anions específic de la barrera hematoencefàlica (*Blood-Brain-Barrier specific anion transporter*, *Bsat-1*), [225]. D'expressió altament enriquida sinó exclusiva a les estructures constituents de la BBB, la proteïna deduïda (716 *aa*) de llur seqüència presenta una elevada homologia del 85% amb l'OATP-F (*SLC21A14*) humà, pel que creiem que una designació més adient seria la de Oatp-f i la conseqüent assignació del símbol gènic *Slc21a14*, donada la seva més que probable ortologia.

**Pgt2** Un altre membre del qual només se'n coneix informació actualment a partir de les bases de dades es l'anomenat transportador de prostaglandines, subtipus 2 (Pgt2), però que comporta un interès especial ja que creiem que es tractaria en realitat del ortòleg de rata del OATP-D (*SLC21A11*) humà, del qual en aquest treball experimental s'ha investigat alguns aspectes, a part de l'identificació i caracterització del seu representant murí, *Oatp-d/MJAM*.

### 5.1.2. Els OATP's humans

**OATP-A** El primer OATP humà va ser clonat a partir de fetge l'any 1995 [226], subseqüentment a la identificació de *Oatp1* i *Pgt* en rates. Inicialment conegut com a OATP (ja que era l'únic representant descrit en humans fins aleshores), actualment se'l designa per OATP-A (*SLC21A3*). Tot i presentar una identitat en aminoàcids del 67% amb el transportador de *Oatp1* de rata, no exhibeix la mateixa distribució tissular ni la mateixa especificitat de substrats, pel que es considera que no correspondria a l'ortòleg seu. L'OATP-A està compost per 670 aa que conformarien una estructura predita de 12 dominis transmembrana. A nivell d'mRNA, s'ha detectat a cervell, fetge, pulmó, ronyó i testicle, amb la senyal més intensa a cervell [226]. En el còrtex cerebral, la proteïna s'expressa a la barrera hematoencefàlica al llarg dels microvasos i cèl·lules endotelials [227].

Comparat amb altres OATPs humans, l'OATP-A desplega una amplíssima especificitat de substrat acceptant tan anions orgànics com BSP, conjugats d'hormones esteroidals, hormones tiroïdals, àcids biliars, fàrmacs oligopeptídics, compostos neutres com el glucòsid cardíac ouabaina, prostaglandines i inclús cations orgànics amfipàtics com la N-metilquinina (*veure taula XIII*).

**OATP-C/LST-1/OATP2** El segon representant humà de la família de transportadors d'anions orgànics identificat cronològicament va ser clonat a partir de fetge i anomenat inicialment LST-1 (*liver specific organic anion transporter*), fent referència a la seva expressió hepàtica exclusiva [215]. Amb no gaire posterioritat, dos grups més van clonar-lo i descriure'l també de manera independent, designant-lo OATP-C i OATP2 [228, 229]. Per evitar confusions, a partir d'ara i al llarg de la memòria l'anomenarem com a OATP-C (*SLC21A6*), seguint la regla pràctica de designar als membres humans amb una lletra majúscula, (i amb el símbol gènic A6 suggerit per l'HUGO, per tal de poder identificar-lo unívocament).

A nivell d'homologia, comparteix unes identitats aminoacídiques del 64, 44, 36 i 44% amb *Oatp4*, OATP-A, PGT i *Oatp1*, respectivament. Com el seu nom inicial indicava, s'expressa selectivament a la membrana basolateral dels hepatòcits humans [230], (*veure figura 28*). Tot i expressar altres OATPs, el transportador hepàtic de sals biliars com el taurocolat més important de fetge humà és OATP-C [214]; és el que contribueix en més gran mesura al transport hepàtic ( $\text{Na}^+$  independent) de sals biliars, com de la seva captació hepàtica des de la circulació enterohepàtica. A nivell funcional, una característica pròpia de transport és que transporta bilirrubina sense conjujar [214].

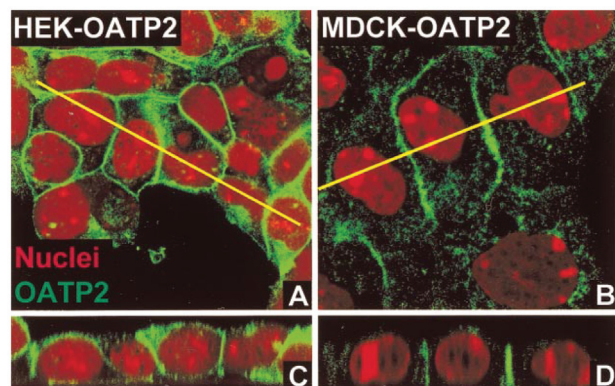


FIG 28. Immunolocalització de OATP-C(OATP2) recombinant en cèl·lules transfectades establement. La senyal fluorescent verda correspon a OATP-C transfectat en cèl·lules HEK293 (A i C) i en cèl·lules MDCK (B i D). Els nuclis s'han tenyit amb iodur de propidi (senyal vermella). C i D: seccions verticals corresponents. (extret de König J et al., [229])

**OATP-B** Seguint la convenció de designar amb lletres els membres humans, aquest nou transportador clonat de cervell es va anomenar com a OATP-B (*SLC21A9*), mapant-lo en el cromosoma 11 [231]. D'expressió amplia dintre els teixits humans, per *northern blot* se'l detecta majoritàriament a fetge, melsa, placenta i pulmó, amb presència també en altres teixits [232, 233]. A nivell hepàtic s'ha localitzat la seva proteïna amb anticossos específics en el domini basolateral dels hepatòcits. Com a característica funcional rellevant, citar la seva limitada especificitat de substrat respecte a altres OATPs hepàtics com OATP-A o OATP-C, transportant l'anió orgànic colefílic BSP, E3S o DHEAS, però sembla que no acceptaria sals biliars [232]. En l'apartat de possibles homòlegs a rosegadors d'aquest gen humà, destacariem al *Oatp9* de rata (76% en *aa*), i possiblement el cDNA de ratolí (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. n° XP\_133672) que comparteix un 91% d'aminoàcids amb l'*Oatp9* de rata.

**OATP8** Un altre transportador d'expressió específica hepàtica, juntament amb OATP-C, és l'anomenat OATP8 (*SLC21A8*) [229]. Clonat a partir de fetge humà, els seus 702 *aa* de mida comparteixen un 40% amb OATP-A i un 80% d'identitats aminoacídiques amb OATP-C. Al igual que aquest darrer transportadors, es localitza selectivament en les membranes del domini basolateral dels hepatòcits [229]. A nivell cromosòmic es troba situat en la regió 12p12, en un *cluster* de gens d'altres membres de la família OATP.

L'OATP8 transporta conjugats esteroïdals, BSP, hormones tiroïdals, pèptids cíclics, digoxina, i amb una baixa afinitat també sals biliars (demostrat en oòcits però no en cèl·lules de mamífer [229]). Aquest transportador d'anions orgànics, en conjunció amb OATP-B, -C (i en menor mesura -A), serien els responsables de respondre per la major part de transport independent de sodi, de sals biliars, anions orgànics, i aclariment de drogues i fàrmacs per part del fetge humà [214].

**PGT** El segon membre humà de la família de transportadors d'anions orgànics/prostaglandines identificat va ser el transportador de prostaglandines, PGT (*SLC21A2*) [235]. Va ser clonat l'any 1996 a partir de ronyó humà, no gaire després del clonatge del *Pgt* de rates, amb el qual comparteix un 82% d'identitats en aminoàcids; respecte altres membres arquetípics de la família com l'OATP-A humà o l'*Oatp1* de rata, els PGT (tan l'humà com els de rosegadors) estan més distanciat compartint només unes similituds del ~30%, constituint-ne una subfamília amb una branca separada dins l'arbre filogenètic. El gen es localitza en la regió cromosòmica 3q21 i consta de 14 exons repartits en prop de 94 *kb* [236], i la seva expressió es reparteix en una gran nombre de teixits, postulant-se que intervé en l'aclariment metabòlic tissular de prostaglandines. Transportaria diversos tipus de prostaglandines amb afinitats desiguals [235]; recentment s'ha establert un possible mecanisme de transport que implicaria bescanvi amb el contranió lactat, que esdevindria la força motora per la captació de prostaglandines en cèl·lules immerses en fase activa de glicòlisi [237].

**OATP-D** Identificat a partir de ronyó humà per Nezu, J. (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. n° AB031050), subseqüentment Tamai, I. *et al.* descriu la seva caracterització i clonatge juntament amb la d'altres OATPs humans [231]. El seu cDNA codificaria per una proteïna de 710 aminoàcids, amb unes identitats d'entre 30-40% amb altres OATPs humans, indicant que OATP-D pertany a una subfamília separada dins la superfamília de transportadors de membrana OATP/PGT. Considerant els rosegadors, l'escenari s'inverteix considerablement respecte a humans, trobant homòlegs a ratolí i a rata d'una elevadíssima identitat: 96% amb *MJAM/Oatp-d* (objecte d'estudi en aquesta tesi) i del 95% amb "Pgt2", respectivament. La seva expressió es troba força disseminada en la majoria de teixits, incloent cervell, cor i testicle. El seu gen està localitzat en la regió cromosòmica 15q26, la qual s'ha relacionat mitjançant estudis de lligament amb

població humana hipertensa, amb la presència d'un QTL (*quantitative trait locus*) de pressió sanguínia elevada [238]. A nivell funcional es disposa de poca informació, tot i que Tamai *et al.* demostraren que expressat en cèl·lules HEK293 era capaç de transportar E3S, PGE<sub>2</sub> i benzilpenicil·lina, els valors d' *uptake* descrits pels autors citats són molt baixos i discutibles.

**OATP-E** També present a les bases de dades com OATPRP1 (*OATP Related Protein 1*), el cDNA corresponent a OATP-E (*SLC21A12*) va ser clonat per Tamai *et al.* en un treball on identificaven varis membres humans de la família dels OATPs [231]. Posteriorment el gen i el cDNA també han estat clonats juntament amb llur homòleg de rata, *Oatp-E* a partir de cervell (hipocamp) humà i retina de rata, respectivament [211]. El cDNA aïllat codifica per un polipèptid de 722 aminoàcids amb 12 segments transmembrana predits. Amb el seu ortòleg candidat de rata *Oatp-E* comparteix un ~73% d'identitats aminoacídiques i, un 74% amb la proteïna deduïda del cDNA murí *Slc21a12* (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. n° NP\_683735) la qual també es pot assumir que correspon al seu gen ortòleg a *mus musculus* (entre les dos proteïnes de rata i ratolí anomenades hi ha una identitat del 95% en *aa*); L'homologia d'OATP-E disminueix amb altres representants humans com PGT (35% en *aa*), OATP8 (30% en *aa*), situant-se a  $\leq 34\%$  amb la resta de membres. L'anàlisi d'homologia i filogènia amb els altres transportadors de la família *SLC21*, revela doncs que OATP-E/*Oatp-E/Slc21a12* formarien un subgrup distanciat dins l'arbre filogenetic dels OATP/PGT;

El patró d'expressió per RT-PCR en un ventall ampli de teixits humans adults i fetals indicava que aquest nou membre s'expressa de manera mes o menys ubiqua en la majoria de teixits humans perifèrics, entre ells a fetge o a intestí prim [211, 231]. A nivell funcional, presenta com a substrats rellevants a les hormones tiroïdals com la triodotironina, T<sub>3</sub> ( $K_m$  0,9  $\mu$ M) o àcids biliars com el taurocolat. En aquest sentit s'ha suggerit que podria estar participant en la circulació enterohepàtica de sals biliars i en el transport perifèric d'hormones tiroïdals [211]. També s'ha demostrat que transporta E3S i, presumiblement amb baixa afinitat E<sub>2</sub>17G [210].

**OATP-F** Aquest nou gen humà de la família, designat com a OATP-F (*SLC21A14*), només figura a les bases de dades com un cDNA clonat a partir de cervell (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. n° AAF70338), de manera que disposem de poca informació sobre les seves funcions. A nivell d'homologia, sembla ser que podria correspondre amb el transportador de rata BSAT-1 (85% d'homologia en *aa*), relacionat amb el transport d'anions a la barrera hematoencefàlica, i en ratolí amb el cDNA *Slc21a14* (95% d'homologia amb BSAT-1). (NOTA: Recentment ha estat publicat el seu clonatge –Pizzagalli, F. *et al.*, [239]–, caracteritzant-lo essencialment com a transportador d'alta eficiència d'hormones tiroïdals, expressat predominantment en varies àrees cerebrals i a testicle)

**OATRP4** Es tracta d'un cDNA aparegut recentment a les bases de dades (*Genbank*<sup>TM</sup> acc. n° AAG42207) i designat com a OATPRP4 (*OATP Related Protein 4*), que codificaria per una proteïna deduïda de 848 aminoàcids relacionada estructuralment amb la família de transportadors d'anions orgànics (36% d'identitats aminoacídica amb OATP-E, o un 33% amb OATP-C). L'inspecció del genoma humà disponible als servidors públics, situaria el gen putatiu de OATPRP4 en el cromosoma 8, allunyat del *cluster* de gens OATP del cromosoma 12. Fins a la data encara no se l'hi ha assignat cap símbol gènic de la família *SLC21*.



### 5.1.3. Els Oatp's de ratolí

La família murina del oatps ha estat la darrera en incorporar-se, amb alguns dels seus membres clonats i caracteritzats recentment, de manera que encara no es pot dir que s'hagi completat (coma mínim durant la redacció d'aquest capítol). De tota manera la possibilitat de realitzar en aquesta espècie modificacions genètiques dirigides fa que en el futur recent el ratolí pugui ser un model molt important

per determinar els rols funcionals dels oatps murins i que l'informació extreta dels animals *knock-out* ajudi a entendre millor als seus equivalents en humans.

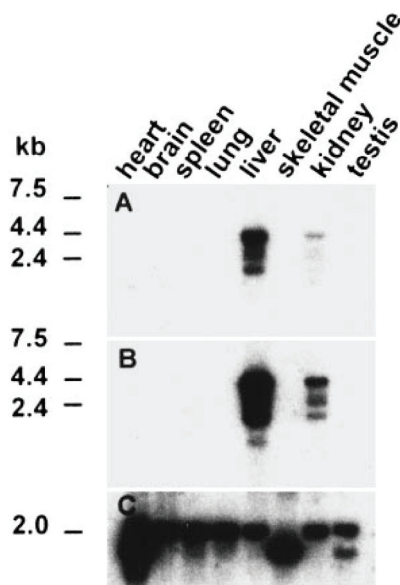


FIG 29. Expressió de Oatp1 en els teixits de ratolí BALB/c. Northern-blot mostrant l'expressió del missatger de Oatp1 a diferents teixits murins de la soca BALB/c. (Adaptat de Hagenbuch, B. et al., [240])

**Oatp-1** El primer transportador d'anions orgànics clonat de la família Slc21 murina (si no contem el Pgt, descrit a continuació), ha estat el Oatp1 (*Slc21a1*) [240]. El clonatge i caracterització d'aquest transportador ha ocupat bona part del treball experimental d'aquesta tesi, durant la realització de la qual va aparèixer publicat el seu mateix clonatge per part del grup esmentat de Hagenbuch, B et al. de l'universitat de Zurich. Els autors citats, clonaren el cDNA a partir de fetge de ratolins de la soca BALB/c, trobant expressió del seu missatger per *northern-blot* a fetge i a ronyó (Fig. 29). Inicialment van localitzar el gen per FISH en el cromosoma X, però a la llum de les dades recents del genoma de ratolí, sembla ser que la localització prèvia era errònia, situant-se realment en el cromosoma 6, enmig d'un *cluster* d'altres Oatps murins.

**Pgt** El cDNA ortòleg de ratolí *Pgt* (*Slc21a2*) del transportador de prostaglandines humà i de rata identificats prèviament, va ser clonat a partir d'una llibreria murina de pulmó [241]. Les proteïnes predites dels representants d'aquestes tres espècies són molt semblants: el Pgt de ratolí i el de rata són un 91% idèntics, mentre que amb el PGT humà són un 82% idèntics, respectivament. El patró d'expressió del seu mRNA en canvi, és molt més restringit que el dels seus homòlegs, detectant-se un transcrit de ~4.4 kb principalment a pulmó i fetge, i en menor grau a ronyó i múscul esquelètic. El gen s'ha mapat al cromosoma 9 murí, en una regió sintènica amb el cromosoma 3q21 humà, on es troba localitzat consistentment el PGT humà [241].

A nivell funcional, presenta el caràcter distintiu d'una afinitat més baixa per la PGE<sub>2</sub> comparat amb els membres equivalents de rata i humà.

**Oatp-2** El representant murí anomenat Oatp2 (*Slc21a5*) ha estat identificat recentment de manera independent per dos grups. Clonat a partir de fetge de ratolí de la soca Webster suïssa per Monfoort J et al., el cDNA presentava algunes variacions respecte al clonat per Ogura et al. (originari de la soca BALB/c) [242, 243]; aquestes petites diferències en seqüència pot atribuir-se al fet de l'existència de variacions segons la soca murina.

Mitjançant northern-blot detecten un transcrit intens a fetge, i menys feble a ronyó i cervell. Ogura et al., obtingueren el cDNA de la soca BALB/c. El Oatp2 de ratolí és un 88% idèntic a nivell d'aminoàcids amb l'Oatp2 de rata, la màxima homologia amb un OATP humà es del 72 % amb OATP-A. La seva estructura genòmica ha estat determinada, mapant-se al cromosoma 6 G1-G2 de ratolí [242, 243]. A nivell funcional transporta digoxigenina, BSP, però no taurocolat o el catió *rocuronium* [243]. Basant-se amb

l'elevada identitat aminoacídica, la similar distribució d'expressió i llurs característiques funcionals, es pot considerar probablement com l'ortòleg del *Oatp2* de rata, tot i que la definitiva assignació d'ortologies entre ratolí, rata i humà resta encara per consolidar-se.

**Oatp-4 / *lst-1*** El transportador d'anions orgànics de ratolí específic de fetge *lst-1/Oatp4 (Slc21a10)* va ser clonat de fetge [244], considerant-se que com a mínim es tracta de l'ortòleg del *Oatp4 (Slc21a10)* de rata, mentre que amb humans l'homologia màxima la presenta no amb OATP-C/LST-1 sinó amb OATP8, seguit del mateix OATP-C. L'estructura genòmica del seu gen esta constituïda per 16 exons que s'extenen aproximadament unes 60 kb. Al igual que els seus equivalents, s'expressa exclusivament a fetge. La proteïna deduïda de 689 aa presenta unes homologies en aminoàcids del 81%, 63% i del 66% amb el *lst-1* de rata, l'OATP-C, i OATP8 humans, respectivament. Amb altres membres de la família, l'homologia es mes feble (un 43% amb *Oatp1* de rata, per exemple) de manera que podem considerar que aquest gens forma una branca dins la superfamília juntament amb *rOatp4*, OATP-C i OATP8.

**Oatp-14** Nom temptatiu pel cDNA descrit únicament a les bases de dades com *mouse Slc21a14 (Genbank™ acc. n° NM\_021471)*. També anomenat (erròniament) *Oatp2* murí, codificaria per una proteïna predita de 723 aminoàcids, relacionada amb l'OATP-F humà i el BSAT1 de rata, amb els que comparteix una elevada homologia.

**Slc21a12** Al igual que pel cas anterior del *Slc21a14*, aquest candidat a pertànyer a la família *oatp* murina, només ha estat descrit en les bases de dades de seqüències com un cDNA clonat a partir de retina de ratolí de la soca C57BL/6 (*Genbank™ acc. n° NM\_148933*). En aquest cas, la proteïna deduïda estaria relacionada per homologia amb els OATP-E humà i el *Oatp-E* de rata.

**MJAM/Oatp-d** Aquest nou transportador murí és descrit i caracteritzat en aquest treball experimental objecte de la tesi doctoral.

**Oatp-5** L'*Oatp-5* de ratolí (*Slc21a13*) va ser clonat de ronyó, teixit on s'expressa exclusivament [245]. L'anàlisi filogenètic revelà que es tracta de l'ortòleg murí de l'*oatp5* de rata (comparteixen un 78% d'homologia en aminoàcids), i que aparentment cap dels OATPs humans clonats presenta una semblança suficient elevada per ser considerat com a llur ortòleg humà. Malauradament tan pel membre de rata com pel de ratolí es disposa de molt poca informació funcional.

6. ASPECTES CEL·LULARS I MOLECULARS DEL TRANSPORT RENAL DE COMPOSTOS ORGÀNICS



Tan el ronyó com el fetge desenvolupen un paper crític en l'eliminació de nombroses substàncies potencialment tòxiques per l'organisme, com són xenobiòtics ambientals, toxines, fàrmacs i catabòlits endògens finals. L'eliminació renal d'aquests productes implica filtració glomerular, secreció i també reabsorció tubular. Daltre banda, el ronyó al llarg de l'evolució dels vertebrats ha desenvolupat sistemes de transport d'alta capacitat, per prevenir la pèrdua urinària per filtració de nutrients valuosos com glucosa, aminoàcids o ions inorgànics, simultàniament amb d'altres per facilitar l'excreció tubular de la varietat de xenobiòtics que escapen dels processos hepàtics d'extracció. En els túbuls proximals renals es donen processos de secreció i absorció essencialment de naturalesa saturable, realitzats per transportadors de membrana que medien el transport transepitelial vectorial.

6.1. Mecanismes de secreció renal d'anions i cations orgànics

La majoria de compostos forans que ingressen a l'organisme, incloent als xenobiòtics alimentaris i ambientals, fàrmacs, drogues, toxines animals i vegetals, són sovint molècules orgàniques amb càrrega neta permanent (o transitòria) positiva o negativa, categoritzant-se per tant com a cations o anions orgànics, respectivament. (taula XIV) A més a més, tan aquestes molècules estranyes, com molts productes endògens interns són metabolitzats també fins a derivats aniònics i/o catiònics, que en alguns casos, juntament amb els xenobiòtics potencialment tòxics, caldrà eliminar de l'organisme per evitar-ne els efectes nocius. En aquest sentit, l'excreció renal d'aquests agents i llurs metabòlits, en conjunció amb la seva oxidació metabòlica i conjugació, jugarà un paper vital en la protecció contra la toxicitat. L'eliminació ràpida i efectiva de totes aquestes substàncies indesitjables, és una de les funcions primàries dels sistemes de transport renals d'anions i de cations orgànics [246].

Podem distingir, en principi, dos sistemes secretors de transport que operen en la excreció renal d'aquests compostos: un per els anions orgànics i l'altre per els cations. Similarment, ambdós sistemes són capaços de transportar un ampli rang de substrats (incloent-ne d'endògens), requerint només una càrrega apropiada dins un esquelet hidrofòbic.

Cal esmentar que determinades substàncies d'aquestes (especialment les rellevants endògenament) poden també ser reabsorbides en la nefrona, per prevenir la pèrdua en l'ultrafiltrat de substàncies fisiològicament rellevants. Els mecanismes que contribueixen a la seva excreció renal estan íntimament relacionats amb els successos fisiològics ocorreguts a les nefrones, *i.e.* filtració, secreció i reabsorció.

TAULA XIV. Alguns cations i anions orgànics transportats pels túbuls renals

CATIONS ORGÀNICS	
Substàncies endògenes	Neurotransmissors: colina, acetilcolina, epinefrina vitamines: riboflavina, tiamina creatinina histamina N <sup>1</sup> -metilnicotinamida (NMN)
Xenobiòtics catiònics	drogues: morfina, atropina quinina, quinidina trietanolamina (TEA) antihistamínic amiloride citostàtics: cisplatí
ANIONS ORGÀNICS	
Substàncies endògenes	prostaglandines vitamines: folat, ascorbat dicarboxilats: α-cetoglutarat conjugats hormonal: DHEAS, estradiol-glucurònid àcids biliars: colat, taurocolat urat
Xenobiòtics aniònics	antibiòtics: penicilina G antiinflamatoris no esteroïdals: indometacina, salicilats diürètics: bumetanide, furosemide tòxics químics: herbicides, plastificants aminophenols uricoúrics: probenecid micotoxines

(Adaptat i modificat de: Brenner, B.M., "The Kidney", vol. 1, pp. 608 i 619, [247])

Dins el ronyó, el transport de xenobiòtics i dels seus metabòlits està confinat al túbul proximal, existint sistemes separats de transportadors per la secreció activa d'anions i la de cations. Ambdós sistemes estan caracteritzats per una gran capacitat d'aclariment i una nombrosa diversitat de substrats acceptats, resultat de la intervenció de múltiples transportadors amb especificitats de transport parcialment solapades [247].

En aquest capítol ens centrem bàsicament en el transport d'anions orgànic per part dels OATPs (veure apartat 5.), malgrat que la literatura que concerneix als aspectes fisiològics i farmacològics del transport d'anions i de cations orgànics és molt voluminosa, amb excel·lents descripcions disponibles en articles de revisió i en discussions en llibres de text [210, 248-253].

### 6.1.1 El transport renal d'anions orgànics

Des de temps reculats s'ha vingut reconeixent que el ronyó era és capaç de secretar anions orgànics [254]. El fet de que molts colorants i pigments orgànics intensament colorejats siguin aniònics, va facilitar l'estudi dels processos renals implicats en llur secreció a partir de la sang. La secreció d'anions orgànics s'ha observat en pràcticament tots els vertebrats no mamífers i en crustacis [255].

Una àmplia varietat d'anions orgànics endògens i xenobiòtics són d'importància fisiofarmacològica per al conjunt de l'organisme. Aquests compostos són típicament àcids dèbils amb valors de  $pK_a$  inferiors al pH fisiològic, de manera que circulen com a anions carregats negativament.

#### *Característiques generals*

Els túbuls proximals és el lloc on es dona la secreció i reabsorció d'anions orgànics. Allà es produeix, en concert amb la secreció neta efectiva, també una acumulació substancial d'aquestes molècules tan al lumen tubular com dins les mateixes cèl·lules epitelials que conformen el túbul. En mamífers, les concentracions en la llum tubular poden arribar a excedir les del plasma en 30-50 vegades [246]. Per arribar a l'espai tubular des de la sang, els substrats tenen que travessar dos barreres: el domini membranós basolateral i les membranes apicals, de manera que el procés final de secreció consta de dos etapes distingibles amb successos separats en el cantó peritubular i al cantó luminal del túbul. La primera etapa de transport d'entrada a través del domini contraluminal, és necessàriament un procés depenent d'energia, ja que els anions negativament carregats tenen que vèncer un gradient electroquímich desfavorable (el potencial elèctric interior és lleugerament negatiu respecte al exterior); A més a més, el procés també requereix de l'existència d'un gradient de  $Na^+$  (fora>dins), però contràriament al que es pensava no l'utilitza directament sinó indirectament acoblant-lo al bescanvi amb algun intermediari metabòlic.

Així doncs la dependència del sodi com a força motora és indirecte, realitzant-se el procés a través de mecanismes de transport actiu terciari. D'aquesta manera, l'energia metabòlica subministra el combustible en forma d'ATP, per que la bomba de  $Na^+/K^+$  mantingui una  $[Na^+]$  externa major que la  $[Na^+]$  intracel·lular; aquest gradient servirà per acoblar-hi diferents bescanvis que finalitzaran amb l'entrada facilitada dels substrats orgànics carregats, amb l'intervenció dels transportadors corresponents.

Un cop dins la cèl·lula els anions orgànics no es distribueixen uniformement, poden patir *binding* extensiu a diferents estructures internes o ser segrestats dins d'estructures vesiculars. La finalitat d'aquests esdeveniments podria explicar-se, en el primer cas per reduir la possible toxicitat associada a l'acumulació d'alguns d'aquests productes potencialment nocius, i la del segon procés observat en l'existència especulativa d'una via transcel·lular vesicular de secreció dels anions orgànics.

La segona etapa de transport, la de la sortida luminal, té lloc a través de las membranes *brush-border* de les cèl·lules tubulars. Existeixen dos vies potencials per l'eflux dels substrats, a través de bescanvi amb anions luminals els quals es reabsorbeix i a través de difusió facilitada. Cal esmentar que aquests mecanismes descrits són models, i que juntament amb aquests sistemes de transport proposats en realitat estan participant múltiples proteïnes de transport implicades en la secreció d'anions a través de la membrana apical.

En la figura 30 es mostra el model esquemàtic dels mecanismes de transport d'anions orgànics en les cèl·lules tubulars renals. La captació d'anions orgànics (OA<sup>-</sup>) a través de la membrana basolateral està mediat pel sistema clàssic de transport d'anions orgànics dependent de Na<sup>+</sup>, que acobla indirectament el transport (actiu terciari) al gradient de Na<sup>+</sup> generat per la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa (①), i que inclou al cotransportador de Na<sup>+</sup>/dicarboxilats (②), i al bescanvi de dicarboxilats/ OA<sup>-</sup> (③) mediat per membres de la família dels OATs (SLC22A). Uns segon sistema(④), independent de Na<sup>+</sup>, efectiu pel gruix d'anions orgànics més apolars, ha estat identificat però encara es desconeix llur força motora.

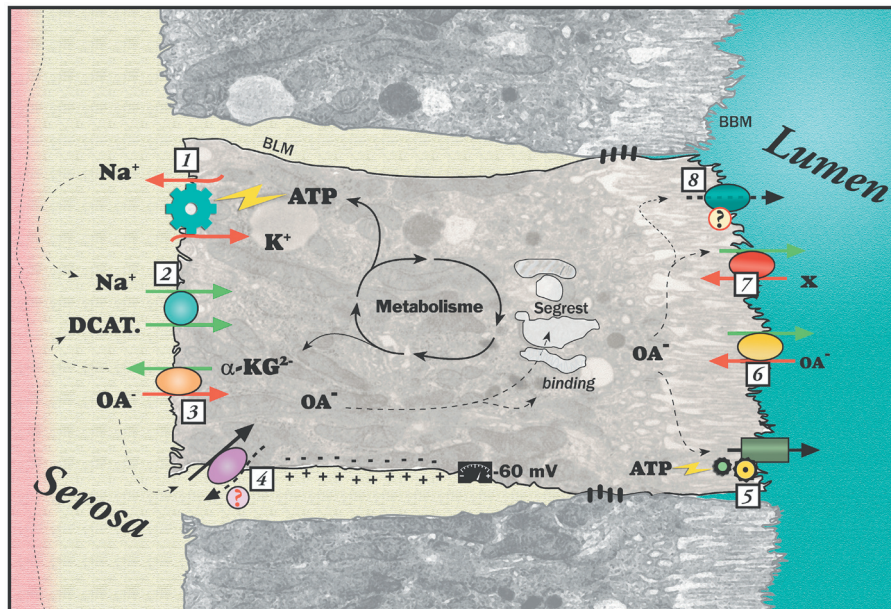


FIG 30. Model esquemàtic dels sistemes de transport d'anions orgànics en el túbul proximal renal. Es mostren els diferents sistemes de transports (alguns només postulats) implicats en el transport d'anions orgànics per part de les cèl·lules epitelials del túbul. Veure el text per una descripció detallada. OA: anions orgànics; DCAT: dicarboxilats; BLM: membrana basolateral; BBM: membrana *brush-border*;  $\alpha$ -KG<sup>2-</sup>,  $\alpha$ -cetoglutarat; (Adaptat a partir de [210, 246, 247])

La membrana apical, d'altra banda, conté diferents sistemes transportadors per l'eflux dels OA<sup>-</sup> cap al lumen del túbul, i també per la seva reabsorció. Membres de la família dels transportadors ABC, com per ex MRP2, mediaríen l'extrusió luminal dependent d'energia de drogues aniòniques (en un mecanisme de transport actiu primari)(⑤); Els polipeptids transportadors d'anions orgànics, OATP's (SLC21A), situats en aquestes membranes *brush-border*, podrien mediar la sortida facilitada dels anions orgànics (⑦) i/o podrien estar participant també en llur reabsorció via algun mecanisme d'intercanvi (⑥). Finalment no es descarta l'existència d'algun sistema de transport facilitat simple que contribuís a la secreció cap a dins del túbul (⑧).

## 6.2. Model funcional del transport renal d'anions orgànics

Els sistemes renals de transport implicats en la secreció d'anions orgànics poden ser subdividida funcionalment –de manera abreujada– en dos grans grups, segons requereixin (directa o indirectament) o no el concurs dels ions  $\text{Na}^+$  com a força motriu:

- EL SISTEMA DEPENDENT DE SODI, responsable del ben caracteritzat transport d'anions orgànics model com el *p-aminohippurat* (pAH) i, mediat per membres de la família dels OATs (*organic anion transporters*)
- EL SISTEMA INDEPENDENT DE SODI, identificat més recentment i format per representants de la família dels OATPs (*organic anion transporting polypeptides*)

Ambdós sistemes medien la translocació, en dos etapes conceptualment seriades, dels substrats orgànics carregats negativament a través de la barrera física que constitueix la bicapa lipídica. Aquestes dos etapes són (1): captació des de la circulació sanguínia a través de la membrana basolateral (al cantó contraluminal) de les cèl·lules epitelials renals, i (2): seguit d'efluència cap a l'orina a través de la membrana apical (a l'extrem luminal); dins el citoplasma cel·lular, els substrats d'ambdós sistemes poden patir segrest en determinats compartiments subcel·lulars,

1) TRANSPORT BASOLATERAL. Donat que les cèl·lules tubulars mantenen un potencial elèctric interior negatiu, la captació a través del domini basolateral es produeix en contra d'un gradient electroquímic, requerint d'aport energètic per tal de poder vèncer-lo. La captació de substrats com el pAH pel sistema de transport dependent de sodi apareix com un procés actiu terciari, acoblat indirectament al gradient de  $\text{Na}^+$ , que empeny secundàriament el cotransport de  $\text{Na}^+$ /dicarboxilat cap a l'interior de la cèl·lula, que alhora permet finalment la captació de pAH en bescanvi amb l'ió dicarboxilat. El gradient de sodi favorable a la seva entrada està mantingut en primera instància per l'ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que funciona gràcies al combustible en forma d'ATP generat en el metabolisme oxidatiu cel·lular.

El transportador SDCT2 (*Slc21a3*) ha estat proposat com el cotransportador basolateral  $\text{Na}^+$ /dicarboxilat [256], i el contraió majoritari seria l' $\alpha$ -cetoglutarat, que és el dicarboxilat potencial més abundant en les cèl·lules del túbul proximal; llur gradient interior>exterior vindria sostingut per l'activitat del bescanviador de  $\text{Na}^+$ /dicarboxilat i la seva generació metabòlica intracel·lular

Apart dels transportadors clàssics de pAH, s'ha caracteritzat un sistema addicional de captació sobretot d'anions orgànics pobrament polars, que tindria unes característiques de ser independent de sodi i no ser inhibït per el pAH (la identitat molecular del qual és encara elusiva)

2) TRANSPORT APICAL. L'efluència dels anions orgànics a través de la membrana apical, es postula que ocorre per varies vies, a saber: per difusió facilitada, per bescanvi de baixa afinitat amb anions, i per un sistema actiu dependent d'ATP.

A part per la secreció, les membranes *brush-border* apicals també contenen múltiples sistemes de transport per la reabsorció de compostos de l'orina primària luminal

### *Identificació de les entitats moleculars responsables del transport*

En els últims anys s'han vingut identificant molecularment els transportadors responsables dels diferents sistemes de transport identificats pels fisiòlegs renals i caracteritzats farmacocinèticament. El clonatge dels múltiples transportadors individuals de diferents espècies i el seu posterior estudi molecular a suposat un gran avenç en la comprensió dels fenòmens cel·lulars de transport subjacents

en la secreció renal d'anions orgànics.

L'anàlisi d'homologia dels transportadors clonats i de llurs característiques estructurals ha permès agrupar-los en famílies, algunes de les quals estan implicades majoritàriament en el transport d'anions orgànics pròpiament dit, i d'altres que inclouen representats amb capacitat també d'acceptar-ne alguns substrats. Distingiríem bàsicament 4 agrupacions\*, algunes d'elles constituïdes per grans famílies gèniques, (en base als criteris d'unificació de nomenclatura, les proteïnes de transport s'han classificat en funció de llur homologia i funcionalitat, per exemple, dins dels transportadors facilitats identifiquem les subfamílies SLC –solute carrier family– numerades del 1 en endavant, mentre que dins la família de proteïnes (sovint bombes-transportadores) amb un cassette d'unió a ATP, *ATP-binding cassette*, o *ABC transporters* s'anomenen ABC-A, ABC-B), sintèticament:

- 1) Els transportadors d'anions orgànics, OAT's (SLC22A)
- 2) Els polipèptids transportadors d'anions orgànics, OATP's (SLC21A)
- 3) Proteïnes de resistència a múltiples drogues, MRP's (membres de la subfamília ABC-C)
- 4) Altres: –els transportadors de pèptids, PEPT1-PEPT2 (SLC15A);  
–cotransportador de sodi-fosfat tipus I, NPT1 (SLC17A)

\*Per una revisió detallada sobre aquestes famílies de transportadors, veure els diferents treballs disponibles sobre el tema ([210, 246, 247, 257-260] i altres).

I ja per concloure aquest bloc, esmentar que a mesura que el nombre de transportadors clonats creix, s'aprecia actualment que el sistema de transport d'anions orgànics és una organització complex de múltiples proteïnes de membrana plasmàtica, amb una aparent redundància, moltes de les quals són isoformes que utilitzen ATP o gradients iònics per dirigir àvidament la secreció de drogues i fàrmacs cap a l'orina. Una característica remarcable d'aquests transportadors és la seva àmplia especificitat de substrat i multifuncionalitat, així com la seva susceptibilitat a inhibidors. La seva identificació exhaustiva, caracterització molecular i farmacològica, permetrà en un futur proper avançar en la comprensió –en tota la seva complexitat– dels processos fisiològics renals referents a l'intercanvi de soluts, com de les seves alteracions en condicions patològiques corresponents.