

Universitat de Lleida
Departament de Medicina

**Paper del receptor d'N-metil-D-
aspartat en el control de la secreció
de l'hormona paratiroidal**

Eva M Parisi Capdevila

Coodirectors: Elvira Fernández Giráldez i
José Manuel Valdivielso Revilla

Lleida, Octubre de 2008

Als pares
Als germans
Al David

Agraiments

Escriure la tesi, en concret els agraïments, significa el final d'una etapa i l'inici d'una altra, desconeguda i excitant. Hi han hagut moments bons i d'altres de no tan però al final sempre es fa difícil acabar. Al llarg de tot aquest temps d'aprenentatge hi ha moltes persones que d'alguna manera o d'altra t'ajuden a seguir endavant, ja sigui a nivell professional o a nivell personal. A totes aquestes persones se'ls hi ha de donar les gràcies.

En primer lloc m'agradaria agrair al IRBLleida (abans Fundació Pifarré) el suport econòmic prestat sense el qual aquesta tesi (i la meva subsistència) no hauria estat possible.

Agrair als meus directors de tesi, l'Elvira i en Jose, l'oportunitat que hem vareu donar de poder realitzar el doctorat aquí a Lleida. Agrair-vos també tot el que m'heu ensenyat d'aquest món de la ciència i espero que tot i el temps i la distància puguem continuar estant en contacte.

A l'Anna (Cardús) per tota l'ajuda prestada al llarg d'aquests anys que hem estat juntes. Recordes al principi quan el grup d'investigació de Nefro només érem nosaltres dues i la *jefa*? Tu ja saps que per a mi ets més que una companya de feina, ets un exemple a seguir!!!

A la resta de les components del grup de Nefro: la Sara, la Petya, la Milica i la Montse. Us agraeixo molt tota l'ajuda que m'heu donat al llarg de tot aquest temps (sobretot quan baixàvem a les rates) i els bons moments que hem passat juntes. Gràcies també a la Núria E. i la Rosa per tot el que hem compartit. Sou les persones amb les que passo més temps al llarg del dia i dóna bo treballar amb totes vosaltres.

A l'Ana Martínez, perquè passi el que passi sempre escoltes els nostres dubtes i solucions els nostres problemes. També a totes les de la Unitat Docent: la Carme (la Dotora), la Tresa, la Mariajo, la Silvia, la Maria, la Montse i l'Eli moltes gràcies per aquests anys de companyia.

A la resta dels membres del laboratori del IRBLleida (sobretot a la Núria B., la Maya, la Mònica, el Jiseng, l'Esteban, l'Annabel, l'Ana (Madris)

i la Dolors, el Xavi, el Mario, l'Andree, el Carles, la Judith, el Dani i la Marta) perquè sempre que he necessitat ajuda m'he l'heu donada. Gràcies també a la Mari i la Yolanda pel vostre suport amb el microscopi confocal just abans de que marxéssiu cap als EUA. Al Manu i la Silvi per tot el que m'heu ensenyat sobre les noves tecnologies, estar amb vosaltres significa passar una estona superdivertida.

A la Roser i el Manolo de l'estabulari perquè ja sabeu que ho passo malament treballant amb les rates i sempre heu estat aquí pel que convingués. A la Dr. Ibarz del laboratori de bioquímica de l'hospital per l'ajuda en tots els anàlisis de les mostres de sang i orina.

Al grup del Dr. Mariano Rodríguez de l'Hospital Universitari Reina Sofia de Córdoba, en especial a la Sagra i la Yolanda per ensenyar-me a extreure paratiroides de rata i pels experiments d'incubació de les glàndules.

Al Dr. Joe Satriano del VA de San Diego per haver-me acollit durant 4 mesos al seu laboratori i per haver-me introduït en el, per mi desconegut, món de les poliamines. Gràcies també a tot el grup d'espanyols que ens treien el divendres de casa i ens varen mostrar els encants del sud de California.

A la Cristina per totes les hores compartides dins i fora el laboratori i per totes les xafarderies que encara ens hem d'explicar. A les Maries, que a pesar de tot encara trobem temps per quedar de tant en tant.

A tots els de la colla: el Jaume, el Pere i l'Aïda, el Guiu, el Blanco, el Roi, l'Enric i la Mar (que casi sou de la família), la Ingrid i el Josep M., els nois d'Alfarràs, el Manolito (encara que ens hagi deixat sempre pensarem en tu) i sobretot a la Laura, l'Ester, la Laia i la Imma perquè des de ben petits hem compartit moltes coses i sempre esteu aquí per qualsevol cosa. Nenes trobaré molt a faltar els divendres al bar del poble per explicar-nos les misèries!!!

A en David perquè després de tan de temps encara m'aguantes. Segurament sense tu ara no estaria escrivint aquestes paraules perquè ja ho hauria engegat tot a rodar. Espero que puguem compartir encara moltes coses i entre elles la passió pel que fem. Al Pepito i la Maria perquè també heu hagut de patir que ens dediquéssim a la ciència.

I finalment i de tot cor a la meva família, a la Pilarín i al Vieo, que heu pencat tota la vida i us heu estat de moltes coses perquè nosaltres puguem treballar del que ens agrada. A la Inés perquè encara que de petita t'havia de pujar amb mi a la bici sempre has estat la persona que he tingut més a prop. Al Josep perquè sense el teu sentit de l'humor la vida seria més gris. A l'Anna que sempre tens alguna història del Fonta per amenitzar les vetllades. Al Jordi que tot i que sempre seràs el petit de casa t'has convertit en una gran persona. Al Xavi, la Susanna i el Sergi que ja sou com de casa (encara que l'únic que té papers per demostrar-ho és el Xavi), sense vosaltres no ens ho passaríem tan bé els diumenges. I al Genís (l'hereu) que ha fet possible una nova generació de Parisís.

Gràcies també a qualsevol que m'hagi pogut oblidar amb les presses.

Moltes gràcies a tots.

El que és important és no deixar de fer-se preguntes

Albert Einstein

Resums

Els receptors d'N-metil-D-aspartat (NMDAR) són receptors tetramèrics que funcionen com a canals de calci de membrana i han estat àmpliament estudiats en el sistema nerviós central. Tanmateix, es coneix molt poc sobre els NMDAR en altres teixits. La presència del receptor ha estat detectada també en els principals òrgans responsables de l'homeòstasi del calci, el ronyó i l'os, indicant un possible paper del NMDAR en la seva regulació. La glàndula paratiroides és un dels òrgans més importants en el control dels nivells de calci sistèmic, cosa que indueix a pensar que el NMDAR pot estar present en aquesta glàndula on podria tenir un possible paper en la regulació de la síntesi i secreció de l'hormona paratiroidal (PTH).

Per tot això, varem voler determinar l'existència del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides i el seu paper en la regulació de la PTH, ja sigui directament (en la mateixa glàndula) o indirectament (a través de l'activació del receptor en el ronyó i el control de la síntesi de la forma activa de la vitamina D, la 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃).

La presència del receptor en la glàndula paratiroides va ser determinada per PCR a temps real, western blot i immunohistoquímica. Per tal d'analitzar l'efecte de l'activació del receptor en la secreció de PTH, animals sans van ser tractats amb l'agonista del receptor, l'àcid N-metil-D-aspartat (NMDA) on varem veure una baixada en els nivells de PTH en sang 15 minuts després del tractament. A més, en glàndules paratiroides d'animals normals incubades en baixa concentració de calci varem veure que la secreció de PTH es veia clarament inhibida quan afegim NMDA al medi. En animals amb hiperparatiroidisme secundari (HTP2) no s'aprecien diferències en els nivells de PTH ni en el tractament dels animals ni en la incubació de les seves glàndules paratiroides degut a una baixada en l'expressió del NMDAR1.

En tractaments a més llarg termini (4 dies) en canvi, els efectes en la secreció de PTH són els inversos. L'activació del NMDAR en el ronyó provoca un descens en la síntesi de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ degut a una inhibició de la 1 α hidroxilasa, principal enzim responsable de la síntesi de la forma activa de la vitamina D. Els nivells baixos de vitamina D provoquen un augment en la síntesi i secreció de PTH que indueixen diüresis, natriüresis, canvis en l'excreció urinària de calci i fòsfor, a més d'un augment en la resorció òssia.

Els nostres resultats demostren, per tant, que el receptor de NMDA es troba present en la glàndula paratiroides i està involucrat en la regulació de la secreció de PTH. En tractaments curts el receptor present en la glàndula paratiroides provoca una inhibició de la secreció, en canvi, a llarg termini, l'activació del receptor de NMDA en el ronyó causa un augment en la síntesi i secreció de PTH degut al descens en els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que preval sobre l'efecte directe del NMDAR en la glàndula paratiroides.

Los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) son receptores tetraméricos que funcionan como canales de calcio de membrana y han sido ampliamente estudiados en el sistema nervioso central. Sin embargo, poco se conoce sobre los NMDAR en otros tejidos. La presencia del receptor ha sido detectada también en los principales órganos responsables de la homeostasis del calcio, el riñón y el hueso, indicando así un posible papel del NMDAR en su regulación. La glándula paratiroidea es uno de los órganos más importantes en el control de los niveles de calcio sistémico, cosa que induce a pensar que el NMDAR puede estar presente en esta glándula donde podría tener un posible papel en la regulación de la síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH).

Por consiguiente, quisimos determinar la existencia del receptor de NMDA en la glándula paratiroidea y su papel en la regulación de la PTH, ya sea directamente (en la misma glándula) o indirectamente (a través de la activación del receptor en el riñón y el control de la síntesis de la forma activa de la vitamina D, la 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃).

La presencia del receptor en la glándula paratiroidea fue determinada por PCR a tiempo real, western blot e inmunohistoquímica. Para analizar el efecto de la activación del receptor en la secreción de PTH, animales sanos fueron tratados con el agonista del receptor, el ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) donde vimos una bajada en los niveles de PTH en sangre 15 minutos después del tratamiento. Además, en glándulas paratiroides de animales normales incubadas en baja concentración de calcio observamos que la secreción de PTH se veía claramente inhibida cuando añadíamos NMDA al medio. En animales con hiperparatiroidismo secundario (HTP2) no se apreciaban diferencias en los niveles de PTH ni en el tratamiento de los animales ni en la incubación de sus glándulas paratiroides debido a una bajada en la expresión del NMDAR1.

En tratamientos a más largo termino (4 días) en cambio, los efectos en la secreción de PTH son los contrarios. La activación del NMDAR en el riñón provoca un descenso en la síntesis de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ debido a una inhibición de la 1α hidroxilasa, principal enzima responsable de la síntesis de la forma activa de la vitamina D. Los bajos niveles de vitamina D provocan un aumento en la síntesis y secreción de PTH que inducen diuresis, natriuresis, cambios en la excreción urinaria de calcio y fósforo, además de un aumento en la resorción ósea.

Nuestros resultados demuestran, por lo tanto, que el receptor de NMDA se encuentra en la glándula paratiroidea y que está involucrado en la regulación de la secreción de PTH. En tratamientos cortos el receptor presente en la glándula paratiroidea provoca una inhibición de la secreción, en cambio, a largo termino, la activación del NMDAR en el riñón causa un aumento en la síntesis y secreción de PTH debido al descenso en los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que prevalecen sobre el efecto directo del NMDAR en la glándula paratiroidea.

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) are tetrameric aminoacid receptors which act as membrane calcium channels and have been extensively studied in the central nervous system. However, little is known about the NMDAR in other tissues. The presence of the receptor has been also detected in the principal organs responsible for calcium homeostasis, kidney and bone, showing a possible role of the receptor in its regulation. Parathyroid gland is one important organ in the control of systemic calcium, thus, the NMDAR could be present in this parathyroid gland and have a role in parathyroid hormone (PTH) synthesis and release.

For these reasons, we wanted to determine the presence of the NMDAR in the parathyroid gland and their role on PTH release control, whether it is directly (in the gland itself) or indirectly (by activation of the kidney receptor and control of the synthesis of the vitamin D biologically active metabolite, 1,25-dihydroxivitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃).

The presence of the receptor was determined in normal parathyroid glands by real-time PCR, western blot and immunohistochemistry. To analyze the receptor activation effect on PTH release, healthy animals were treated with the receptor agonist, acid N-methyl-D-aspartate (NMDA), where we saw a decrease on PTH blood levels 15 minutes after the treatment. Moreover, rat parathyroid glands incubated in low calcium showed a decrease on PTH release when NMDA was added to the media. In 2HTP animals we did not appreciate differences on PTH levels neither in the animal treatment nor in the incubation of their parathyroid glands because of 2HTP animals showed a downregulation of the NMDAR1 expression.

However, in long term treatments (4 days) the effect on PTH release are the opposite. NMDAR activation in kidney cause a decrease on 1,25(OH)₂D₃ levels due to an inhibition of 1 α hydroxilase activity, main enzyme responsible of the synthesis of the vitamin D active form. Low

vitamin D levels cause an increase on PTH synthesis and release that induce diuresis, natriuresis, changes in calcium and phosphorous urinary excretion, in addition to an increase in bone turnover.

Our results show, in conclusion, that NMDA receptor is present in the parathyroid gland and is involved on PTH release regulation. In short treatments, activation of the receptor in the parathyroid gland cause an inhibition of PTH release, however, in long term treatments the activation of kidney receptors induce an increase on PTH synthesis and release through the descend on $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ that prevail over the direct effect of NMDAR on the parathyroid gland.

Índex

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	5
1. L'HORMONA PARATIROÏDAL	7
1.1. Síntesi, regulació i funcions de la PTH	8
1.1.1 Glàndules paratiroides	8
1.1.2 Síntesi de la PTH	9
1.1.3. Control de la síntesi i secreció de la PTH	10
1.1.4. PTH-related peptide (PTHrP)	13
1.1.5. Receptors de PTH	14
1.1.6. Accions de la PTH	16
1.2. Vitamina D	17
1.2.1. Biosíntesis de la vitamina D	18
1.2.2. VDR	20
1.2.3. Funcions de la vitamina D	21
1.3. Hiperparatiroidisme	22
1.3.1. Malaltia renal crònica	23
1.4. Efectes renals de la PTH	24
1.4.1. Filtració Glomerular (FG)	24
1.4.2. Reabsorció tubular	25
1.4.3. Retroalimentació tubulo-glomerular	29
1.4.4. Paper de la PTH en la reabsorció tubular	29
2. EL RECEPTOR D'N-METIL-D-ASPARTAT	30
2.1. Estructura i regulació dels receptors de NMDA	31
2.1.1. Receptors ionotròpics de glutamat	31
2.1.2. Estructura del receptors de NMDA	32
2.1.3. Activació del receptor	35
2.1.4. Agonistes i antagonistes del receptor	37
2.2. Funcions del receptor de NMDA	38
2.2.1. Vies de les MAPK	39
2.2.2. Òxid nítric (NO)	41
2.3. El receptor de NMDA fora del SNC	42
2.3.1. NMDAR a l'os	44
2.3.2. NMDAR al ronyó	45

OBJECTIUS	47
MATERIALS i MÈTODES	51
1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	53
1.1. Consideracions prèvies	53
1.2. Animals i tractaments	53
1.2.1. Inducció del Fracàs Renal Crònic	54
1.2.2. Inducció de la hipocalcèmia	55
1.2.3. Inducció de la isquèmia	55
2. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES	56
2.1. Obtenció de mostres: sèrum i orina	56
2.1.1. Tractaments a curt termini	56
2.1.2. Tractaments a llarg termini (4 dies)	56
2.2. Anàlisis bioquímics	57
2.2.1. Mesura de la concentració d'ions en sèrum i orina	57
2.2.2. Mesura de la concentració de PTH en sèrum	58
2.2.3. Mesura de la resorció òssia: determinació de fragments sèrics de col·lagen tipus I	58
2.2.4. Mesura de la formació d'os: determinació d'osteocalcina en el sèrum	59
2.2.5. Mesura dels nivells sèrics de 1,25-Dihidroxivitamina D	60
2.2.6. Mesura de nivells de N-Acetyl- β -D-glucosaminidasa (NAG)	61
2.2.7. Mesura de l'activitat de la Gamma-glutamilttransferasa (γ -GT)	62
3. ESTUDIS EN TEIXITS	63
3.1. Obtenció i emmagatzematge de les mostres	63
3.2. Amplificació en cadena de la polimerasa (PCR)	64
3.2.1. Extracció de RNA	64
3.2.2. Síntesi de cDNA	64
3.2.3. PCR	64
3.2.4. RT-PCR	66
3.3. Western Blot	67
3.3.1. Extracció de la proteïna	67
3.3.2. Electroforesi i transferència	67
3.3.3. Hibridacions i revelat	68

3.3.4. Immunoprecipitació	68
3.4. Microscòpia òptica	69
3.4.1. Preparació de les mostres	69
3.4.2. Tinció hematoxilina eosina	69
3.5. Immunohistoquímica	70
3.5.1. Preparació de la mostra	70
3.5.2. Hibridacions específiques	70
3.5.3. Mecanisme d'acció del <i>Vectastain ABC kit</i>	71
3.6. Microscòpia electrònica	71
4. ESTUDIS EX VIVO EN GLÀNDULES PARATIROIDES	72
4.1. Obtenció de les glàndules paratiroides	72
4.2. Incubació en medi iònic	73
4.2.1. Mesura de la PTH	74
4.3. RT-PCR	74
5. CULTIUS CEL·LULARS	74
5.1. Línia cel·lular HK-2	74
5.1.1. Manteniment de la línia cel·lular	75
5.1.2 Recollida de mostres	75
5.2. Mètode del Fluo-4	75
5.3. Producció de 1,25-hidroxivitamina D₃	76
5.4. Anàlisi MTT	76
5.5. Cultius en 3 dimensions	77
6. ESTUDI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS	77
RESULTATS	79
1. EL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA	
PARATIROIDES	81
1.1. Presència del NMDAR en la glàndula paratiroides	81
1.2. Paper de l'activació del NMDAR en el control de la	
secreció de PTH	82
1.2.1. Incubació de glàndules paratiroides	83
1.2.2. Tractaments amb NMDA en rates	85

1.3. Activació del NMDAR en models animals amb PTH	
Elevada	86
1.3.1. Animals amb MRC	86
1.3.2. Animals hipocalcèmics	87
2. EL RECEPTOR DE NMDA EN EL RONYÓ	88
2.1. Experiments <i>in vitro</i>	89
2.1.1. NMDAR en les cèl·lules HK-2	89
2.1.2. Funcionalitat del NMDAR en les cèl·lules HK-2	89
2.1.3. Toxicitat del NMDA	91
2.1.4. Nivells de vitamina	92
2.2. Experiments <i>in vivo</i>	94
2.2.1. NMDAR en el ronyó	94
2.2.2. És el NMDA tòxic per al ronyó?	94
2.2.3. Efectes de l'activació del NMDAR en els nivells de PTH	96
2.2.4. Efectes de l'activació del NMDAR en el funcionament renal	97
2.2.5. Diüresis i natriüresis	99
2.2.6. Calci i fòsfor	102
DISCUSSIÓ	103
1. EL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA	
PARATIROIDES	105
2. ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA	
PARATIROIDES	107
3. ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR DE NMDA EN EL RONYÓ	112
3.1. Efectes d'una PTH elevada	115
CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAFIA	125
ANNEX	147

Abreviatures

- 1,25(OH)2D3: 1,25-dihidroxivitamina D3
- AA: Àcid araquidònic
- ADH: Hormona antidiürètica
- AMPA: àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionat
- AMPc: *Cyclic adenosine monophosphate*
- BSC-1: *Bumetadine-sensitive cotransporter type I*
- CaSR: *Calcium-Sensing Receptor*
- cDNA: Àcid desoxiribonucleic complementari
- CLCNKB: *Chloride channel Kidney b*
- cPLA: Fosfolipasa A cíclica
- DBP: Proteïna lligadora de vitamina D
- DMSO: Dimetil sulfòxid
- dNTP: Desoxiribonucleòtid trifosfat
- EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic
- EEM: Error estàndard de la mitja
- ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*
- EU: Excreció urinària
- FG: Filtració glomerular
- FGF23: Factor de creixement fibroblàstic 23 (*Fibroblastic growth factor 23*)
- γ -GT: Gamma-glutamilttransferasa
- HPT2: Hiperparatiroidisme secundari
- MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
- MRC: Malaltia renal crònica
- mRNA: Àcid ribonucleic missatger
- MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
- NAG: N-Acethyl- β -D-glucosaminidasa
- NCX1: Intercanviador basolateral de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*Na/Ca exchanger type 1*)
- NF- κ B: Factor nuclear kappa B
- NHE3: Intercanviador apical de Na^+/H^+ (*Na/H exchanger type 3*)

NMDA: N-metil-D-aspartat

NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartat

NO: Òxid nítric

NOS: Òxid nítric sintasa

NPT2: *Na-P_i cotransporter isoform 2*

PBS: Tampó fosfat

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PKC: Fosfoquinasa C

PMCA: Bomba de calci de membrana plasmàtica

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PSD-95: *Post-synaptic density protein 95*

PTH: Hormona paratiroidal

PTHR1: Receptor de PTH/PTHrP

PTHrP: *PTH related peptide*

RANK: *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*

RANK: Lligand de RANK

RNA: Àcid ribonucleic

ROMK: *Renal Outer Medullary Potassium channel*

ROS: substàncies reactives d'oxigen

RT-PCR: Reacció en cadena de la polimerasa a temps real

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

sFRP-4: *Soluble Frizzled-related Protein-4*

SNC: Sistema nerviós central

STC-1: *Stanniocalcin-1*

TGF: Retroalimentació tubulo-glomerular (*Tubulo-glomerular feedback*)

TMB: Tetrametilbenzidina

TRPV: *Transient receptor potential vanilloid*

VDR: Receptor de vitamina D

Introducció

1. L'HORMONA PARATIROÏDAL

L'hormona paratiroïdal (PTH) juntament amb la vitamina D (la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és la seva forma activa) són els principals responsables de la regulació del nivells del calci sistèmic (figura 1). El calci és un factor crític en la regulació del senyal intracel·lular de nombroses hormones, de la coagulació i de la funció muscular; per tant, la concentració de calci plasmàtic, específicament del calci ionitzat (Ca^{2+}), està altament controlada.

L'homeòstasi del calci es regulada a nivell de l'intestí prim (amb canvis en la seva absorció), a l'esquelet (on es controla la reabsorció i la deposició a l'os) i al ronyó (on la reabsorció tubular del calci filtrat està altament regulada). Així quan els nivells sèrics de calci estan disminuïts,

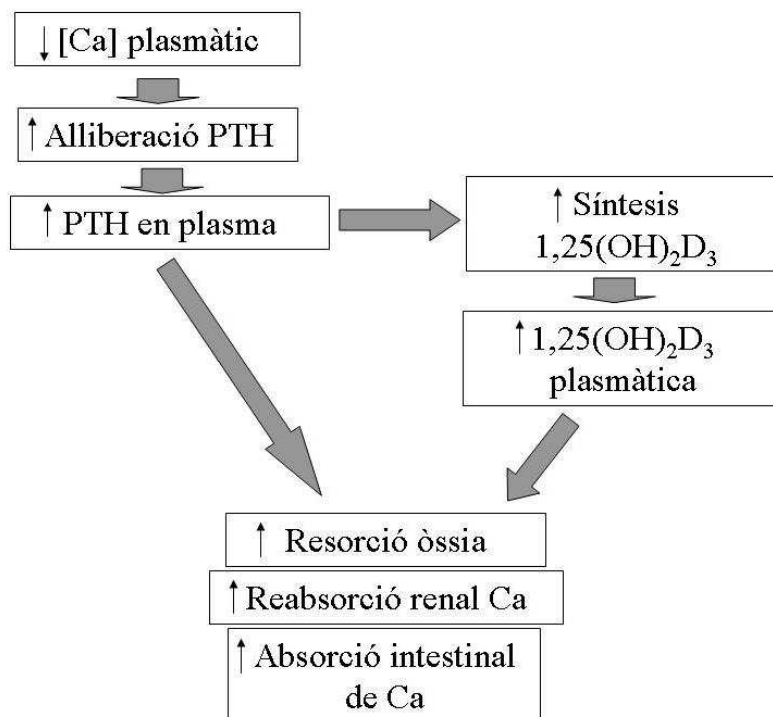


Figura 1. Regulació del calci plasmàtic. Els principals responsables del manteniment del Ca^{2+} en el plasma són la PTH i la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (forma activa de la vitamina D).

s'activa el sensor de calci (CaSR) i es produeix un alliberament de PTH que activa la síntesi de vitamina D. La PTH disminueix l'excreció urinària de calci i augmenta la resorció òssia. La vitamina D en canvi, provoca un increment en l'absorció de Ca^{2+} a l'intestí i intervé també en la resorció òssia. D'aquesta manera, l'acció conjunta de les dues hormones normalitza els nivells plasmàtics de calci.

1.1. Síntesi, regulació i funcions de la PTH

Així com la vitamina D assegura la reserva de calci en l'organisme, la PTH regula la seva distribució. A més, la PTH també regula el fòsfor i els metabòlits actius de la vitamina D en la sang així com en l'activitat cel·lular de l'os. És un component essencial d'interacció entre el ronyó, l'os i l'intestí que exerceix un control molt estricte sobre els nivells de Ca^{2+} extracel·lular.

1.1.1 Glàndules paratiroides

Les glàndules paratiroides són glàndules endocrines situades al coll. En l'esser humà hi ha, generalment, quatre glàndules paratiroides que es troben immediatament darrera cada un dels pols superior i inferior de la glàndula tiroides. Cada glàndula paratiroides mesura uns 3 mm de llarg, 3 mm d'ample i 2 mm de gruix; el seu aspecte macroscòpic és el d'un teixit greixós de color castany cosa que dificulta la seva diferenciació de la glàndula tiroides. En la rata però, només hi ha dues glàndules paratiroides situades també a la part superior de la tiroides.

En l'esser humà adult, la paratiroides conté cèl·lules principals i cèl·lules oxífilies, però en molts animals així com en els nens no existeixen aquestes cèl·lules oxífilies. Les cèl·lules principals produeixen l'hormona paratiroidal. La funció de les cèl·lules oxífilies no està clara, encara que es creu que són cèl·lules principals modificades o buides que ja no secreten més hormona [75].

1.1.2. Síntesi de la PTH

La PTH dels mamífers és una cadena polipeptídica de 84 aminoàcids la seqüència de la qual va ser establida per primera vegada el 1970 en hormona bovina altament purificada [147]. La PTH intacta, que posteriorment serà secretada, es sintetitzada com un precursor de curta vida mitja, la preproPTH (figura 2). Aquest precursor conté una seqüència N-terminal de 25 residus, rica en aminoàcids hidrofòbics, que serà tallada durant la traducció alliberant la proPTH a la llum del reticle endoplasmàtic rugós. La proPTH es posteriorment processada a l'aparell de Golgi (s'eliminen 6 aminoàcids més) donant lloc a la forma madura de l'hormona (amb els aminoàcids 1-84): és la PTH o PTH intacta.

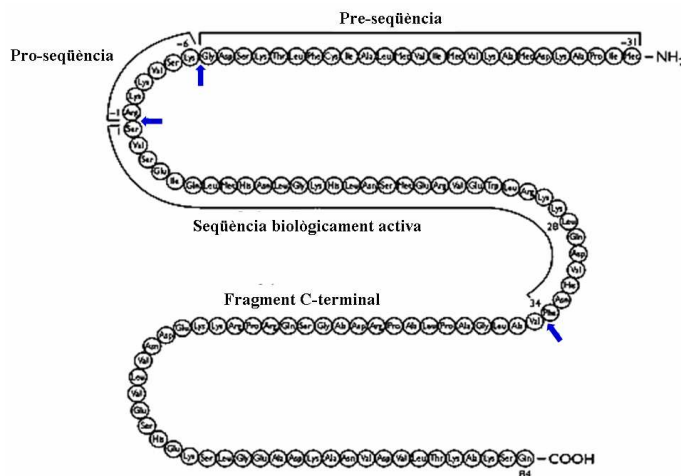


Figura 2. Estructura de la preproPTH. Un cop sintetitzada l'hormona pateix una sèrie de talls proteolítics (25 i 6 residus d'aminoàcids respectivament) que la transformen en la forma biològicament activa de l'hormona. Adaptat de Nussey *et al*, 2001 [149].

Aquestes dues seqüències que s'eliminen són necessàries tant pel transport específic a reticle endoplasmàtic com per a la correcta obtenció de la forma madura de l'hormona. La seqüència conté també un extrem C-terminal que pot tenir un possible paper en assegurar el processament i el

transport de l'hormona cap a l'aparell secretor de la paratiroides [140]. La PTH és llavors emmagatzemada dins els grànuls secretors del citoplasma fins la seva alliberació.

Una vegada en la circulació pateix més talls proteolítics que donen lloc a fragments que contenen la regió N-terminal (1-34), la regió mitja (44-48) o la regió C-terminal (53-84). La PTH intacta i la N-terminal (1-34) tenen funcions en el ronyó però només la 1-34 és capaç d'exercir accions biològiques sobre l'esquelet. De fet, la major part de les accions biològiques de la PTH són a través de la unió dels residus N-terminals de l'hormona (regió 1-34) amb els seus receptors.

1.1.3. Control de la síntesi i secreció de la PTH

Els nivells de PTH són regulats per diferents factors tals com el Ca^{2+} que regula la PTH a través del CaSR; el fòsfor (P) que activa la seva secreció; la vitamina D a través del seu receptor, el VDR (*vitamin D receptor*); i el FGF 23 (*fibroblast growth factor 23*) que juntament amb el seu cofactor klotho inhibeix la síntesi i secreció de la PTH. Tot i això, és impossible de separar els efectes de la hiperfosfatèmia, dels descensos de Ca^{2+} i vitamina D i de l'acció del FGF 23.

1.1.3.1. Calci

La hipocalcèmia incrementa la secreció de PTH a curt termini, els nivells de mRNA de PTH en hores i dies, i el nombre de cèl·lules paratiroidals si l'estimulació és prolongada [132,145]. La cèl·lula paratiroidal reconeix canvis en el Ca^{2+} a través d'un receptor de calci de membrana, el CaSR. El CaSR és un receptor associat a proteïna G que és sensible a diferents ions com l'ió calci [33]. Quan els nivells de Ca^{2+} en el sèrum són elevats s'activa el CaSR i es desencadena la seva cascada de senyalització (figura 3). S'activa la fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC),

seguida d'una mobilització del Ca^{2+} intracel·lular, una activació de la proteinquinasa C (PKC) i com a resultat una estimulació a través de PKC de la cascada de les *mitogen-activating protein kinase* (MAPK). Les MAPK actives fosforilen i activen la fosfolipasa A cíclica (cPLA₂), que allibera àcid araquidònic (AA) que es metabolitza en els seus mediadors biològicament actius que suprimeixen la secreció de PTH [179].

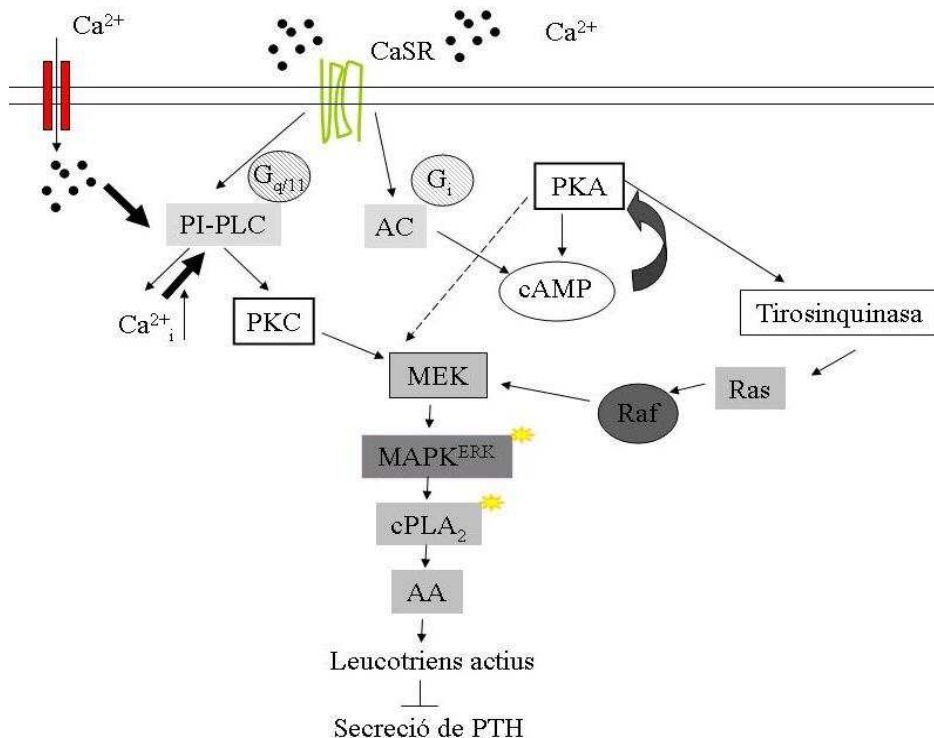


Figura 3. Regulació de la secreció de PTH pel CaSR. L'augment de calci extracel·lular provoca l'activació del CaSR i la conseqüent activació de la fosfolipasa C (PLC) i la via de les MAPK que a través de la fosfolipasa A cíclica (cPLA) i l'àcid araquidònic (AA) inhibeixen la secreció de PTH. L'augment del calci intracel·lular activa la via de la mateixa manera que el CaSR.

Aquesta via pot ser modulada també per un increment en la concentració del calci intracel·lular provinent dels compartiments intracel·lulars o de l'exterior activant-se així la cPLA₂ seguida per un

alliberament d'AA. Aquest mecanisme ens indica l'important rol del calci intracel·lular com a mediador de la inhibició de la secreció de PTH [4].

1.1.3.2. Fòsfor

L'efecte del fòsfor com a regulador de la secreció de PTH ha estat sobradament demostrat en diversos estudis [5,101,180] on s'ha vist que un augment del fòsfor plasmàtic actua potenciant la secreció de PTH, la seva expressió gènica i la proliferació cel·lular en la glàndula paratiroides. A més a més s'ha clonat un cotransportador de membrana de fosfat en la cèl·lula paratiroidal [187] que podria ser un possible sensor de fosfat d'aquesta cèl·lula [131]. A més de l'acció directa que pugui tenir el fòsfor sobre la glàndula paratiroides també inhibeix la síntesi de la forma activa de la vitamina D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a través del FGF23 [16,105] estimulants així també la síntesi i secreció de PTH.

1.1.3.3. FGF 23

El FGF 23 és una proteïna d'aproximadament 26 KDa membre de la família dels FGF (*fibroblast growth factors*). El FGF 23 actua sobre les seves cèl·lules diana conjuntament amb el seu cofactor Klotho. La proteïna Klotho és una proteïna de membrana de la família de les glicosidases que s'expressa en les cèl·lules del ronyó, en el plexe coroïdal del cervell i en les cèl·lules principals de la glàndula paratiroides [190]. El FGF 23 és una de les molècules més importants en la regulació de la reabsorció del fòsfor a nivell renal, ja que promou la fosfatúria [177]. També s'han vist els seus efectes sobre la inhibició de la síntesi de vitamina D [16,105,166]. A part de la seva acció indirecta (a través del fòsfor i la vitamina D), recentment s'han vist efectes directes del FGF 23 en la regulació de la síntesi i secreció de PTH [117] amb un possible paper inhibitori.

1.1.3.4. Vitamina D

La Vitamina D, concretament la seva forma biològicament activa la 1,25(OH)₂D₃, actua a través del seu receptor, el VDR, inhibint la síntesi de PTH. El VDR actua com un factor de transcripció activat per lligand, així quan augmenten els nivells sèrics de vitamina D aquest s'uneix al seu receptor que es transloca al nucli i inhibeix la síntesi de la PTH [58].

A més a més, la deficiència de vitamina D provoca una hiperplàsia de la glàndula paratiroides i un increment de la síntesi i secreció de PTH. L'administració de 1,25(OH)₂D₃ inhibeix la síntesi de PTH i el creixement cel·lular, per això aquest compost s'usa com a tractament per l'hiperparatiroidisme secundari [8,66,181].

1.1.4. PTH-related peptide (PTHrP)

El PTRrP va ser originàriament descobert per ser el factor responsable de la síndrome hipercalcèmica humoral maligna [34,135,184]. Aviat es va descobrir que es produïa i secretava tant en cèl·lules sanes com malignes [157]. Al contrari que la PTH, el PTHrP es troba en nombrosos teixits fetals i adults no malignes on actua com a regulador del creixement d'aquests òrgans i cèl·lules, del seu desenvolupament, migració, proliferació, i supervivència; així com del transport epitelial de l'ió calci [157].

El PTHrP comparteix molta homologia estructural amb la PTH (sobretot en els primers aminoàcids de la cadena peptídica) i algunes funcions estan superposades, ja que utilitzen el mateix receptor lligat a proteïna G, el receptor de PTH/PTHrP (PTHR1). Es creu que tant la PTH com el PTHrP tenen un ancestre comú degut a les homologies en la regió de la seqüència aminoterminal, l'organització dels gens que codifiquen per les dues molècules i l'estructura dels exons que codifiquen per una part del precursor del pèptid [159].

Endemés, ambdues molècules tenen l'os com a principal teixit diana: el PTHrP es vital durant l'embriogènesi en la regulació de la formació òssia, en canvi la PTH, possiblement l'últim pas evolutiu en arribar, té com a principal funció fisiològica la de mobilitzar el calci de l'os en l'adult com a part en la seva protecció en l'homeòstasi del calci [94].

1.1.5. Receptors de PTH

La major part de les accions que realitzen tant la PTH com el PTHrP es duen a terme a través d'un receptor de membrana, el receptor de PTH/PTHrP (PTHR1), que es localitza en els teixits essencials en la regulació de l'homeòstasi dels ions minerals, el ronyó i l'os. D'aquesta manera a través del PTHR1, la PTH estimula la reabsorció de calci en la nefrona distal, inhibeix la reabsorció de fosfat i bicarbonat al túbul proximal i potencia la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en les cèl·lules tubulo-proximals.

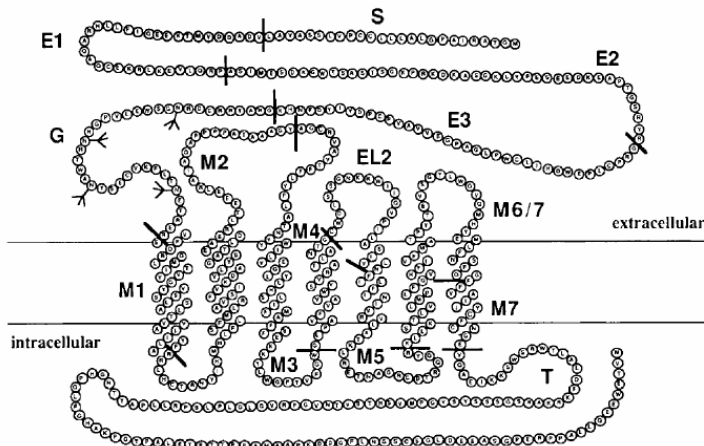


Figura 4. Representació esquemàtica del receptor de PTH/PTHrP (PTHR1). La regió aminoterminal del receptor es troba a l'exterior de la cèl·lula. Les barres indiquen els límits entre els diferents exons codificants (14 exons diferents); l'exó S és el possible pèptid senyal. Adaptat de Jüppner *et al*, 2000.

El PTHR1 pertany a la família de receptors associats a proteïna G [159]. El receptor posseeix un llarg domini a l'extrem aminoterminal que és crític per la unió a lligands tals com la PTH, és l'anomenat domini N. L'altra part del receptor és el domini J, que inclou una porció del receptor que conté 7 hèlixs transmembrana, els diversos *loops* que les connecten i un llarg domini intracel·lular final (figura 4). Aquest domini J és la porció funcional del receptor. La porció carboxi-terminal del lligand PTH s'uneix al domini N del receptor i proporciona una zona d'ancoratge que fa possible la feble unió (que sinó no es realitzaria) del domini aminoterminal del lligand amb el domini J del receptor.

La porció aminoterminal de la PTH interacciona amb els residus del domini J del receptor induint el seu canvi conformacional, llavors el receptor s'uneix a proteïna G i així comença la cascada de segons missatgers específics de l'hormona en les cèl·lules diana.

El receptor té moltes vies d'acció, incloent la més prominent de totes, la dependent de proteïna G, també genera AMPc via l'adenil ciclase i inositol trifosfat, té acció sobre una protein kinasa C no dependent de fosfolipasa C, i provoca moviments de calci, almenys en certs tipus cel·lulars no dependents de la generació d'AMPc.

Existeix un segon tipus de receptor de PTH (PTHR2) que és idèntic en un 51% al PTHR1 i respon completament a la PTH però no (o molt pobra) al PTHrP [192]. Aquest PTHR2 s'expressa majoritàriament al cervell, al pàncrees, als testicles i a la placenta. Degut a la seva presència en el cervell es creu que pot tenir un paper en processos de regulació neuroendocrins, emocionals, d'audició i de dolor. La presència en òrgans fora el sistema nerviós central indica que podria estar relacionat en funcions endocrines, cardiovasculars i reproductives [193]. Malgrat tot encara es coneix poc sobre el seu paper fisiològic.

1.1.6. Accions de la PTH

La principal funció de la PTH és la de regular la distribució del calci total de l'organisme. Així quan s'allibera la PTH es duen a terme les seves accions més clàssiques:

- Promoure la síntesi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al ronyó incrementant així indirectament l'absorció intestinal de calci [63,67].
- Regular el transport renal de calci i fòsfor [136]. La PTH promou la fosfatúria bloquejant la reabsorció de fòsfor reduint l'expressió del cotransportador de sodi-fosfat NPT2. També treballa a parts del túbul distal del ronyó per tal de disminuir l'excreció de calci; en moments de deficiència de calci, la pèrdua d'aquest és menor perquè la PTH incrementa la seva reabsorció renal [186].
- Incrementar la resorció òssia [13,20,36]. La PTH afecta un gran nombre de cèl·lules òssies especialitzades, incloent osteoblasts i cèl·lules de l'estroma. També són importants les seves accions en els osteoclasts per tal de promoure la resorció òssia, encara que aquestes són indirectes a través de la seva acció sobre els osteoblasts.

A través dels diversos receptors de PTH presents als osteoblasts, la PTH té una gran varietat d'accions que estan directament involucrades en la promoció de formació òssia, tals com canvis en l'activitat de diverses proteïnes, incloent el factor de diferenciació osteoclastogènic (també conegut com a TRANCE), RANKL o el lligand d'osteoprotegerina [164,205]. El més important fisiològicament però, es la seva acció en l'estimulació de la diferenciació i el desenvolupament dels osteoclasts per finalment promoure la resorció òssia.

Altres accions determinades de l'hormona són els seus efectes sobre la proliferació de cèl·lules sanguínies i hepàtiques [167,201]; així com és

ben conegut l'efecte vasodilatador de la PTH a més de funcionar com a hipotensor en mamífers [123,175]. Tanmateix, la principal línia d'investigació és la relacionada amb el manteniment de l'os i el metabolisme iònic mineral.

Les diferents accions de la PTH, juntament amb la seva regulació, són mecanismes altament controlats on els factors que hi intervenen interaccionen entre ells d'una manera molt precisa per tal de regular els seus nivells en la quantitat adequada en cada ocasió (figura 5).

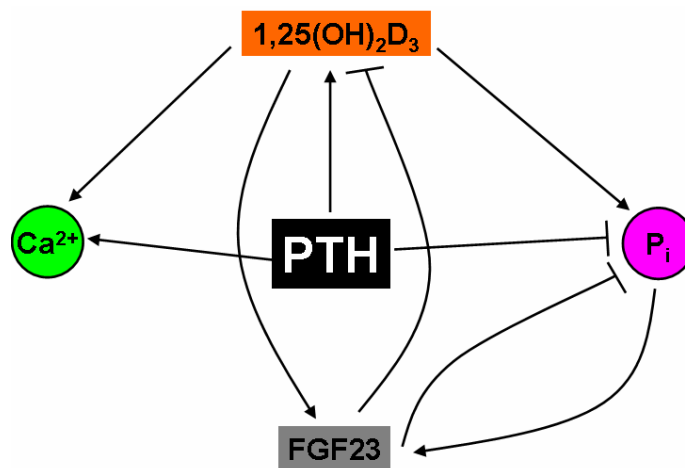


Figura 5. Efectes de la PTH. La PTH incrementa els nivells de calci de l'organisme ja sigui directament o a través de la 1,25(OH)₂D₃. Tant la PTH com la 1,25(OH)₂D₃ influeixen en el metabolisme del fòsfor (la PTH disminueix els seus nivells però la vitamina D els augmenta). El FGF23 al seu torn regula i es regulat per la vitamina D i el P_i.

1.2. Vitamina D

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, en el procés de control dels nivells del calci plasmàtic, juntament amb la PTH hi ha un factor humoral essencial: la vitamina D. La vitamina D és una hormona fonamental per la correcta absorció del calci i del fòsfor de la dieta. Com que intervé en la homeòstasi mineral, té un paper important en la formació i manteniment

de l'estructura òssia [148]. També se li han atribuït altres funcions relacionades amb la regulació del creixement, maduració i diferenciació cel·lular [74], la secreció hormonal [42] i la funció immune [114].

1.2.1. Biosíntesis de la vitamina D

La vitamina D pot provenir de la dieta o de l'acció de la llum del sol sobre la pell. Com a hormona esteroide deriva del colesterol, concretament del 7-dehidrocolesterol que per l'exposició de la pell a la radiació ultraviolada pateix la conversió fotolítica a vitamina D₃ [32]. Els metabòlits de la vitamina D són molècules lipofíliques amb molt baixa solubilitat en aigua, per tant un cop a la circulació sanguínia han de ser transportades per proteïnes plasmàtiques. La vitamina D generalment es transporta unida a una proteïna lligadora de vitamina D (DBP). La vitamina D en aquesta forma no té activitat biològica i per això necessita ser metabolitzada fins a la forma activa. Aquesta transformació es porta a terme en diferents passos: una primera hidroxilació té lloc al fetge on l'enzim mitocondrial 25-hidroxilasa produeix 25-hidroxivitamin D₃ (25(OH)D₃) a partir de la vitamina D (figura 6).

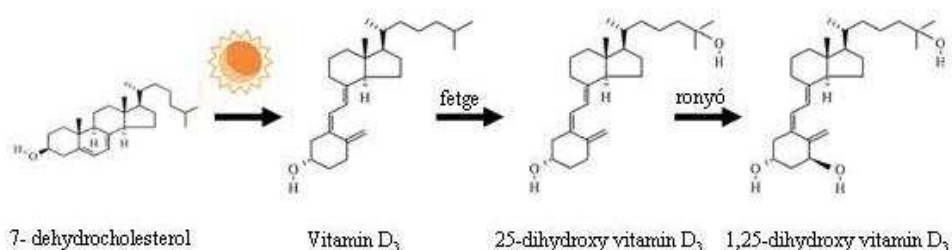


Figura 6. Síntesi de la vitamina D. El precursor de la vitamina D provinent de la dieta (D₂) o de la bioactivació del 7-dehidrocolesterol (D₃) per la radiació solar pateix una sèrie d'hidroxilacions per tal d'obtenir la forma activa de l'hormona. Adaptat de Dusso *et al.*, 2005 [58].

Aquest és el metabòlit circulant més abundant i té una llarga vida mitja, pel que es considera l'índex d'estatus nutricional en vitamina D (figura 6). A partir de la 25(OH)D₃ es forma la 1,25-hidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) que és la forma activa de la vitamina D, per l'acció de la 1 α -hidroxilasa [58].

Els nivells del metabòlit actiu de la vitamina D es regulen tant a nivell de síntesi com de degradació. En la degradació, l'enzim 24-hidroxilasa és responsable de la hidroxilació de la 25(OH)D₃ i de la 1,25(OH)₂D₃ per a formar 24,25(OH)₂D₃ i 1,24,25(OH)₂D₃, respectivament [163]. L'enzim 24-hidroxilasa s'expressa fonamentalment en el túbul renal, però la seva distribució tissular és molt àmplia. L'afinitat per la 1,25(OH)₂D₃ és major que per a la 25(OH)D₃, pel que es considera a l'enzim 24-hidroxilasa com un mecanisme per a eliminar l'excés de 1,25(OH)₂D₃, i per tant evitar la seva toxicitat [58]. Les hormones esteroides, com els metabòlits de la vitamina D, poden entrar dins les cèl·lules diana per difusió en la membrana plasmàtica per ser metabolitzats o exercir la seva acció biològica.

1.2.1.1. Regulació de la 1 α -hidroxilasa

Aquest enzim es troba fonamentalment en el ronyó, però s'han descrit altres llocs d'hidroxilació extra renal com en les cèl·lules endotelials [208], cèl·lules de la mucosa del colon [47], macròfags [2] i queratinòcits [85]. L'activitat d'aquest enzim mitocondrial està controlada per la pròpia 1,25(OH)₂D₃ que juntament amb la PTH, l'IFN- γ (interferó γ), l'IGF-I (Insulin-like growth factor 1) i la calcitonina incrementen l'acció de l'enzim, mentre que el calci, el fosfat i el FGF23 disminueixen l'activitat de la 1 α -hidroxilasa [26,163].

1.2.2. VDR

L'acció biològica de la vitamina D es duu a terme a través del seu propi receptor, el VDR. El VDR és un receptor nuclear membre de la superfamília de receptors de les hormones esteroidees/tiroidees. Com altres d'aquesta superfamília de receptors, el VDR actua com a factor de transcripció un cop se li ha unit la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. L'estructura bàsica del VDR (figura 7) consta de diverses regions ben definides que poden funcionar de forma autònoma. El domini d'unió al lligand és el responsable de la unió del receptor amb la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En l'extrem C-terminal observem el domini d'activació de la funció-2 (*Activation function-2*, AF-2). Aquest AF-2 és el responsable del canvi conformacional del VDR en unir-se el lligand. Canvi que és necessari per reclutar les proteïnes adequades per la translocació del receptor del citoplasma al nucli a través dels microtúbuls.

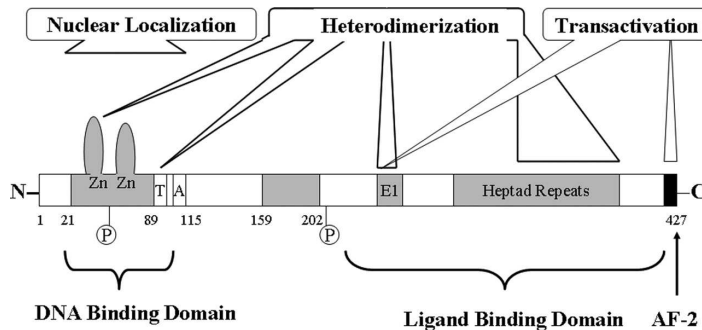


Figura 7. Dominis funcionals del receptor de la vitamin D (VDR): domini d'unió al DNA amb funció d'heterodimerització i localització nuclear; domini d'unió a lligand, també responsable de l'heterodimerització i de la transactivació del receptor. Adaptat de Dusso *et al.*, 2005 [58].

El domini més conservat en diferents espècies és el domini d'unió a DNA en la part N-terminal i que conté dos dits de zinc (complex tetraèdric format per 4 cisteïnes amb una molècula de zinc de manera que es crea un llaç o dit d'aminoàcids que estableixen la unió amb el DNA). El primer dit de zinc (pròxim a N-terminal) és el responsable de la unió del VDR amb els

promotors dels gens dependents de vitamina D, específicament en les seqüències anomenades elements de resposta de la vitamina D (*vitamin D response elements*, VDRE). El segon dit de zinc és, en canvi, el responsable de l'heterodimerització necessària amb el RXR (receptor de l'àcid cis-retinoic). Aquesta dimerització és un procés indispensable perquè el VDR adquireixi la conformació essencial d'alta afinitat al DNA i així exercir la seva funció transactivadora o transrepressora. Per dur a terme la seva funció, el receptor necessita interaccionar amb proteïnes nuclears coreguladores que donaran la modulació positiva o negativa de la transcripció.

1.2.3. Funcions de la vitamina D

La principal acció de la vitamina D és la del manteniment dels nivells de calci en l'organisme. Específicament, la vitamina D incrementa l'absorció de calci i fòsfor en el duodè proximal, promovent el pas a través de la vora en raspall a l'interior de la cèl·lula i la seva sortida per la membrana basolateral [83]. Com a regulador de la transcripció de proteïnes relacionades amb l'os, la vitamina D induïx l'expressió de proteïnes com l'osteocalcina i el RANKL, i suprimeix la síntesi de col·lagen tipus I i osteoprotegerina (proteïna que s'uneix al mateix receptor que RANKL inhibint la seva funció de promoure la osteoclastogènesi) [103]. Per tant, s'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro* que la vitamina D estimula la diferenciació dels osteoclasts i per tant, l'alliberament de calci i fòsfor.

Com ja hem comentat anteriorment, el sistema endocrí de la vitamina D és també un potent modulador de la funció paratiroidal (apartat 1.1.3.4.).

Pel que fa al ronyó, el principal efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és el control sobre la seva pròpia síntesi i degradació al inhibir la 1α -hidroxilasa i estimular l'expressió de la 24-hidroxilasa.

Posteriorment, s'ha observat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ té accions en altres òrgans diana com la pell, pàncrees, fetge, etc. Entre aquestes accions es troben la regulació de la proliferació i diferenciació cel·lular, així com la regulació de la secreció hormonal i de la funció immune. També existeixen estudis epidemiològics que demostren que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminueix el risc de càncer de colon [68,125], pit [68,169] i pròstata [120].

1.3. Hiperparatiroidisme

Si les glàndules paratiroides secreten massa hormona, ens trobem davant d'un hiperparatiroidisme primari (HPT1) on el balanç de calci es veu alterat. En el 85% dels casos l'HPT1 és causat per un tumor benigne (adenoma) format en una de les glàndules paratiroides, causant que aquesta sigui hiperactiva. En molts dels altres casos l'excés d'hormona prové d'una o més glàndules hipertrofiades (hiperplàsia). Molt rarament l'hiperparatiroidisme és causat per un càncer de la glàndula paratiroide.

L'hiperparatiroidisme és secundari (HPT2) quan l'augment de PTH és una resposta deguda, en la majoria dels casos, al canvis produïts per la malaltia renal crònica. L'HPT2 es causat per hiperplàsia i hipertròfia de les cèl·lules principals de la glàndula paratiroides. Molts trastorns poden causar HPT2:

- Trastorns en els nivells de vitamina D: deficiència, mala absorció o metabolisme anormal de l'hormona; raquitisme (osteomalàcia).
- Trastorns en el metabolisme de fòsfat: malnutrició, mala absorció, toxicitat per alumini, malaltia renal, alguns tipus de càncer, reducció de fòsfat (normalment causat per l'osteomalàcia).
- Deficiència de calci: insuficient aport de calci en la dieta, molta pèrdua de calci en l'orina.

- Malaltia renal crònica.

1.3.1. Malaltia renal crònica

La malaltia renal crònica (MRC) és la principal causa d'HPT2. És una síndrome clínica complexa que resulta del dany progressiu i permanent de l'estructura anatòmica renal. Això comporta la disminució de la funció renal que desenvolupa la malaltia clínica per retenció de substàncies que normalment serien excretades pels ronyons, pèrdua de substàncies que normalment són retingudes i respostes compensadores a la pèrdua de la funció. Endemés, hi ha una sèrie de desordres endocrins que també es manifesten en la MRC tals com la disfunció del les hormones sexuals, anormalitats de la glàndula tiroides, retràs en el creixement, desordres del metabolisme associats a hormones, trastorns de substàncies vasopressores, irregularitats en els pèptids gastrointestinals, osteodistròfia renal i anèmia [25].

Està àmpliament demostrat que els pacients amb MRC pateixen de HPT2: desordre funcional de les glàndules paratiroides, amb la conseqüent hipersecreció de PTH i la hiperplàsia de les glàndules [45]. Els pacients amb MRC pateixen aquesta malaltia per diferents causes: l'eliminació de fosfat es troba deteriorada, no es produeix vitamina D a causa de la desaparició del parènquima renal, l'absorció intestinal de calci és baixa i els nivells sanguinis de calci disminueixen [45]. Per tot això, l'HPT2 en la MRC és tractat amb suplementes de calci, restricció de fosfats i vitamina D. S'ha demostrat l'eficàcia de l'administració intravenosa i oral de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per suprimir el nivells de PTH en pacients amb HPT2 [8,66,181]. No obstant això, el potent efecte de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre l'absorció de calci i fòsfor dins l'intestí i sobre la mobilització dels mateixos en l'os produeix que el tractament amb vitamina D activa es compliqui amb la hipercalcèmia i la hiperfosfatèmia a dosis terapèutiques [52,162].

Per això, s'estan estudiant anàlegs de la vitamina D per al tractament del HPT2 que disminueixin les concentracions sèriques de PTH al mateix temps que elevin mínimament la calcèmia i la fosfatèmia.

1.4. Efectes renals de la PTH

Com ja hem anat comentant la PTH influeix en la reabsorció i excreció renal del calci i del fòsfor. A més, recentment, s'ha vist que també influeix en la reabsorció del sodi [137,198,209].

Per tal de comprendre com la PTH afecta l'excreció urinària d'aquestes molècules primer descriuré breument com es realitzen la filtració glomerular i la reabsorció tubular.

1.4.1. Filtració Glomerular (FG)

La sang entra al glomèrul a través de l'arteriola aferent i surt per l'arteriola eferent (figura 8). El glomèrul és una xarxa de fins a 50 capil·lars paral·lels que es ramifiquen i anastomosen, recoberts per cèl·lules epitelials i tancats en la càpsula de Bowman. La pressió de la sang en el glomèrul determina que el líquid es filtri cap a la càpsula de Bowman, formant-se així l'ultrafiltrat que posteriorment anirà cap al túbul proximal on els diferents soluts seran reabsorbits o excretats. La taxa de filtració glomerular (FG) representa el grau en el que es forma aquest ultrafiltrat de plasma pel glomèrul i és un indicatiu de la funció de la massa renal. A partir de compostos sintetitzats de manera endògena o administrats de manera exògena que no s'uneixen a proteïnes del sèrum, són permeables a través dels capil·lars del glomèrul, no es reabsorbeixen ni metabolitzen, sintetitzen o secreten pels túbuls renals, podem obtenir una fidel estimació de la taxa de FG. Això pot ser expressat matemàticament com:

$$FG = UV/P$$

On U és la concentració en orina del compost, V és el grau del flux urinari i P és la concentració plasmàtica del mateix compost. Clínicament s'usa com a marcador per a determinar la taxa de FG i l'aclariment de creatinina. La creatinina és una proteïna endògena produïda en les cèl·lules musculars per una conversió no enzimàtica de creatinina i fosfocreatinina. Atès que la creatinina té un pes molecular baix, no s'uneix a proteïnes del plasma, es filtra lliurement als glomèruls i no es reabsorbeix a nivell tubular, és un excel·lent marcador per a estimar la taxa de FG. El valor normal de l'aclariment de creatinina està comprès entre 100-130 ml/min en humans i entre 1-3 ml/min en el cas de les rates.

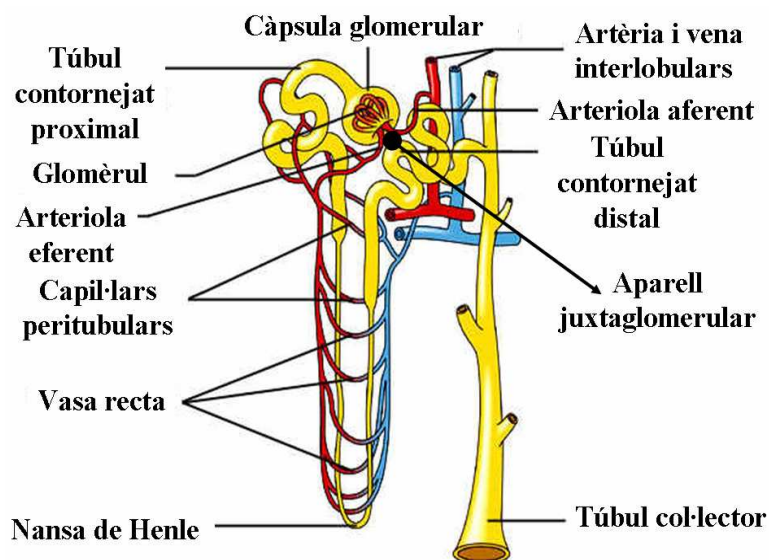


Figura 8. La nefrona. En el glomèrul es realitza el filtratge de la sang i es forma l'ultrafiltrat que posteriorment anirà cap al túbul on es realitzaran els diferents passos de reabsorció.

1.4.2. Reabsorció tubular

Després de la filtració glomerular l'ultrafiltrat entra en el túbul renal on es duren a terme els processos de reabsorció (el 99% del que es filtra és posteriorment reabsorbit). Per la reabsorció les substàncies poden seguir

dos vies diferents: la paracel·lular (passar entre les unions cel·lulars) o la transcel·lular (o sigui, a través de la cèl·lula) que és la majoritària. En el cas del sodi, els ions de Na^+ es mouen a favor de gradient dins dels canals de la membrana luminal (que separa la llum tubular del citoplasma cel·lular) cap a l'interior de la cèl·lula. A continuació són transportats activament a través de la membrana basolateral (separa el citoplasma del líquid intersticial) mitjançant un transport actiu primari que inclou la bomba Na^+, K^+ -ATPasa, que només es troba en la membrana basolateral. La bomba Na^+, K^+ -ATPasa és la que crea el gradient electroquímic per a que hi pugui haver difusió simple en la membrana luminal conservant baixa la concentració de Na^+ citoplasmàtica i la càrrega negativa a l'interior de la cèl·lula.

Tant la glucosa, com la major part dels nutrients orgànics, el clor, el calci i el fòsfor són cotransportats juntament amb el sodi o entren de manera passiva degut al gradient creat pel seu transport. La reabsorció d'aigua està lligada igualment a la reabsorció de sodi: el moviment de sodi des de la llum cap al líquid intersticial redueix l'osmolaritat total i al mateix temps augmenta l'osmolaritat en el líquid intersticial.

Aquest gradient osmòtic des de la llum del túbul cap a l'espai intersticial causa una difusió neta d'aigua des de la llum a través de les membranes plasmàtiques cap al líquid intersticial. La magnitud d'osmosis neta que tindrà lloc sota un gradient osmòtic determinat dependrà també de la permeabilitat a l'aigua de les membranes plasmàtiques i les unions entre les cèl·lules. Aquesta permeabilitat varia al llarg de la nefrona i està subjecta a control fisiològic. El líquid reabsorbit es mou des del líquid intersticial cap dins els capil·lars peritubulars simplement pel flux de massa causat pel balanç net de pressió hidràulica i oncòtica que actua a través del capil·lars peritubulars [195].

1.4.2.1. Transportadors de Na⁺

Com ja hem comentat la reabsorció de la major part de substàncies està acoblada d'una manera o d'una altra a la reabsorció de sodi. Existeixen diferents transportadors a la membrana luminal del túbul renal que juntament amb la Na⁺,K⁺-ATPasa de la membrana basolateral són els responsables d'aquesta absorció de sodi:

- La isoforma NHE3 de l'intercanviador apical de Na⁺/H⁺ és el major transportador de sodi en el túbul proximal, els ions d'hidrogen són secretats mentre que el sodi i el bicarbonat són reabsorbits [18].
- El cotransportador apical de Na⁺-P_i (isoforma NaPi-2a) està involucrada en la reabsorció del 80% del fosfat filtrat i també en la reabsorció d'una menor fracció de sodi en el túbul proximal.
- En la nansa de Henle, la reabsorció de sodi es duu a terme pel cotransportador apical Na-K-2Cl [també anomenat BSC-1 (*bumetadine-sensitive cotransporter type 1*) o NKCC2], amb l'ajut del NHE3, el canal de potassi ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium channel*) i la Na⁺,K⁺-ATPasa basolateral [64,73].

Hi ha diferents hormones que controlen l'activitat de tots aquests transportadors de sodi com són: l'aldosterona i l'angiotensina II que augmenten la reabsorció de sodi, clor i aigua; la vasopressina o ADH que augmenta la reabsorció d'aigua; i el pèptid natriürètic auricular que disminueix l'absorció de sodi i clor [195]. Endemés, recentment s'ha vist que també la PTH pot modificar l'activitat d'aquests transportadors modificant-ne la seva expressió [137,198]. La síntesi i secreció d'aquestes hormones depèn de la falta o de l'excés de sodi i aigua en l'organisme.

1.4.2.2. Transportadors de P

La reabsorció de fòsfor depèn principalment de l'activitat dels transportadors luminals de $\text{Na}^+\text{-P}_i$, concretament de la isoforma 2a on el fòsfor és cotransportat juntament amb sodi. El NaPi-2a és troba exclusivament en cèl·lules del túbul proximal del ronyó i és una proteïna amb 8 dominis transmembrana que presenta una regulació complexa [185]: la vitamina D, així com la *STC-1* (*stanniocalcin-1*; fosfoproteïna secretada per l'epiteli del túbul col·lector) augmenten l'expressió del transportador [90,204]; la PTH (a través del *PTHr1*) i el *sFRP-4* (*Soluble Frizzled-related Protein-4*, fosfatonina expressada per osteoblast i algunes cèl·lules renals) estimulen la internalització del transportador disminuint així la seva activitat; i el *FGF23* inhibeix la seva activitat, ja sigui mitjançant la internalització del transportador o reduint la seva expressió [15,172,188].

1.4.2.3. Transportadors de Ca^{2+}

En el cas del calci existeixen processos de transport transcel·lular (que és el predominant) i de transport paracel·lular. Gairebé tota la reabsorció paracel·lular té lloc en el túbul proximal i la nansa de Henle. El transcel·lular (sensible a control hormonal) ocorre als segments distals.

El transport passiu en els túbuls proximals i nansa de Henle, són regulats per la proteïna d'unió paracel·lina-1 i d'altres mecanismes de transport iònic com són: els transportadors luminals *BSC-1* i el *ROMK*, i la $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-ATPasa}$ i la *CLCNKB* (*Chloride channel Kidney b*) basolaterals [31,165]. A més en la nansa de Henle també el *CaSR* té un paper regulador en el control del transport paracel·lular.

En el túbul distal, el canal *TRPV5* (*Transient receptor potential vanilloid type 5*), el intercanviador basolateral de Na/Ca (*NCX1*) i la bomba de Ca^{2+} de membrana (*PMCA*) són els responsables del transport transcel·lular. A

més hi ha també la calbindina- D_{28K} és utilitzada per transport intracel·lular de calci [31,72].

La unió de PTH amb PTHR1 augmenta tres coses: els nivells de calbindina- D_{28K} i NCX1, i l'afinitat de PMCA pel calci [31]. TRPV5, tanmateix es regulada per klotho [37].

1.4.3. Retroalimentació tubulo-glomerular (TGF)

La retroalimentació tubulo-glomerular (*tubuloglomerular feedback*, TGF) és la responsable de l'adequada excreció de Na^+ i aigua, aquest TGF es duu a terme gràcies a la presència de la màcula densa. La màcula densa és un component de l'aparell juxtaglomerular situada en una zona del túbul distal en contacte amb el pol vascular del glomèrul (figura 8). Aquest aparell està format per una sèrie de cèl·lules molt denses que detecten canvis en els ions de Na^+ en el component del líquid tubular. Canvis en la composició del fluid que passa per la màcula densa comporta canvis ràpids en la filtració glomerular de la mateixa nefrona degut a l'alliberació d'una sèrie de vasodilatadors o vasoconstrictors cap a les arterioles aferents o eferents. Així si hi ha un augment en l'excreció de sodi s'alliberaran senyals per reduir la filtració glomerular i disminuir així les pèrdues de Na^+ .

1.4.4. Paper de la PTH en la reabsorció tubular

La PTH és una de les hormones (juntament amb l'aldosterona, l'angiotensina II, la vasopressina o ADH, i el pèptid natriurètic auricular) que intervé en el control hormonal de la reabsorció tubular.

Com ja hem comentat anteriorment, la PTH mitjançant la seva actuació en el túbul proximal, en la porció gruixuda de la nansa de Henle i en els túbuls distals; augmenta la reabsorció de calci i magnesi, i disminueix la reabsorció de fosfats.

En estudis *ex vivo* amb ronyons de rata s'ha vist que la PTH redueix el flux de plasma que entra a la nefrona i el coeficient d'ultrafiltració glomerular en glomèruls superficials [174]. Finalment, comentar que en estudis realitzats anteriorment s'ha vist que el tractament amb PTH està associat a natriuresi i diüresi [173,209], que poden ser causats per canvis en l'activitat, la circulació o l'expressió dels transportadors de sodi i fòsfor renals.

2. EL RECEPTOR D'N-METIL-D-ASPARTAT

El glutamat és el major neurotransmissor excitador del sistema nerviós central (SNC) i els seus receptors tenen un paper vital en la regulació de la transmissió sinàptica excitadora [28,80]. Un dels seus receptors més importants és el receptor d'N-Metil-D-Aspartat (NMDAR).

Els NMDAR són canals de calci de membrana pertanyents a la família dels receptors ionotròpics de glutamat. L'entrada de calci a través del receptor té funcions importants en el desenvolupament neural i en formes de plasticitat sinàptica relacionades amb processos de memòria i aprenentatge [11,124]. Aquestes troballes impliquen el receptor de NMDA en una gran varietat de desordres neurològics que inclouen l'epilèpsia, el dany isquèmic cerebral, i, d'una manera més especulativa, desordres neurodegeneratius com el Parkinson i l'Alzheimer, la Corea de Huntington, i l'esclerosi amiotròfica lateral.

A part de les seves funcions en el SNC, també s'han descobert receptors de NMDA fora d'aquest amb diverses funcions depenent de l'òrgan en el que es trobin [41,88,153]. Cal parar esment, però, en que la major part d'estudis sobre el receptor de NMDA, així com l'anàlisi de les seves funcions, estructura del receptor i la seva regulació s'han dut a terme en neurones, i es coneix molt poc sobre el funcionament del d'aquest receptor fora del SNC.

2.1. Estructura i regulació dels receptors de NMDA

El NMDAR forma part de la família dels receptors de glutamat. Aquests receptors de glutamat es poden dividir en ionotròpics (o associats a canals permeables a ions) i metabotròpics (o associats a proteïna G) que no condueixen corrent directament sinó que a través de senyals a fosfolipasa C alliberen Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars, o a través d'adenilat ciclase modulen altres canals iònics i vies bioquímiques intracel·lulars [51].

2.1.1. Receptors ionotròpics de glutamat

Els receptors ionotròpics són canals iònics que s'obren per unió a lligand, en aquests cas per unió a glutamat, i així, ions carregats com el Na^+ i el Ca^{2+} passen a través del canal situat al centre del complex del receptor. Aquest flux d'ions dona com a resultat una despolarització de la membrana plasmàtica i la generació d'un corrent elèctric que és propagat al llarg del SNC. Els receptors són complexos formats per 4 o 5 subunitats i estan subdividits en tres grups depenent de les seves similituds estructurals i farmacològiques: NMDA, AMPA i kainat (figura 9). Aquests receptors tenen en comú una permeabilitat substancial a Na^+ i K^+ , i una permeabilitat variable als ions Ca^{2+} .

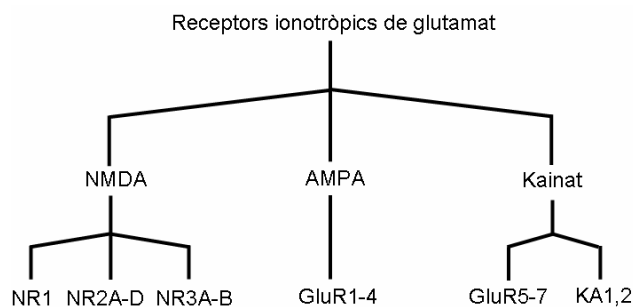


Figura 9. Classificació dels receptors ionotròpics de glutamat. Cada receptor està format per 4 o 5 subunitats diferents depenent de la localització i funció de cada receptor.

Encara que els diferents tipus de receptors ionotròpics de glutamat tinguin com a lligand comú el glutamat, les diferències farmacològiques, bioquímiques i moduladores són significatives [19,203]. Aquesta divisió ve principalment per la diferència d'agonistes entre receptors. Per això AMPA fa referència a l'àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionat. NMDA al àcid N-metil-D-aspartat. I el kainat al agonista del mateix nom.

El receptors d'AMPA inclouen les subunitats GluR1-4, podent formar receptors homomèrics o heteromèrics. En canvi els receptors de NMDA formen receptors heteromèrics. Aquests formen tetràmers, on hi ha involucrades les subunitats NR1 i NR2A-D, també s'ha trobat en teixits concrets del cervell la subunitat NR3A i la NR3B. Després estarien els receptors de kainat KA1 i KA2. Finalment hi hauria el receptor orfe Delta $\delta 1$ i $\delta 2$ que actua com un canal ionotròpic només sota condicions patològiques [19,106,121,152].

2.1.2. Estructura del receptors de NMDA

El receptor de NMDA està compost per l'empaquetament de dos subunitats NR1 i dos NR2, que poden ser qualsevol dels quatre productes gènics NR2 diferents (A, B, C o D). L'expressió d'ambdues subunitats és necessària per formar canals funcionals. El domini d'unió a glutamat es forma a la intersecció entre les subunitats NR1 i NR2 (per això s'han d'expressar les dos subunitats). L'expressió d'una subunitat NR2 o d'una altra depèn de la localització en el cervell o de l'estadi del desenvolupament en que ens trobem.

Perquè s'obri el canal i així el calci pugui entrar a la cèl·lula, el receptor necessita de la unió del lligand. A més del glutamat, el receptor de NMDA necessita un coagonista, la glicina, que ha d'estar unida perquè el receptor pugui exercir la seva funció. El lloc d'unió a glicina es troba en la subunitat NR1. La subunitat NR2 també posseeix un lloc d'unió a

poliamines, molècules reguladores que poden modular el funcionament del receptor de NMDA.

A més de les variacions produïdes per l'ús de diferents subunitats NR2 en el complex del receptor, existeixen múltiples variants de *splicing* de la subunitat NR1 (fins a 8 variants diferents). Hi ha 3 regions on es pot dur a terme aquest *splicing*: a l'exó 5 (al domini N-terminal) i als exons 21 i 22 (al domini C-terminal; figura 10). Aquestes variants són importants en la regulació per interaccions intracel·lulars com les de les proteïnes d'unió PDZ com el PSD-95 [56] (proteïna encarregada de l'acoblament del receptor amb l'òxid nítric sintasa neuronal).

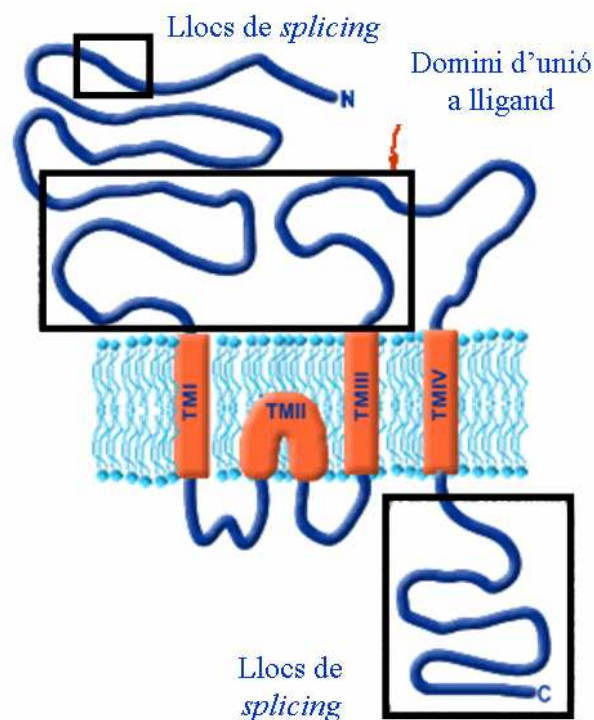


Figura 10. Estructura general d'una subunitat NR1 del receptor de NMDA. La subunitat NR1 presenta un domini d'unió a lligand format per un domini N-terminal extracel·lular i un llarg *loop*. El domini C-terminal és intracel·lular i sovint és el lloc on es troben les variacions de *splicing* alternatiu (hi ha fins a 8 variants diferents) i és també el lloc d'interacció de les proteïnes intracel·lulars.

Recentment, s'ha vist que una proteïna prèviament coneguda com a NMDAR-L és en realitat una subunitat del receptor de NMDA, la NR3, de la que n'hi ha dos subunitats diferents la A i la B. Es creu que aquesta subunitat està involucrada en el desenvolupament d'elements sinàptics ja que modula l'activitat del receptor de NMDA fent-lo més sensible a la glicina i menys al glutamat [38,50], a més, disminueix la permeabilitat al Ca^{2+} i la sensibilitat al Mg^{2+} .

Totes les subunitats del receptor comparteixen una estructura bàsica comuna (figura 10) [106,152,183,203]:

- Un domini N-terminal de 350 aminoàcids. És el lloc d'unió de diversos moduladors al·lostèrics com el Zn^{2+} , l' H^+ i les poliamines espermidina i espermina.
- Com altres canals iònics regulats per lligand les subunitats posseeixen quatre regions hidrofòbiques en la porció central de la seqüència (TMI-IV).
- Un domini d'unió a lligand format per un *loop* que es troba entre el domini N-terminal i el primer domini transmembrana (TMI). A més, el llarg *loop* entre els dominis TMIII i TMIV, que és intracel·lular en les subunitats d'altres receptors regulats per lligand, està exposat aquí a la superfície cel·lular i forma part d'aquest domini d'unió a lligand.
- Domini C-terminal on s'uneixen proteïnes intermediàries a l'ancoratge al citoesquelet; el filament intermedi neuronal (NF-L); proteïnes que pengen d'un gran grup de proteïnes guanilatquinasa associades a membrana, amb una possible funció assenyaladora del receptor de NMDA; a més de ser diana per proteínquineses i proteínfosfatases.

2.1.2.1. Modificacions posttraduccionals del NMDAR

Un cop la seqüència de mRNA ha estat traduïda, pot patir una sèrie de modificacions que poden canviar l'activitat del receptor. En el cas del NMDAR aquestes modificacions poden ser la fosforilació, la glicosilació, la proteòlisis i la unió covalent de lípids [56].

La resposta dels receptors ionotòpics de glutamat als agonistes sovint es veu potenciada després de la fosforilació. Els receptors de NMDA poden ser fosforilats per PKA, PKC, CAMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) i calcineurina (en el cervell d'un 10 a un 70% de les subunitats NR1 i NR2 sembla ser que estan fosforilades [109]).

La glicosilació influeix diverses propietats dels receptors de glutamat, incloent l'activitat del canal i la modulació per lectines. Les subunitats del NMDAR contenen de 6 a 12 llocs de glicosilació possibles.

2.1.3. Activació del receptor

El receptor normalment està en repòs però la despolarització de la membrana plasmàtica provoca que s'alliberi del bloqueig per magnesi, això permet que l'aminoàcid glutamat es pugui unir al receptor juntament amb la glicina. Un cop s'han unit els dos agonistes, el canal pateix un canvi conformacional i els ions de Ca^{2+} i Na^{+} poden entrar a l'interior de la cèl·lula.

El receptor té una sèrie de moduladors al·lostèrics que poden modificar la seva activitat [56]:

- Zinc extracel·lular: inhibeix l'activitat dels receptors de NMDA. Tanmateix, el bloqueig per Zn^{2+} és més feble que el de Mg^{2+} ja que la tolerància del receptor al Zn^{2+} és més gran que al Mg^{2+} .
- Reducció i oxidació dels residus de cisteïna extracel·lulars: depenent de l'estadi redox en que es trobin els residus de

cisteïna (Cys 744 i Cys 798) l'activitat del receptor es pot veure atenuada o estimulada. Hi ha diferents molècules capaces d'oxidar o reduir el NMDAR: agents oxidants com l'àcid lipòic i espècies reactives d'oxigen; i reductors com el glutatió i l'àcid dihidrolipòic.

- Protons: els NMDAR són inhibits de manera fisiològicament rellevant per diferents concentracions extracel·lulars de protons. Aquesta inhibició ocorre a través d'una reducció de la freqüència d'obertura del canal.
- Poliamines: les poliamines endògenes com l'espermidina i l'espermina tenen almenys tres efectes en els receptors de NMDA: poden causar una inhibició voltatge-dependent, una potenciació glicina-dependent i una potenciació independent de voltatge i glicina de la funció del receptor.

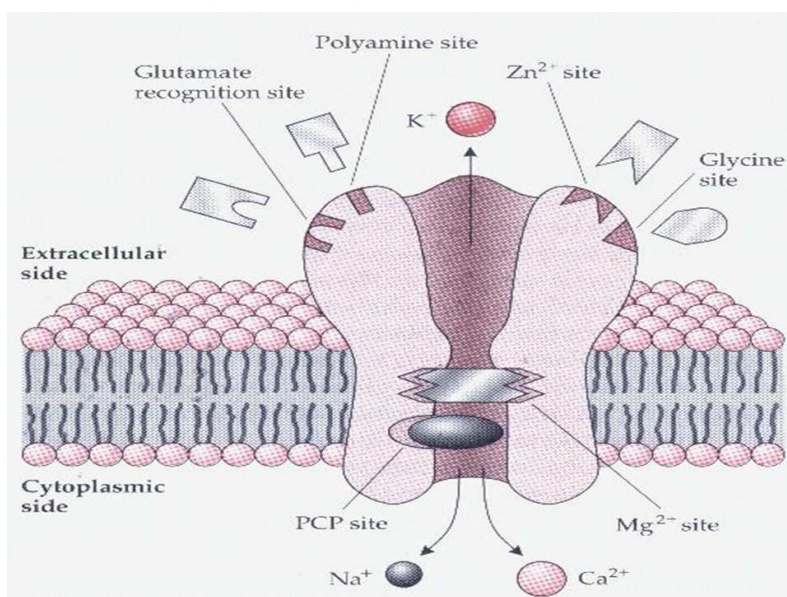


Figura 11. Receptor de NMDA. L'activitat del receptor es veu modulada pel bloqueig de Mg²⁺, i la interacció del Zn²⁺, les poliamines i la fenilciclidina (PCP).

2.1.4. Agonistes i antagonistes del receptor

El receptor de NMDA a part de la unió del glutamat i la glicina pot ser activat o inhibit mitjançant la unió de diferents agonistes o antagonistes respectivament. L'agonista més important del receptor és el NMDA o àcid N-metil-D-aspartat (figura 12). El NMDA és un compost sintètic que no es troba en els sistemes biològics naturals, és un derivat de l'aminoàcid àcid aspàrtic que mimetitza l'acció del glutamat enfront del receptor de NMDA. Al contrari que el glutamat, però, el NMDA només activa el NMDAR i no els altres receptors de glutamat.

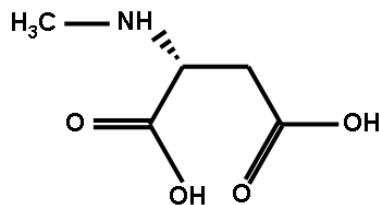


Figura 12. Estructura de l'àcid N-metil-D-Aspartat. L'àcid N-metil-D-Aspartat (NMDA) funciona com un agonista del glutamat activant el receptor.

L'àcid homoquinolínic és un altre anàleg del glutamat encara que la seva activitat depèn de la subunitat NR2 present en el receptor, al contrari que el NMDA que no és selectiu.

Els antagonistes competitiu clàssics del glutamat en els receptors de NMDA són els fosfonoderivats de cadena curta d'aminoàcids com l'AP5 i l'AP7, mentre que les quinoxalinediones i derivats de l'àcid quinunèric varen ser els primers antagonistes de la glicina en ser identificats [160].

Diverses classes d'antagonistes bloquegen el receptor de NMDA d'una manera voltatge-dependenta sense causar reduccions significatives en la potencia de l'agonista, són els antagonistes no competitiu tals com l'ifenprodil i els seus anàlegs [202]. A concentracions no tòxiques també

l'etanol és un antagonista no competitiu del receptor de NMDA, encara que el seu bloqueig és més potent amb les subunitats NR2A o NR2B que amb les NR2C i NR2D [126]. Pèptids carregats positivament com la dinorfina també poden inhibir l'activació del receptor d'una manera voltatge-depenent [39,40].

A més dels antagonistes també existeixen els bloquejants no competitius que només actuen quan el receptor està activat i no quan està en repòs. A més dels ions Mg^{2+} i de les poliamines, hi ha gran varietat de compostos que bloquegen el canal de glutamat un cop està obert com per exemple la fenciclidina, la ketamina, el dextrometorfan, la memantina i l'amantadina. Encara que el que té l'afinitat més alta és el MK-801 [56].

2.2. Funcions del receptor de NMDA

Com ja hem anat comentant el receptor de NMDA té un paper fonamental en la transmissió de la senyal excitadora en el SNC. L'entrada de calci a través del NMDAR ha estat àmpliament associada a processos de plasticitat sinàptica [22,122] i aprenentatge, processos de potenciació a llarg termini [6,96,207] i plasticitat neural del sistema visual [14,158].

S'ha vist també que té un paper molt important en el desenvolupament normal del SNC. S'ha identificat el glutamat com un dels factors tròfics involucrats en la modulació de les diferents fases de diferenciació neural. De fet, resultats de diversos estudis suggereixen que l'alteració de l'activació del receptor durant períodes crítics del desenvolupament poden tenir efectes deleteris en el desenvolupament i la funció del SNC [86,87].

La inapropiada activació del NMDAR s'ha vist implicada en l'etiologia de diverses malalties. En particular, l'entrada excessiva de calci a través el NMDAR pot causar mort neural deguda a excitotoxicitat, per tant, el bloqueig dels receptors de NMDA pot ser neuroprotector en

models animals d'accident vascular cerebral (comunament anomenat atac de feridura o ICTUS) [107]. L'ICTUS és, de fet, la primera indicació clínica dels antagonistes del NMDAR, encara que l'ús de molts fàrmacs està limitat per les seves accions en la transmissió sinàptica normal o pels seus efectes secundaris. Contràriament, la reducció de l'activitat del NMDAR per antagonistes no competitius com són la ketamina i la fenciclidina provoquen una hiperactivitat dopaminèrgica i canvis en el comportament característics de l'esquizofrènia [48].

Les funcions del NMDAR es duen a terme a través de l'activació de diverses vies de senyalització entre les que cal destacar les vies de les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) i la de l'òxid nítric (NO).

2.2.1. Vies de les MAPK

Les MAPK són proteínquineses que regulen diverses activitats cel·lulars tals com l'expressió de diversos gens, la mitosis, la diferenciació, la supervivència cel·lular i l'apoptosi. Encara que l'activació de les MAPK va ser observada en primer lloc en resposta a l'activació d'EGF (*epithelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), NGF (*nerve growth factor*) i de la insulina; altres estímuls cel·lulars com l'activació de les cèl·lules T, forbolèsters (que funciona a través de PKC), trombina, bombesina i bradiquina (que funcionen a través de proteïna G), l'activació de NMDAR i l'estimulació elèctrica ràpida indueixen també la fosforilació de les MAPK activant-les [76].

Els membres més ben caracteritzats de la família de les MAPK es poden dividir en tres subgrups: el primer inclou els membres fundadors de la família de les MAPK: ERK1 o MAPK^{ERK1/p44} (extracel·lular signal-regulated kinase-1), l'ERK2 (o MAPK^{ERK2/p42}) i els seus parents més pròxims; el segon subgrup és el de les JNK (Jun N-terminal kinases) anomenat així perquè poden activar el factor de transcripció Jun

mitjançant la fosforilació de dos residus prop el seu domini N-terminal; el tercer subgrup és el de les MAPK p38, dit així perquè el primer membre en ser descobert tenia un pes molecular de 38 kDa [76].

La primera indicació del paper del NMDAR en la regulació d'una quinasa pertanyent a la superfamília de les MAPK va ser l'any 1994 on en un estudi de Murphy *et al.* [139] varen veure que un bloqueig del NMDAR activava aquestes quinasas mentre que l'activitat CaMK II estava suprimida.

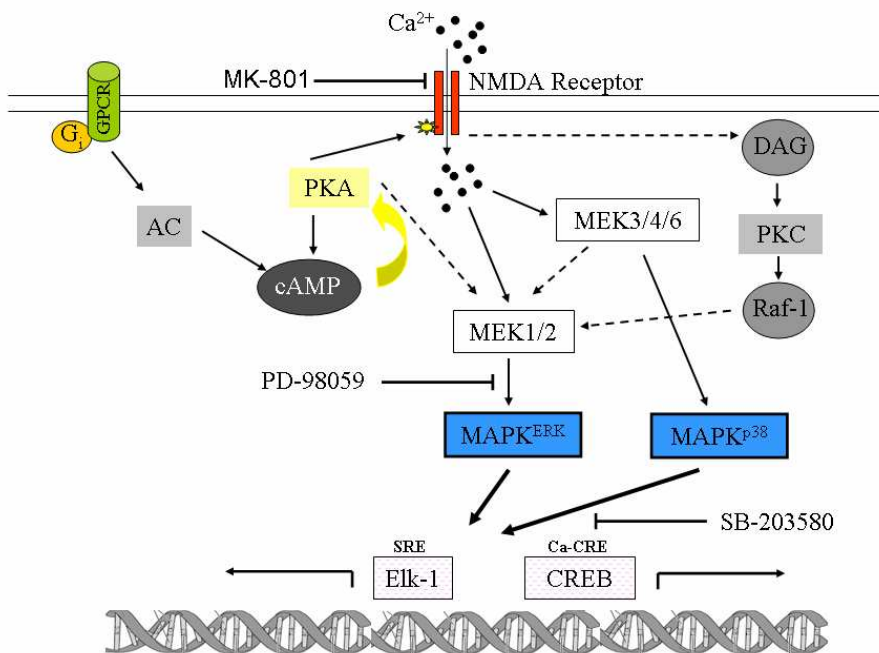


Figura 13. Activació de les MAPK pel receptor de NMDA a través de mecanismes sensitius a AMPc i PKA/PKC. Un cop s'activen els receptors associats a proteïna G (GPCR) l'AMPc activa la PKA, que fosforila el receptor de NMDA alterant així la seva sensibilitat al glutamat. Per altra banda, l'AMPc activa la MEK1/2 a través de PKA (línia discontinua). L'activació del NMDAR prova una entrada de Ca²⁺, que al seu torn, activa les cascades de senyals relacionades amb les MAPK. El MK-801 bloqueja el NMDAR en el seu estat fosforilat. L'activació de les vies MAPK^{ERK} a través de MEK1/2, que és regulada per AMPc/PKA, es bloqueja potencialment per el PD-98059. La inhibició de les MAPK^{p38} per el SB-203580 bloqueja la fosforilació d'Elk-1 i CREB, que regula la fosforilació del cofactor c-Fos. Adaptat de Haddad, 2005 [76].

Des de llavors, l'efecte del glutamat (i anàlegs seus com el NMDA) s'ha associat a l'activació de la via de les MAPK^{ERK2} [119] i d'un dels seus factors de transcripció diana, CREB (figura 13). L'entrada de calci extracel·lular a través del canal de NMDA i la posterior activació de la via de les MAPK^{ERK1/2} també està involucrada en la mort neural causada per toxicitat a glutamat [91,92], en vies relacionades amb l'apoptosi, potenciació i depressió a llarg termini, en l'estrès oxidatiu, etc [76].

2.2.2. Òxid nítric (NO)

El NO és un dels missatgers biològics més petits [7]. És un gas incolor lleugerament soluble en medi aquós que conté un número imparell d'electrons i per tant és un radical lliure. Es caracteritza per una curta vida mitja i la seva habilitat per difondre lliurement per membranes cel·lulars el converteix en un bon candidat per exercir la seva acció de forma autocrina o paracrina [69]. El NO se sintetitza en diferents tipus de cèl·lules a partir de l'extrem aminoterminal de la L-arginina, formant-se també una molècula de L-citrulina [144]. Aquesta síntesis està catalitzada per la NO sintasa (NOS) de la que n'existeixen almenys tres isoformes, la NOS neuronal (o tipus I), la NOS induïble (tipus II) i la NOS endotelial (tipus III).

En el cervell l'entrada de Ca²⁺ a través dels receptors de NMDA estimula eficientment l'òxid nítric sintasa de tipus 1 (NOS1). Aquesta estimulació es possible gràcies a la colocalització de la NOS1 i el NMDAR a través de la PSD-95 (*post-synaptic density protein*), que assegura que el calci que entra a través del NMDAR sigui selectivament acoblat a l'activitat NOS1 [9,29]. Es creu que el NO és la connexió entre l'augment de Ca²⁺ citoplasmàtic i els canvis d'activitat a llarg termini com la diferenciació, la supervivència i la plasticitat sinàptica.

Al seu torn el NO pot activar també la via de les MAPK [118]. Endemés, la síntesi de NO està associada amb la mort neural deguda a toxicitat per glutamat [133]. El NO produït per l'activació del NMDAR també s'ha vist implicat en nombroses funcions tals com la supressió de les descàrregues reflexes del sistema simpàtic perifèric [84] i la vasodilatació cerebral [56]. A més, la utilització d'antagonistes de NMDAR i la posterior activació de la síntesi de NO resulta beneficiosa en l'evolució de la isquèmia cerebral [24].

2.3. El receptor de NMDA fora del SNC

Els receptors ionotòpics de glutamat s'expressen majoritàriament al SNC, però hi ha diversos òrgans on recentment s'ha demostrat que també estan presents i on intervenen en la regulació de diferents funcions depenent de la seva localització:

- Cèl·lules d'illots pancreàtics expressen receptors de glutamat que modulen la secreció d'insulina i glucagó. S'ha vist que antagonistes dels receptors i transportadors de glutamat tenen efectes inhibitoris i potenciadors de la secreció d'insulina respectivament, inclús amb l'absència d'aminoàcids exògens. Per tant, sembla que els illots del pàncrees posseeixen un sistema de senyals glutaminèrgic complet que està involucrat en la secreció de les diferents hormones pancreàtiques [88,199,200].
- Hi ha evidències de la presència de receptors de NMDA i d'altres receptors de glutamat en terminals de nervis sensitius no mielinitzats de la pell [12,35] on podrien estar associats amb certs tipus de dolor relacionat amb la inflamació.
- El NMDA despolaritza i eleva el Ca^{2+} intracel·lular en cèl·lules situades a les papil·les gustatives de ratolí [77].

- Nombroses subunitats de receptors ionotròpics de glutamat sembla ser que són expressades per ganglis cardíacs, encara que se'n desconeix la seva funció [71].
- El NMDAR s'expressa també en limfòcits de rosegadors, on l'activació del receptor per part del NMDA eleva els nivells de calci intracel·lular, cosa que provoca un increment dels nivells de les substàncies reactives d'oxigen (ROS) a més d'activar la caspasa-3 intracel·lular. Aquests resultats indiquen que el glutamat té múltiples efectes en els limfòcits *in vivo* i que aquests efectes estan relacionats amb les vies de senyalització cèl·lula-cèl·lula. Endemés indica un possible paper dels receptors de glutamat en la senyalització entre el SNC i el sistema immunitari.
- El NMDAR1 s'expressa en moltes regions pulmonars, així com en la tràquea i en els macròfags alveolars. En aquest òrgan l'agonista NMDA indueix edema pulmonar excitotòxic i l'activació endògena dels NMDAR pot intervenir en el dany pulmonar causat per estrès oxidatiu [55].
- En el múscul esquelètic, el receptor de NMDA està involucrat en l'entrada de calci, prerequisit necessari per la fusió de mioblastos durant la diferenciació d'aquest múscul esquelètic [108].
- En queratinòcits humans també s'ha vist la presència del receptor de NMDA. El Ca^{2+} que entra a través del NMDAR influeix el cicle de proliferació, diferenciació i migració dels queratinòcits durant l'epitelització. Endemés, l'activació del receptor pot estar involucrada en la inhibició per contacte del creixement, procés que està absent en la patologia neoplàstica [142].

A més, hi ha dues localitzacions del NMDAR fora el SNC que tenen relació amb la homeòstasis del calci com són la seva presència en l'os i en el ronyó.

2.3.1. NMDAR a l'os

Estudis realitzats a finals de la dècada dels noranta, van demostrar la presència del receptor de NMDA en osteoclasts i osteoblast [41,153]. Tant els osteoclast com els osteoblasts expressen la subunitat NR1 del receptor i diferents NR2, cosa que implica una diversitat molecular de NMDAR en l'os igual que passa en el cervell [41,70,89,153].

En cèl·lules òssies els diferents antagonistes del NMDAR inhibeixen la resorció òssia, indicant així que l'activació del receptor és necessària per al correcte funcionament d'aquestes cèl·lules [41,89]. L'antagonista del receptor MK-801 suprimeix també la diferenciació dels osteoclasts en cèl·lules d'estroma i en osteoblasts [41,82,154] i decreix el calci intracel·lular lliure d'osteoblasts en cultiu. A més a més, exposicions continuades de MK-801 poden inhibir l'expressió de mRNA i proteïna de Runx2/Cbfa-1 que també inhibeix la diferenciació i maduració d'osteoblasts [82]. Els osteoblasts també són capaços d'alliberar glutamat espontàniament per tal de modificar de manera paracrina o autocrina la resposta osteogènica [81].

La presència de PSD-95 ha estat demostrada en osteoclasts, pel que es pot hipotetitzar que pot existir un mecanisme semblant al que ocorre en el cervell, així l'entrada de calci produiria un augment en la producció de NO, ja que osteoclasts madurs expressen mRNA codificant per NOS1, i així causar els diferents efectes en al regulació de la resorció òssia [128].

A més dels estudis realitzats en osteoclasts i osteoblasts madurs, també s'ha determinat la presència del receptor de NMDA en precursors osteoclàstics on té un paper important en la osteoclastogènesi [129]. També

s'ha vist un paper del glutamat en la regulació de la maduració dels osteoblasts [115]: agonistes dels receptors de NMDA i AMPA incrementen la deposició de calci i augmenten l'expressió d'osteocalcina (proteïna utilitzada com a marcador de formació òssia) en cultius osteoblàstics *in vitro*.

2.3.2. NMDAR al ronyó

La implicació dels NMDAR en el ronyó també ha estat descrita: s'ha demostrat la presència de NMDAR al ronyó [53,112] on s'ha observat que la inhibició d'aquests receptors causa vasoconstricció renal i reducció del flux renal de sang [53]. Es postula que l'activació del NMDAR podria ser el mitjancer pels canvis renals produïts per la glicina i d'aquesta manera esser un element crític en la vasodilatació induïda per proteïnes i aminoàcids [182]. S'ha vist també que la vasodilatació renal produïda per glicina es bloquejada per l'addició d'inhibidors de NO [46]. L'activació de la producció de NO s'ha involucrat també en nefrotoxicitat per gentamicina a través de el receptor de NMDA [111].

En quant a la síntesi de NO, la isoforma NOS1 s'expressa també en la màcula densa del ronyó [151], on produeix un efecte vasodilatador tònic en la microvasculatura glomerular al modular el sistema de TGF [143]. Tots aquests estudis previs indiquen que el NMDAR pot estar relacionat amb la formació del NO i tenir un paper en els efectes renals on aquest està involucrat tals com en la regulació de la hemodinàmica renal, el filtrat glomerular renal, el mecanisme de pressió-natriuresis i el procés de TGF [113].

El NO ha estat implicat també en una gran varietat de malalties renals degut a la quantitat de funcions que se li han atribuït [102]. S'ha implicat al NO en la regulació d'altres factors derivats de l'endoteli, com la endotelina-1, prostaglandines i l'angiotensina II [113], també s'ha publicat

que en condicions en les que el nivells de NO estan reduïts, un o més d'aquests mediadors està augmentat [2]. Hi ha diversos articles involucrant l'òxid nítric en el fracàs renal agut isquèmic [141]. A més, el NO ha estat implicat en el desenvolupament del fracàs renal crònic, tant en models experimentals [1,10,30] com en pacients [23,144].

Objectius

La PTH és una hormona fonamental en el control de la concentració de diferents ions en la sang, el més important dels quals és el calci. La regulació de la seva síntesi i secreció és un mecanisme complex en el que hi intervenen diversos factors tals com el mateix calci i la vitamina D. Tanmateix, poden existir altres vies de regulació que encara no han estat descrites ni estudiades. La presència del receptor de NMDA en dos dels òrgans responsables de l'homeòstasi del calci (ronyó i os) indica que aquest podria estar present també en la glàndula paratiroides on podria tenir efectes en el control de la síntesi i secreció de la PTH. Per tant, els objectius d'aquesta tesi són:

1. Determinar la presència del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides.

2. Analitzar el paper de l'activació del NMDAR en el control de la secreció de PTH tant en condicions normals com en condicions d'hiperparatiroidisme.

3. Estudiar els efectes de l'activació del NMDAR en el ronyó i el seu paper en la síntesi de vitamina D.

4. Examinar els efectes de l'activació del NMDAR en l'homeòstasi renal.

Materials i Mètodes

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

1.1. Consideracions prèvies

Els mètodes experimentals utilitzats en els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

A més a més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida amb data 1/03/05.

1.2. Animals i tractaments

Els estudis van ser realitzats en rates Sprague-Dawley de 200-250g de pes, degudament separades en grups i mantingudes sota condicions estàndard. El menjar i l'aigua estaven disponibles *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12. Per la determinació dels diferents factors metabòlics disposàvem de gàbies metabòliques individuals en les que podíem mesurar la ingesta d'aigua, menjar i també la diüresis de cada animal. Per a cada experiment s'utilitzava com a mínim una $n = 10$ animals. També vàrem mesurar la pressió arterial a la cua dels animals mitjançant el *LE 5002 Storage Pressure Meter* de (Letica Scientific Instruments, Panlab).

Els animals eren tractats amb N-Metil-D-Aspartat (NMDA; Sigma), un agonista del receptor, a una dosi de 10 mg per Kg de l'animal per tal d'activar el receptor.

1.2.1. Inducció del Fracàs Renal Crònic

Per l'obtenció del model animal de fracàs renal crònic, on la PTH està elevada de manera crònica, es va seguir el protocol descrit per Perez-Ruiz *et al.* [155]. Els animals van ser anestesiats amb isofluorà (Forane) i després de rasurar el camp quirúrgic es va practicar una incisió dorsiventral. El ronyó dret es va localitzar per palpació i va ser extret de la cavitat abdominal, es va alliberar del teixit connectiu i va ser extirpat després del lligament del peduncle renal. Una setmana després de la nefrectomia unilateral, es va realitzar la nefrectomia subtotal del ronyó contra lateral.



Figura 14. Realització de la nefrectomia subtotal del ronyó. Mitjançant un fil de seda es realitzen els lligaments als pols renals evitant el seu seccionament però impedit el pas de nutrients i oxigen al ronyó. A) Extracció del ronyó i lligament al pol dret. B) Lligament al pol esquerra. C i D) Un cop l'animal ha estat sacrificat i extret el ronyó s'aprecia clarament l'atrofia produïda als pols renals.

En primer lloc, es va eliminar el teixit connectiu amb especial cura en la part superior del pol renal per evitar danys en la glàndula adrenal. Seguidament es van col·locar dos fils quirúrgics en ambdós pols del ronyó perpendiculars a l'axis major. Els lligaments havien d'estar situats al costat mateix del peduncle renal i en paral·lel l'un amb l'altre. S'havia de tenir especial cura en deixar l'urèter lliure del lligament. Llavors, els lligaments eren fortament comprimits però evitant seccionar el ronyó, i per això, s'utilitzava un fil de seda gruixut (2/0). La correcta realització de la isquèmia era comprovada pels canvis de color en els pols del ronyó (figura 14). La part dels pols a la que no arribava la sang es tornava d'un color més blanquinós. D'aquesta manera es podia observar visualment que un terç del ronyó continuava funcionant mentre que els dos terços laterals eren anul·lats mitjançant la supressió de les vies de subministrament de sang i les vies excretores. Un cop obtingut l'animal amb fracàs renal crònic, es realitzaven diverses proves analítiques per tal d'anar seguint l'evolució de la MRC al llarg de les setmanes següents.

1.2.2. Inducció de la hipocalcèmia

Els experiments en els que la PTH havia d'estar elevada però sense els desenvolupament de la MRC es van realitzar en rates hipocalcèmiques. Per l'obtenció d'aquests animals es va procedir a la realització d'un clamp hipocalcèmic mitjançant el mètode descrit per Thomas *et al.* [189]. Les rates rebien una injecció intramuscular d'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) de 300 mg/Kg a l'inici de l'experiment que els hi provocava una hipocalcèmia prolongada de 6 hores de durada.

1.2.3. Inducció de la isquèmia aguda

Les rates eren anestesiades amb isofluorà per via inhalatòria. Després de rasurar el camp quirúrgic, es va practicar una laparotomia mitja, es va

retirar la massa intestinal i es va bloquejar durant una hora la circulació de los dos artèries renals amb unes micropinces. Les rates eren mantingudes mentrestant a una temperatura constant de 37°C. Transcorreguda l'hora de isquèmia, es retiraren les pinces i es va suturar la ferida amb seda estèril. Aquests animals eren utilitzats com a control de dany renal ja que presentaven un fracàs renal agut.

2. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES

2.1. Obtenció de mostres: sèrum i orina

2.1.1. Tractaments a curt termini

Els estudis fisiològics d'efecte immediat (fins a 1 hora) de l'acció del NMDA van ser realitzats en animals normals, urèmics i hipocalcèmics. Els animals eren anestesiats amb isofluorà per via inhalatòria. Un cop l'animal estava anestesiats se li realitzava una punció cardíaca per a obtenir sang arterial que servia per determinar els paràmetres basals de l'animal. Seguidament es procedia a la injecció intraperitoneal de NMDA (10 mg/Kg). Un cop passat l'interval de temps adequat (5, 15, 30 o 60 minuts) es procedia a la segona extracció de sang també per punció cardíaca. Les mostres sanguínies eren centrifugades a 4000 rpm durant 10 minuts per tal de separar el sèrum de l'hematòcrit. Tot seguit el sèrum era emmagatzemat a -80°C fins al seu anàlisi.

2.1.2. Tractaments a llarg termini (4 dies)

Els estudis a llarg termini van ser realitzats en animals sans, cada rata era el seu propi control ja que obteníem sang i orina abans i després del tractament. Les rates eren aïllades en gàbies metabòliques individuals amb lliure accés a aigua i menjar durant 2-3 dies. Quan ja estaven habituades a la gàbia metabòlica, es recollia orina 24 hores de la que es

mesurava el volum i se n'emmagatzemava una part per al posterior anàlisi. També obteníem mostres de sang seguint el protocol descrit anteriorment. Aquests eren els paràmetres basals de cada animal. Les rates rebien un tractament de 4 dies amb NMDA (10 mg/Kg/dia) i el cinquè dia eren sacrificades amb pentobarbital (50 mg/Kg). El dia del sacrifici s'obtenia orina 24 hores i sang directament de l'arteria aorta.

2.2. Anàlisis bioquímics

2.2.1. Mesura de la concentració d'ions en sèrum i orina

La determinació de les concentracions dels diferents ions en sèrum i en orina va ser realitzada pel servei de Bioquímica Clínica de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida seguint els següents protocols:

- Calci: mètode de o-cresolftaleína complexona en medi alcalí amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòdul P.
- Fosfat no esterificat (Fosfat): mitjançant el mètode del molibdat d'amoni amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòdul P.
- Ions sodi i potassi: elèctrodes selectius per ions amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular*.
- Urat: mitjançant el mètode de Town et al [191] amb algunes modificacions (uricasa) amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòduls D i P.
- Ió creatinini (creatinina): per mitjà del mètode de Jaffé sense desproteïnitació (mètode compensat), amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòdul D i P.
- Albúmina en orina: mètode immunoturbidimètric amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòdul P.

- Osmolaritat: Determinació de concentracions osmòtiques en sèrum i orina per mitjà de la mesura automàtica del punt de congelació. Osmòmetre *Fiske One-Ten*.
- pH: per mitjà de *pH-Indikatorpapier*. Neutralit®. Merck.
- Magnesi: mitjançant el mètode de Blau-Xilidil amb l'analitzador *Roche/Hitachi modular analytics* mòdul P.

2.2.2. Mesura de la concentració de PTH en sèrum

La concentració de PTH va ser mesurada utilitzant l'assaig comercial *Rat Intact PTH Elisa Kit* (Immunotopics) seguint el protocol descrit a continuació: es posava 25 µl de mostra en cada pouet que contenia una capa d'estreptavidina (l'estreptavidina és una proteïna de 60 kDa procedent de *Streptomyces avidinii*, amb alta afinitat per la biotina). Seguidament es pipetejava 100 µl d'una solució d'anticòs de treball que consistia en volums iguals d'un anticòs anti-PTH de rata biotinitzat i d'un anticòs anti-PTH conjugat a peroxidasa. Vam incubar a temperatura ambient durant 90 minuts amb la placa recoberta amb paper d'alumini per evitar l'exposició a la llum ja que el compost d'anticòs era fotosensible. Després es feien una sèrie de rentats per eliminar les restes d'anticòs que no s'havien unit a l'hormona i hi afegíem una solució de tetrametilbenzidina (TMB) que funcionava com a substrat per la peroxidasa. Ho deixàvem reaccionar durant 30 minuts i ho llegíem en un espectrofotòmetre de placa a 595 nm.

2.2.3. Mesura de la resorció òssia: determinació de fragments sèrics de col·lagen tipus I

Es pot considerar que més del 90% de la matriu òssia orgànica es formada per col·lagen tipus I. Durant el remodelatge de l'esquelet la matriu òssia es degradada i consegüentment, fragments de col·lagen tipus I són alliberats a la circulació. Mitjançant assaigs comercials com el

RatLapsTM Elisa de Nordic Bioscience Diagnostics es pot realitzar una determinació quantitativa dels productes relacionats amb la degradació de l'os que provenen dels telopeptids del col·lagen tipus I.

El *RatLapsTM ELISA* es basa en la unió competitiva d'un anticòs policlonal a la seqüència EKSQDGGR específica d'una part de la cadena $\alpha 1$ del telopeptid C-terminal del col·lagen tipus I de rata. Durant el pas de preincubació els fragments de col·lagen I eren immobilitzats per unió als pous amb estreptavidina. Els pous eren seguidament netejats i s'hi afegien 20 μ l dels estàndards, els controls i les mostres a analitzar (en el nostre cas, sèrum de rata). Tot seguit s'hi afegia 100 μ l de la solució d'anticòs primari (anticòs policlonal de conill) que era incubat tota la nit a 4°C. Al dia següent a la incubació amb el primari es realitzava el pas d'incubació durant 1 hora amb l'anticòs secundari (100 μ l) que estava conjugat amb peroxidasa. Després de la tercera sèrie de rentats es procedia al revelat amb l'addició del substrat cromogènic (TMB) el qual era incubat durant 15 minuts a temperatura ambient i en la foscor. Finalment la reacció era aturada amb 100 μ l d'àcid sulfúric i era mesurada l'absorbància a 450 nm amb referència a 650 nm. El nivell d'absorbància era inversament proporcional a la concentració d'antigen de la mostra.

2.2.4. Mesura de la formació d'os: determinació d'osteocalcina en el sèrum

Per determinar si hi havia o no formació *de novo* d'os, nosaltres vam mesurar els nivells d'osteocalcina en sèrum mitjançant l'assaig comercial *Rat-MidTM Osteocalcin Elisa* de Nordic Bioscience Diagnostics. L'osteocalcina, també coneguda com a proteïna Gla, és una proteïna que s'uneix al calci. És el major component de la matriu òssia no col·làgena i es sintetitzada pels osteoblasts a l'os. Durant la formació òssia es sintetitzada nova osteocalcina que s'incorpora a la matriu extracel·lular òssia, tot i això,

una petita porció d'aquesta osteocalcina és alliberada a la circulació. Com que l'osteocalcina del sèrum prové exclusivament de l'os, els seus nivells en sang reflecteixen l'activitat dels osteoblasts, per tant, és un bon marcador de la formació òssia. Per mesurar els nivells d'osteocalcina en el sèrum dels animals vàrem preincubar osteocalcina biotinitzada en els pouets de l'assaig que tenien unida estreptavidina durant 30 minuts a temperatura ambient. Després dels rentats, es procedia a l'adició de 20 µl dels estàndards, els controls i les mostres a analitzar; a continuació es procedia en l'adició de 100 µl d'anticòs primari i es deixava incubar durant 60 minuts a 20°C en agitació constant. Passada aquesta hora, es realitzaven diversos rentats i s'incubava durant 60 minuts més amb 100 µl d'anticòs secundari. Es netejaven els pouets i s'hi afegia 100 µl de solució substrat que s'incubava durant 15 minuts en la foscor. Finalment la reacció era aturada amb 100 µl d'àcid sulfúric i mesurada l'absorbància a 450 nm de longitud d'ona.

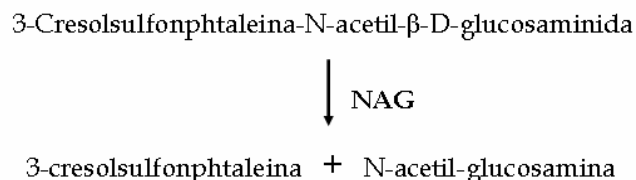
2.2.5. Mesura dels nivells sèrics de 1,25-Dihidroxitamina D₃

Per l'anàlisi dels nivells de 1,25-Dihidroxitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] vam utilitzar l'assaig comercial *IDS 1,25-Dihydroxy Vitamina D EIA* de Immunodiagnosics Systems Ltd. que es basa en la purificació de 1,25(OH)₂D₃ per immunoextracció a partir de mostres de sèrum i la seva posterior quantificació. El primer pas del mètode es basava en l'eliminació dels lípids de les mostres amb un reactiu que ens proporcionava la pròpia casa comercial. Tot seguit es procedia a l'extracció durant 90 minuts de la 1,25(OH)₂D₃ mitjançant unes immunocàpsules que contenien un anticòs monoclonal anti-1,25(OH)₂D₃ altament específic en fase sòlida. El gel d'immunoextracció es netejava i la 1,25(OH)₂D₃ purificada s'el·luïa directament en un tub de vidre. Els eluats reconstituïts i els calibradors de l'assaig s'incubaven tota la nit amb 100 µl d'un anticòs oví anti-

1,25(OH)₂D₃. Una porció de la solució anterior s'incubava en agitació constant durant 90 minuts en pous d'una microplaca revestits amb un anticòs específic antioví. Seguidament, s'afegien 100 µl de 1,25(OH)₂D₃ unida a biotina i s'agitava la placa durant uns 60 minuts més abans de l'aspiració i la neteja. S'afegien 200 µl d'avidina marcada amb peroxidasa que s'unia selectivament al complex de biotina i, després d'un pas addicional de neteja, es revelava el color utilitzant 200 µl del substrat cromogen (TMB). L'absorbància de les barreges de reacció es llegia en un lector de plaques a 450 nm amb 650 nm de referència, essent la intensitat de color inversament proporcional a la concentració de 1,25(OH)₂D₃.

2.2.6. Mesura dels nivells de N-Acethyl-β-D-glucosaminidasa (NAG)

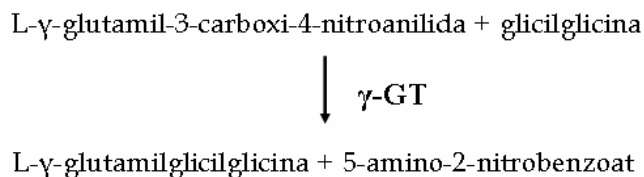
El NAG és un enzim lisosomal d'alt pes molecular que es troba en molts teixits del cos. Al ronyó, no passa al filtrat glomerular degut al seu alt pes. Tanmateix, la seva activitat és molt alta en cèl·lules tubuloproximals del ronyó. Quan hi ha una lesió en la cèl·lula tubuloproximal el seu nivell en orina augmenta i per tant es usat com a marcador de necrosi cel·lular tubular. Per mesurar els nivells de NAG en orina d'animals tractats amb NMDA vàrem utilitzar un assaig colorimètric que ens proporcionà Roche. El mètode es basa en la mesura de l'activitat enzimàtica de NAG sobre el substrat 3-Cresolsulfonphtaleina-N-acetil-β-D-glucosaminida. L'enzim interacciona amb aquest substrat convertint-lo en 3-cresolsulfonphtaleina i en N-acetil-glucosamina, productes que es poden quantificar per tal de determinar l'activitat enzimàtica.



La metodologia constava de la barreja de 50 µl de mostra d'orina amb 1 ml de solució substrat. Es deixava incubar la barreja 15 minuts a 37°C després dels quals s'hi afegia una solució de carbonat sòdic per aturar la reacció. El resultat era analitzat en un espectrofotòmetre a 580 nm de longitud d'ona. L'activitat enzimàtica era proporcional a l'absorbància obtinguda.

2.2.7. Mesura de l'activitat de la Gamma-glutamilttransferasa (γ-GT)

La γ-GT és un enzim catalític àmpliament distribuït en membranes cel·lulars i es troba predominantment en la vora en raspall de les cèl·lules del túbul proximal renal, pàncrees, fetge, epiteli de l'intestí prim i cervell. L'augment en la concentració de γ-GT és un indicador molt sensible de dany hepàtic. A més a més, també n'apareixen nivells elevats com a conseqüència del consum de certes drogues, tals com alcohol, barbitúrics, antiepilèptics i contraceptius. Per tant, analitzant l'activitat d'aquest enzim en orina podem determinar si hi ha hagut algun tipus de dany com a conseqüència de l'administració de diferents substàncies, en el nostre cas de NMDA. Per mesurar l'activitat γ-GT vàrem utilitzar el L-γ-glutamilt-3-carboxi-4-nitroanilida (Thermo Electron) com a substrat soluble. La γ-GT present en la mostra catalitza la transferència del grup glutamilt des del substrat cap a glicilglicina formant glutamiltglicilglicina i 5-amino-2-nitrobenzoat.



La velocitat de formació de 5-amino-2-nitrobenzoat es proporcional a l'activitat de l'enzim γ -GT present en la mostra i es pot mesurar cinèticament. Així, vam barrejar 10 μ l de mostra d'orina amb 200 μ l del substrat, ho vam incubar 5 minuts i vam llegir l'absorbància a 405 nm.

3. ESTUDIS EN TEIXITS

3.1. Obtenció i emmagatzematge de les mostres

Els estudis en teixit van ser realitzats en rates sanes tractades amb NMDA (10mg/Kg/dia). Disposàvem també d'un grup control en que els animals eren tractats amb aigua ja que aquesta era la substància usada com a vehicle pel NMDA.

Els animals eren sacrificats amb pentobarbital (50 mg/Kg), dessagnats mitjançant un tall a l'artèria aorta i perfosos amb PBS per eliminar completament les restes de sang dels ronyons i de les glàndules paratiroides. A continuació eren extrets els ronyons així com les glàndules paratiroides amb l'ajut d'un microscopi de dissecció.

Els ronyons eren dividits en tres fragments: una part era congelada a -80°C per la posterior extracció de proteïnes per a l'anàlisi per western blot; la segona era conservada en *RNA later* (Ambion), substància que estabilitza i protegeix el RNA en mostres fresques, i congelada a -20°C perquè es mantingués fins l'extracció de mRNA; la tercera part era fixada en paraformaldehid al 4% per la seva inclusió en parafina.

Les glàndules paratiroides eren congelades en grups de com a mínim 10 unitats a -80°C per al seu anàlisi posterior.

A més a més, vàrem realitzar estudis de microscòpia electrònica en que les mostres eren tallades i fixades amb gluteraldehid just després de la seva obtenció.

3.2. Amplificació en cadena de la polimerasa (PCR)

3.2.1. Extracció de RNA

Es van agafar 20 mg del teixit que estava guardat en *RNA later* i se'ls van afegir 1 ml de Trizol. El teixit va ser homogeneïtzat (*Ultra-Turrax T8*, IKA-WERKE GmbH & Co) fins a obtenir una suspensió fina. Seguidament es van afegir 200 µl de cloroform i es va centrifugar a 14000 rpm durant 15 minuts. El RNA va quedar separat en la fase aquosa i es va col·locar en un tub nou estèril. Vàrem precipitar el RNA amb 1 volum d'isopropanol per ml de Trizol utilitzat, es va invertir el tub suaument i es van centrifugar les mostres a 12500g durant 10 minuts. Es va eliminar el sobrenedant, es van afegir 500 µl d'etanol 70% i es va agitar el tub per tal que el pelet es dissolgués amb l'etanol. A continuació es van centrifugar els tubs a 9500g durant 5 minuts, es va eliminar el sobrenedant i es va deixar que el pelet s'assequés a l'aire durant uns minuts. Posteriorment vam hidratar el RNA amb aigua de peptona tamponada (DEP). Seguidament vam mesurar la concentració de RNA total mitjançant la lectura de l'absorbància en un espectrofotòmetre a 280 nm.

3.2.2. Síntesi de cDNA

Un cop obtingut el RNA total vàrem utilitzar 1 µg de mostra per la síntesi de cDNA mitjançant el kit *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche Diagnostics). El cDNA podia ser usat llavors per una PCR o per una PCR a temps real (RT-PCR).

3.2.3. PCR

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa, PCR, serveix per amplificar exponencialment una petita quantitat d'una seqüència nucleotídica específica en presència d'una seqüència motlle (1 µl), dos *primers* que hibriden les cadenes complementàries i flanquegen la regió

d'interès (0,2 µM de cada un) i 2 Unitats/reacció d'una DNA polimerasa termoestable (Taq DNA Polymerase, Invitrogen). La barreja es complementa amb el tampó adequat que ha de contenir el Mg²⁺ necessari per la polimerasa i 200 µM de cada dNTP. La reacció consta de repetits cicles (30) que inclouen la desnaturalització del motlle (95°C durant 20''), l'anellament dels primers (60°C durant 20'') i elongació dels primers per la polimerasa (72°C durant 30''). Al finalitzar es realitza un gel d'agarosa al 1,5% per tal de visualitzar els resultats.

Gen	Organisme		Seqüència (5'-3')
NaPi-2	<i>Rata</i>	<i>Fw</i>	CTGTCTCCCCACTTCCAGTC
		<i>Rv</i>	CAGAGGAGACCATGCTGACA
NHE3	<i>Rata</i>	<i>Fw</i>	ACTTCATGCCCAATCGACTC
		<i>Rv</i>	GATGATACGCACATGCTTGG
Na-K-ATPasa	<i>Rata</i>	<i>Fw</i>	GGCATCGTTGTGTACACTGG
		<i>Rv</i>	TGGCTGACGTCTTGTCAAAG
BSC-1	<i>Rata</i>	<i>Fw</i>	ACAAACGGAGTGGTGAGAGG
		<i>Rv</i>	CCAGCAAGAATCCCAGTAGC
GAPDH	<i>Rata</i>	<i>Fw</i>	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA
		<i>Rv</i>	AGATCCACAACGGATACATT
NMDA R1	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	AGACGTGGGTTCGGTATCAG
		<i>Rv</i>	AGGACCCATCAGTGTCTTGG
NMDA R2A	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	GTCCTTCTCCGACTGTGAGC
		<i>Rv</i>	ACTGCCCGTTGATAGACCAC
NMDA R2B	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	GCCTGAGCGACAAAAAGTTC
		<i>Rv</i>	CATCTCCCCATCTCCAAAGA
NMDA R2C	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	CGCTGGTCTTCAACAACCTCA
		<i>Rv</i>	GTCCTTGCCTGCCATGTAGT
NMDA R2D	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	TTCACCATTGGGAAATCCAT
		<i>Rv</i>	GGATAGTTGCTGCGGATGTT
GADPH	<i>Humà</i>	<i>Fw</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
		<i>Rv</i>	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

Taula 1. Primers utilitzats en la tècnica de PCR. El gen del GAPDH era utilitzat en els dos organismes com a control d'expressió.

Perquè la reacció sigui semiquantitativa en el mateix tub de PCR hi posàvem els primers específics per a dos gens: el que volíem analitzar i el GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa) que és un gen constitutiu que s'expressa en la mateixa quantitat en totes les cèl·lules (és un dels anomenats gens de *housekeeping*). Així obteníem la quantitat de mRNA del gen a estudiar en relació amb la quantitat de GAPDH. Els diferents gens analitzats amb aquesta tècnica són els de la taula 1.

3.2.4. RT-PCR

La tècnica de PCR a temps real a més d'utilitzar *primers* específics utilitza també una sonda específica per cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom que el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) llegeix i quantifica (com més fluorescència, més mRNA teníem de partida). El programa que vam utilitzar va ser de quaranta cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Tant els primers com les sondes van ser adquirides a Applied Biosystems. Els gens analitzats van ser: NMDAR (subunitats R1, R2A, R2B, R2C i R2D), VDR, 1 α hidroxilasa, CaSR, PreProPTH.

Els resultats eren obtinguts en forma de nombre de Ct (*cycle threshold*) que és el cicle de PCR en que comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA teníem de partida més baix era el Ct que obteníem de resultat. La quantitat relativa de mRNA de cada gen es va calcular de la següent manera: $\Delta Ct = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ del gen GAPDH}$, $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra} - \Delta Ct \text{ control}$. A partir d'aquests càlculs la concentració relativa de RNA en comparació al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Amb aquests valors vam calcular les mitges i els errors estàndards de cada mostra per triplicat.

3.3. Western Blot

3.3.1. Extracció de la proteïna

Tots els reactius utilitzats van ser adquirits a Sigma a no ser que s'indiqui el contrari. La mostra de teixit va ser parcialment descongelada i es va tallar un fragment de 20 mg amb un bisturí estèril. Cada fragment va ser col·locat en un tub estèril i va ser homogeneïtzat (*Ultra-Turrax T8*) en 200 µl de lysis buffer [125 mM Tris, 2% Sodi dodecàcil sulfat, inhibidor de proteïnases i PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*)]. Seguidament es van incubar les mostres en gel durant 30 minuts. Després de la incubació els lisats van ser centrifugats a 12.000 rpm durant 20 minuts a 4°C. Els sobrenedants van ser ràpidament congelats i emmagatzemats a -80°C fins el seu anàlisi. La concentració proteica de l'extracte va ser determinada segons el mètode de Lowry (*DC Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories).

3.3.2 Electroforesi i transferència

A 30 µg de proteïna se'ls hi van afegir 3 µl de tampó de càrrega 5X (250 mM Tris/HCl pH=6.8, 10% SDS, 25% β-Mercaptoetanol, 0.005% blau de bromofenol i 50% glicerol) a més de tampó de lisis fins un volum de 20 µl i es varen posar a 95°C durant 5 minuts, seguidament es van carregar en el gel. La separació de les proteïnes depenent del seu pes molecular es realitzava mitjançant una electroforesi en un gel de poliàcrilamida-SDS a la concentració adequada per a cada proteïna a analitzar i un amperatge constant de 25 mA/gel. Un cop les proteïnes eren separades es transferien a una membrana de PDVF (Immobilon-P). El mètode usat per la transferència era el *BioRad's MiniProtean System* on es formava un *sandwich* amb el gel, la membrana i paper Watman; tot això era col·locat en una solució de transferència (25 mM Tris, 192 mM glicina a pH=8,3) a 70 V durant 1 hora. En acabar, la membrana era bloquejada amb llet en pols descremada en TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

a una concentració del 3% durant una hora per eliminar les hibridacions inespecífiques.

3.3.3. Hibridacions i revelat

Tot seguit, vàrem incubar amb l'anticòs primari [NMDAR1 (1:1000; Affinity Bioreagents), 1 α hidroxilasa (1:1000; The Binding Site) o Tubulina (1:30000; Sigma)]. La incubació amb el primari era tota la nit a 4°C amb agitació constant. Al dia següent, es van fer diversos rentats amb TBST i vàrem incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (1:12500; Amersham Biosciences). La unió amb el secundari era detectada amb el *ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences) i analitzada amb el *VersaDoc Imaging system Model 4000* (BioRad Laboratories). Les senyals eren quantificades amb el software del *Quantity One* (BioRad).

3.3.4. Immunoprecipitació

Si la quantitat de proteïna de la que disposem és molt petita es pot intentar concentrar-la mitjançant una immunoprecipitació. En el cas de les glàndules paratiroides per tal de detectar la presència del NMDAR per western blot primer s'havia de fer una immunoprecipitació: es van posar 1 mg de proteïna total lisada com hem descrit anteriorment (en el cas del cervell que vàrem utilitzar com a control positiu amb 60 μ g es suficient) en un tub amb l'anticòs específic (1 μ g) i es van deixar que es formessin els complexos antigen-anticòs incubant a 4°C, durant 2 hores en rotació suau. Es va preparar la proteïna G acoblada a boles de sefarosa (Amersham Biosciences) al 50% i es va afegir a cada mostra. Es va incubar la barreja a 4°C, durant tota la nit en rotació per tal de que s'unissin la proteïna a l'anticòs i aquest a les boles de sefarosa. Posteriorment es varen rentar 3 cops les boles en el tampó de lisis, s'hi va afegir el tampó de càrrega i es va

incubar a 95°C durant 5 minuts per tal de que les boles de sefarosa es separessin de l'anticòs i la proteïna. Per finalitzar es va realitzar un western blot tal com hem descrit anteriorment per a NMDAR.

3.4. Microscòpia òptica

3.4.1. Preparació de les mostres

Com ja em comentat el teixit era fixat amb paraformaldehid al 4% immediatament després de l'extracció durant 2-24 hores. Després d'una sèrie de passos de deshidratació amb etanol a concentracions creixents (es comença per etanol a 60°, després al 70°, 96° i 100°, passos tots ells d'una hora) s'inclouen les mostres en parafina i eren tallades en seccions de 4 µm.

3.4.2. Tinció d'hematoxilina-eosina

Per analitzar les mostres en el microscopi òptic primer s'havia de realitzar una tinció d'hematoxilina-eosina. L'hematoxilina és un colorant que es comporta com els colorants bàsics i per tant té afinitat pels components àcids de la cèl·lula, com els àcids nucleics (DNA i RNA) i, en conseqüència, tenyeix els nuclis de color blau. L'eosina és un colorant àcid i, per tant, té afinitat pel grups bàsics com són els grups amino de les proteïnes. L'eosina tenyeix d'una forma generalitzada el citoplasma no especialitzat de color rosa. Amb la doble tinció d'hematoxilina-eosina s'aconsegueix que el citoplasma de les cèl·lules tingui un color rosat i el nucli blavós. Per realitzar la tinció d'hematoxilina-eosina primer s'havien de desparafinar els talls i això es realitzava seguint els passos a la inversa: xilol, alcohol 100°, alcohol 96° i alcohol 70°. Després es feien rentats amb aigua destil·lada i es deixava 15 minuts en hematoxilina de Harri's (Panreac). Es feia un rentat amb aigua corrent que provocava que s'oxidés l'hematoxilina i ens donés el típic color blavós. Es submergia amb HCl 1.2% en etanol 80% i es tornava a rentar amb aigua corrent durant 10 minuts.

Seguidament ho posàvem 5 minuts en eosina. Finalment, deshidratàvem de nou (etanol 70°, 96° i 100°, xilol i xilol-eucaliptol) i muntàvem els cobreobjectes amb DPX (BDH Laboratory Supplies).

Un cop les mostres ja estaven tenyides i seques eren analitzades en un microscopi òptic per determinar si hi havia diferències histològiques entre les mostres control i les tractades 4 dies amb NMDA.

3.5. Immunohistoquímica

3.5.1. Preparació de la mostra

Les seccions de les mostres eren obtingudes de la mateixa manera que les utilitzades per l'anàlisi per microscòpia òptica. Per poder realitzar la immunohistoquímica les seccions eren desparafinades i rehidratades amb xilol i etanols decreixents (100°, 96° i 70°). Per emmascarar l'activitat endògena de la peroxidasa que ens podria interferir en la senyal del nostre anticòs, vàrem incubar les seccions en 0.3% de H₂O₂ durant 30 minuts. Seguidament, es van bloquejar els talls de teixit amb 5% de llet en pols en tampó fosfat (PBS) i Tween 0.5% (Sigma) durant 30 minuts.

3.5.2. Hibridacions específiques

Una vegada les seccions ja estaven bloquejades es van incubar amb l'anticòs primari diluït (NMDA) en PBS durant tota la nit a 4°C. Al dia següent vam fer una sèrie de rentats amb PBS i vam incubar les mostres amb una solució d'anticòs secundari universal biotinitzat (Vectastain ABC kit, Vector Labs.) en una dilució 1:250 durant 1 hora a 20°C. Seguidament, es van incubar amb la solució ABC de Vectastain a una dilució 1:250 durant una hora. Per visualitzar el resultat vàrem utilitzar una solució al 0.05% de 3,3'-diaminobenzidina (que és un substrat de peroxidasa que dóna un producte marronós insoluble en alcohol) i 0.003% de H₂O₂ en tampó Tris-HCl a 0.1 M i pH 7.6 durant 5-10 minuts controlant la reacció sota un microscopi. Vàrem

obtenir controls negatius de la immunohistoquímica incubant sense anticòs primari.

3.5.3. Mecanisme d'acció del *Vectastain ABC kit*

El mètode utilitza les propietats del complex avidina-biotina. L'avidina és una glicoproteïna de 67 kDa, tetramèrica, que presenta en la seva superfície regions hidrofòbiques a les que s'uneix amb gran afinitat la biotina. La biotina és una proteïna soluble en aigua de pes molecular baix (244 Da). Presenta un grup carboxílic que permet la seva unió als residus amino de les proteïnes. La biotinització és una reacció bioquímica que permet unir biotina a una gran varietat de molècules com enzims, lectines, anticossos, àcids nucleics, etc... La petita mida de la proteïna fa que l'addició de biotina no modifiqui dràsticament les propietats de la molècula. Els mètodes immunocitoquímics que utilitzen el complex avidina-biotina poden visualitzar-se mitjançant el complex avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC). Així, s'utilitza un anticòs secundari biotinitzat al que s'unirà el complex avidina-peroxidasa que donarà un senyal amplificat del resultat.

3.6. Microscòpia electrònica

Per l'anàlisi de les mostres mitjançant el microscopi electrònic, les mostres havien d'estar fixades en gluteraldehid 2,5% en Tampó Fosfat 0,1 M a pH=7,4. El temps de fixació era de 2 a 24 hores en fred (4°C). Les mostres havien de tenir una mida inferior a 3 mil·límetres. A continuació es feien 3 rentats en tampó fosfat i es prosseguia en l'osmificació durant dos hores en fred per tal de fixar el teixit. L'osmificació era realitzada amb tetraòxid d'osmi al 1% en ferricianur potàssic. Després d'una sèrie de 3 rentats més amb tampó fosfat 0.1 M es duia a terme la deshidratació en series creixents d'acetona:

- Acetona 30% -10 minuts
- Acetona 50% - 10 min
- Acetona 70% amb acetat d'uranil en solució saturada – 24 hores a la foscor
- Acetona 96% - 10 min
- Acetona 100% - tres x 30 min

Tot seguit es feia la infiltració en Araldit de Durcupan (Fluka):

- Òxid de propilè - dos x 10 min en fred
- Òxid de propilè + resina I (3:1) - 45 min
- Òxid de propilè + resina I (1:1) - 45 min
- Òxid de propilè + resina I (1:3) - 45 min
- Resina I – de 24 a 48 hores a temperatura ambient
- Resina II – tres x 30 min a 60°C

A continuació es feia la polimerització en resina II 48 hores a 60°C.

Un cop la resina estava polimeritzada, obteníem talls ultrafins de 70-80 nm en un ultramicrotòtom (Leica) que eren muntats en una reixeta de coure. Les seccions eren contrastades amb citrat de plom Reynolds durant 7 min i la mostra era observada amb un microscopi electrònic de transmissió (Zeiss).

4. ESTUDIS *EX VIVO* EN GLÀNDULES PARATIROIDES

4.1. Obtenció de les glàndules paratiroides

Els animals (controls i nefrectomitzats) eren sacrificats amb pentobarbital (50 mg/Kg). L'animal era completament dessagnat i les glàndules paratiroides eren extretes amb l'ajut d'un microscopi de dissecció.

4.2. Incubació en medi iònic

Es feien grups de com a mínim 10 glàndules que eren col·locats en una membrana de niló i posats a incubar en 1 ml de solució iònica d'incubació (figura 15). La solució iònica contenia: NaCl a una concentració de 125 mM, KCl 5.9 mM, MgCl₂ 0.5 mM, piruvat sòdic 1 mM, glutamina 4 mM, glucosa 12 mM, Hepes 25 mM, 0.1 IU/ml d'insulina humana, 0.1% de sèrum boví fetal, 100 IU/ml de penicil·lina/estreptomicina i 1 mM de fosfat que obteníem afegint NaH₂PO₄ i Na₂HPO₄ en una proporció de 1:2 (tots els productes eren de Sigma); el medi contenia també 10 µM de glicina, que actuava com a cofactor del NMDA per tal d'activar el canal. Un cop havíem obtingut la solució iònica la tamponàvem a pH 7.4 [4]. El ClCa era afegit en darrer lloc per obtenir la concentració final adequada de calci en cada pas. Les glàndules eren mantingudes a 37°C en agitació constant.

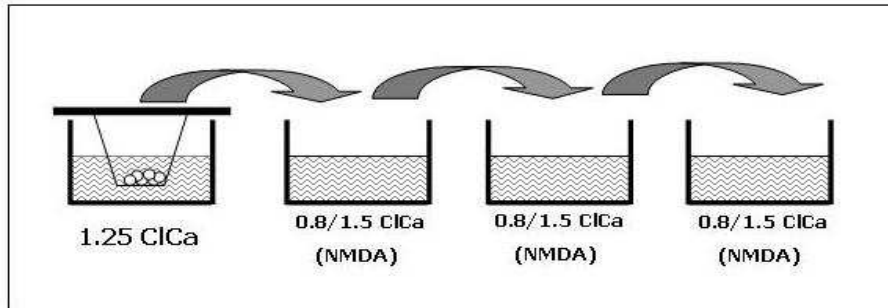


Figura 15. Incubació de les glàndules paratiroides en medi iònic. Les glàndules eren col·locades en una cistella de niló i incubades en un medi iònic especial. En primer lloc les glàndules eren incubades en 1,25 mM de calci que era comú per totes les condicions i era utilitzat com a valor basal de secreció. Seguidament es col·locava la cistella en medi amb baixa concentració de calci (0,8 mM) per fomentar la secreció de PTH o alta concentració de calci (1,5 mM) on la secreció de PTH es veia reduïda dràsticament. Disposàvem d'una sèrie de pous amb NMDA 500 µM i una sèrie sense NMDA que era utilitzada com a control.

Les 4 primeres hores eren a una concentració de calci de 1.25 mM per establir les condicions en que es trobaven les glàndules i per evitar que segreguessin PTH, tot i així, el medi era canviat cada hora. Seguidament

s'incubaven les glàndules a 0.8 mM de ClCa (concentració en que la secreció de PTH està estimulada) o 1.5 mM de ClCa (en que la secreció de PTH està el màxim d'inhibida possible) amb o sense NMDA (500 μ M); tots aquests passos d'incubació tenien una durada d'una hora. Eren recollides 3 mostres consecutives d'incubació amb NMDA; 3 sense NMDA que eren usades com a control; i també l'últim pas a 1.25 mM de ClCa al qual se li donava el valor de secreció basal (100). Un cop obtingudes les mostres eren mantingudes congelades fins al seu anàlisi. L'experiment va ser repetit en presència de MK-801 (un antagonista del receptor) i de PD-98059 (inhibidor de la via de les MAPK).

4.2.1. Mesura de la PTH

La mesura de la concentració de PTH alliberada al medi iònic per les glàndules paratiroides incubades amb i sense NMDA es va determinar mitjançant l'assaig comercial *Rat Intact PTH Elisa Kit* (Immunotopics) que ja he descrit anteriorment.

4.3. RT-PCR

Un cop finalitzada la incubació de les glàndules paratiroides, aquestes eren utilitzades per l'obtenció de mRNA i l'anàlisi per RT-PCR de diferents gens tals com NMDAR, CaSR, PreProPTH i VDR segons la metodologia explicada en l'apartat 3.2.

5. CULTIUS CEL·LULARS

5.1. Línia cel·lular HK-2

Per als experiments in vitro en cultius cel·lulars vàrem utilitzar les cèl·lules HK-2 (*human kidney 2*) que són una línia de cèl·lules immortals de túbul proximal que provenen de ronyó normal d'humà adult. Aquestes

cèl·lules les vam obtenir de la *American Type Culture Collection* (ATCC, n° de catàleg: CRL-2190).

5.1.1. Manteniment de la línia cel·lular

Les cèl·lules eren mantingudes en plaques de 10 mm de diàmetre en un incubador a 37°C, humidificat i al 5% de CO₂. El medi de cultiu era de Gibco i contenia: DMEM:HAM F12 (1:1); Hepes 20 mM; L-Glutamina 2 mM; 5% de sèrum boví fetal inactivat durant 30 minuts a 56°C i 1% de penicil·lina/estreptomicina. A més a més, el medi era complementat amb 1,12 g de D-glucosa anhidre, transferrina 5 µg/ml, Insulina 5 µg/ml, Dexametasona 5.10⁻⁸ M, T₃ 10⁻⁹ M, EGF 10 ng/ml i seleni 60 nM tots ells de Sigma.

5.1.2 Recollida de mostres

Les cèl·lules eren sembrades (5.10⁴/pou de 35 mm) i un dia després es començava amb el tractament amb NMDA que durava 4 dies. Al cinquè dia les cèl·lules eren recollides amb 1 ml de Trizol si es volia dur a terme l'extracció de mRNA o amb tampó de lisis per proteïnes si volíem obtenir mostra per la realització d'un western blot.

5.2. Mètode del Fluo-4

El fluo-4 és un fluorocrom utilitzat per a l'anàlisi d'increments de calci intracel·lular. És una molècula que té unida una seqüència acetoximetilester (AM) que li permet fusionar-se a la membrana cel·lular i entrar a l'interior de la cèl·lula. Un cop dins la cèl·lula, interacciona amb el calci i emet fluorescència. Els increments de calci intracel·lular es mesuren com increments en la fluorescència emesa. Per determinar aquests increments de calci utilitzàvem cèl·lules que estaven creixent en cobreobjectes. Els cobreobjectes on eren sembrades les cèl·lules es van

rentar amb solució de KREBS (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes i 11 mM Glucosa a pH=7.5) i van ser incubats amb 5 µM de Fluo-4-AM (Molecular Probes) durant 30 minuts a 37 °C. Els cobreobjectes es va muntar en un adaptador específic per al microscopi confocal *Nikon TE-200* i es va realitzar el tractament amb NMDA (500 µM). L'anàlisi es va dur a terme mitjançant l'estimulació de les mostres amb el làser a la longitud d'excitació 485 nm i emissió a 528 nm. Es van avaluar nivells de fluorescència màxims en presència de 10 µM de ionomicina i mínims amb 20 mM d'EGTA. Per aquests estudis es prenen imatges de tota la cèl·lula i s'analitzaven utilitzant el microscopi confocal i el mòdul *Ultraview* d'aquest (PerkinElmer Life Sciences). Les imatges es gravaven cada minut i finalment s'analitzaven usant el software de Life Sciences Ltd.

5.3. Producció de 1,25-hidroxivitamina D₃

Les cèl·lules eren sembrades (2.10⁴/pou de placa de 24 pouets) i un dia després es començava amb el tractament amb NMDA (500 µM) que durava 4 dies. Al cinquè dia s'afegia al medi 200 ng/ml de 25-hidroxivitamina D₃ (Sigma). Aquesta 25-hidroxivitamina D₃ era convertida en 1,25(OH)₂D₃ per l'enzim 1α-hidroxilasa que posseeixen totes les cèl·lules renals. Els nivells de 1,25(OH)₂D₃ produïda (proporcionals a l'activitat enzimàtica) van ser analitzats mitjançant l'assaig comercial *IDS 1,25-Dihydroxy Vitamina D EIA* que ja hem descrit anteriorment.

5.4. Anàlisi MTT

L'anàlisi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es realitza per tal de determinar l'activitat mitocondrial cel·lular. També pot ser usat per determinar la citotoxicitat de diferents substàncies. Les cèl·lules HK-2 eren plantades en plaques de 96 pouets i incubades

durant 4 dies en medi amb o sense NMDA a diferents concentracions. Llavors s'hi afegia 100 µl de la solució de MTT (0.5 g/l) a cada pouet i s'incubava a 37°C durant 45–60 minuts. Seguidament s'aspirava el MTT i s'afegia a cada pouet 50 µl de DMSO (dimetil sulfòxid). Les plates eren posades en agitació 10 minuts i es procedia a la lectura de l'absorbància a 590 nm i 620 nm de referència. La quantitat de color indicava la proporció de cèl·lules vives.

5.5. Cultius en 3 dimensions

Per tal de determinar si el tractament amb NMDA afectava d'alguna manera el correcte creixement de les cèl·lules HK-2 vàrem analitzar el creixement d'aquestes cèl·lules. Per fer-ho es van barrejar 30.000 cèl·lules amb 40 µl de col·lagen que havíem refredat en gel. El col·lagen s'havia tamponat prèviament: 8,5 ml de col·lagen + 1 ml PBS + 275 µl de NaHCO₃ 0.8 M. La barreja es dipositava sobre la placa, es deixava polimeritzar durant 30 minuts a l'incubador i seguidament s'hi afegia el medi que podia contenir o no NMDA (500 µM). Perquè les cèl·lules HK-2 puguin formar túbuls el medi ha de contenir HGF (*Human hepatocyte growth factor*) a una concentració de 20 ng/ml.

6. ESTUDI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

L'estudi estadístic dels resultats es va realitzar mitjançant l'ajuda del programa informàtic SPSS 14.0 per a Windows (SPSS, Inc.). Els mètodes estadístics utilitzats en aquest estudi van ser la comparació de mitjanes amb la prova T per a mostres independents. En el cas de mostres que provenien del mateix animal es va realitzar la comparació de mitjanes de mostres relacionades. Tots els resultats s'han expressat com a mitja ± error

estadístic (EEM). El grau de significació per a totes les proves es va establir per a una $p < 0.05$.

Resultats

1. EL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA PARATIROIDES

La primera part del treball experimental es basa en la demostració de la presència del NMDAR en la glàndula paratiroides i en l'estudi del seu paper en la regulació de la secreció de PTH.

1.1. Presència del NMDAR en la glàndula paratiroides

Mitjançant el mètode de RT-PCR vàrem determinar la presència de mRNA pel receptor de NMDA en la glàndula paratiroides. En la figura 16A, es pot apreciar la RT-PCR amb primers específics per les subunitats R1, R2A, R2B, R2C i R2D del receptor en la glàndula paratiroides comparant-ho amb els nivells presents en el ronyó (que utilitzàvem com a control). Els resultats indiquen que les subunitats presents en la glàndula paratiroides són el NR1 i totes les NR2. Cal destacar la gran quantitat de mRNA de les subunitats NR1 i NR2A.

La presència de la subunitat NR1 va ser detectada també mitjançant la tècnica d'immunoprecipitació i el posterior western blot, figura 16B, on utilitzàvem el cervell (60 µg de proteïna respecte a 1 mg de glàndula paratiroides) com a control positiu. Per immunoistoquímica també vàrem veure la presència del receptor, figura 16C, on veiem que la majoria de les cèl·lules de la glàndula paratiroides estan marcades amb l'anticòs específic, al contrari que el teixit tiroïdal on no s'aprecia marcatge.

La presència del receptor en la glàndula paratiroides suggereix que la seva activació podria tenir efectes en la síntesi i secreció de la PTH, que és la principal funció d'aquesta glàndula.

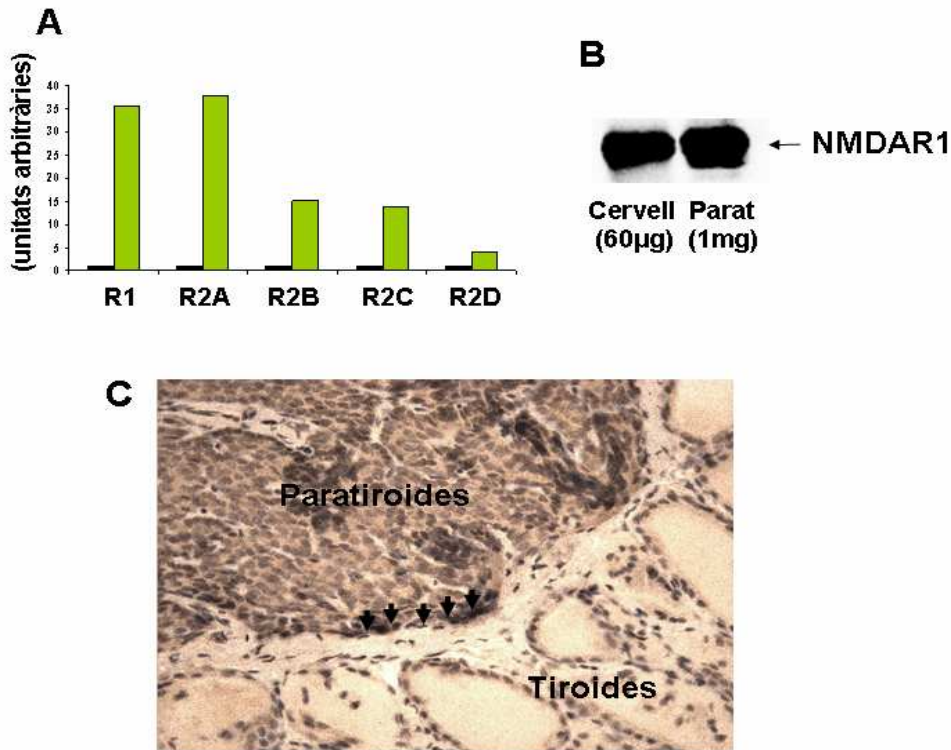


Figura 16. Presència del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides. A) RT-PCR per les subunitats de NMDAR en les glàndules paratiroides (barres verdes) en comparació amb el ronyó (utilitzat com a control). B) Immunoprecipitació i western blot on es pot observar la proteïna del NMDA R1, aquí utilitzàvem el cervell com a control positiu. C) Detecció del NMDA R1 mitjançant immunohistoquímica en la que s'aprecia marcatge en la glàndula paratiroides, al contrari que en la tiroides on no es veu marcatge.

1.2. Paper de l'activació del NMDAR en el control de la secreció de PTH

Un cop demostrada la presència del receptor en la glàndula paratiroides el següent pas era l'estudi del seu efecte un cop era activat. Aquesta activació del receptor per la unió del seu agonista i els seus efectes en la regulació de la secreció de PTH van ser estudiats en un model *ex vivo* (on es podien analitzar els nivells de secreció de l'hormona de les

glàndules paratiroides aïllades) i en models *in vivo* on es podia veure l'efecte de l'activació del receptor en la fisiologia d'un organisme viu.

1.2.1. Incubació de glàndules paratiroides

Per investigar l'efecte de l'activació del NMDAR en la secreció de PTH, vàrem usar primer un model *ex vivo* on després de l'obtenció de les glàndules aquestes eren incubades en un medi especial amb diferents concentracions de calci.

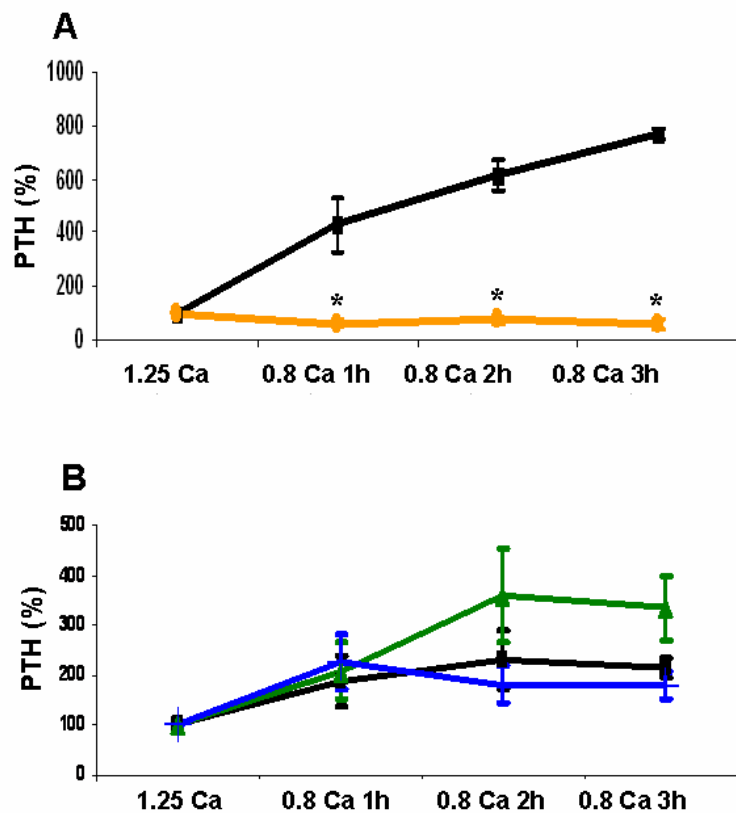


Figura 17. Incubació de glàndules paratiroides. A) Nivells de secreció de PTH en medi amb baixa concentració de calci on s'aprecia que al afegir NMDA hi ha una inhibició en la secreció de PTH. Línia taronja: NMDA, Línia negra: control. Els resultats estan representats com a percentatge de secreció \pm eem, essent el valor de secreció d'inici de 100. * $p < 0.05$ versus el control. B) PTH en medi amb baixa concentració de calci, tractament amb NMDA + MK-801 (antagonista del receptor; línia verda) i amb NMDA + PD-98059 (inhibidor de la via de les MAPK; línia blava). No hi ha diferències entre el control (negre) i la incubació amb presència de NMDA + MK-801 ni amb el NMDA + PD-98059.

En la figura 17A podem veure que les glàndules paratiroides de rata incubades en un medi on la secreció de PTH està estimulada (0.8 mM CaCl₂) presentaven un increment en l'alliberament de PTH que s'inhibia quan s'afegia NMDA al medi. Aquest efecte inhibitori no s'apreciava quan s'incubaven les glàndules en medi en alta concentració de calci on la secreció de PTH ja estava inhibida *per se*.

Com podem apreciar en la figura 17B, l'efecte inhibitori del NMDA en la secreció de PTH es veu abolit amb la coïncubació amb un antagonista del NMDAR, el MK-801. La inhibició causada pel NMDA també es veu suprimida per l'addició d'un inhibidor farmacològic de la via de les MAPK/ERK, el PD-98059.

1.2.1.1. RT-PCR de les glàndules paratiroides

Una vegada realitzada la incubació de les glàndules, es procedia a una extracció de mRNA i el posterior anàlisi per RT-PCR de l'expressió de diversos gens. No vàrem observar canvis en els nivells de mRNA de VDR, CaSR, NMDAR1 ni en els de PreProPTH (figura 18). La no presència de canvi en l'expressió de PreProPTH indica que el descens en els nivells de PTH són conseqüència de la inhibició de la secreció de l'hormona i no de la disminució de la seva síntesi ja que aquesta no es veu modificada.

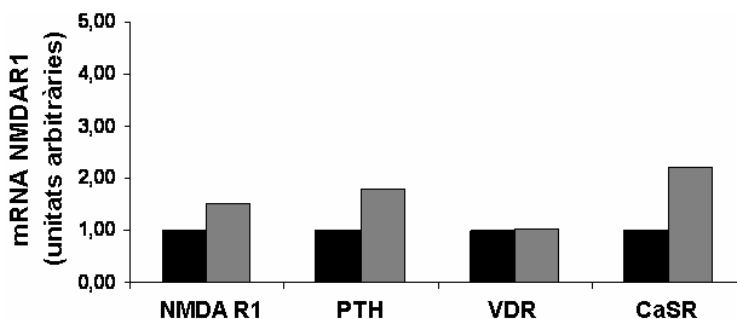


Figura 18. mRNA en la RT-PCR de les glàndules paratiroides. No s'aprecien canvis en l'expressió de NMDAR1, PreProPTH, VDR ni CaSR entre les glàndules incubades amb (gris) o sense (negre) NMDA.

1.2.2. Tractaments amb NMDA en rates

Rates Sprague-Dawley sanes rebien una injecció intraperitoneal de 10 mg/Kg de NMDA per tal d'estudiar els efectes de l'activació del receptor en un organisme viu. En la figura 19A veiem l'efecte en els nivells de PTH intacta circulant abans i després de l'administració de NMDA a diferents temps.

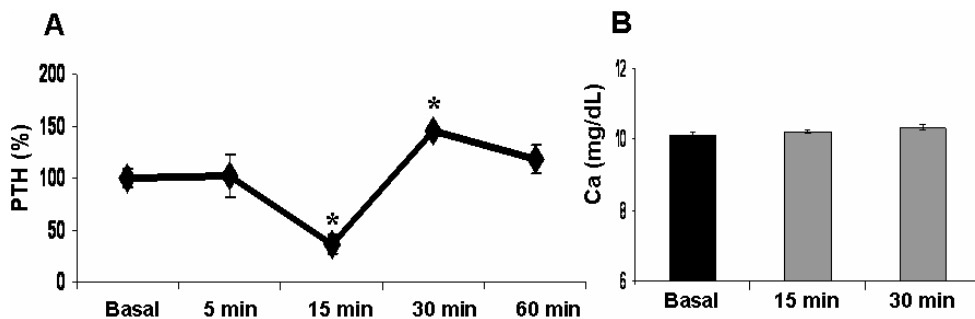


Figura 19. Nivells de PTH i calci en sang. **A)** Curs temporal dels nivells de PTH en sang després del tractament amb NMDA (10 mg/Kg). Els resultats estan representats com a percentatge de secreció \pm eem, essent el valor de secreció inicial de 100. * $p < 0.05$ vs el basal. **B)** Nivells de calci després de 15 i 30 minuts de tractament amb NMDA (gris) on no s'aprecien diferències amb el basal (negre).

Els nivells de PTH mostren un descens significatiu 15 minuts després de l'administració de NMDA, quan els valors de PTH només són un 36% dels que teníem de partida. A més, als 30 minuts posteriors al tractament veiem un increment en els nivells de PTH per tal de restablir els valors normals d'hormona circulant. Passats 60 minuts de tractament els nivells de PTH són pràcticament els mateixos que abans de l'administració de la droga. Aquest canvis en els nivells de l'hormona no anaven acompanyats de canvis en els nivells de calci total en sang ja que aquests no canviaven (figura 19B). O sigui, que la modificació de la secreció de PTH sembla ser que és una acció directa del NMDA sobre la glàndula i és independent de la concentració de calci sèric.

1.3. Activació del NMDAR en models animals amb PTH elevada

Un cop analitzat l'efecte de l'activació del receptor de NMDA en animals sans, vàrem voler-ne determinar les conseqüències en models animals en condicions patològiques com són els animals amb malaltia renal crònica (MRC) i animals amb hipocalcèmia, condicions ambdues on els nivells de PTH ja estan elevats de partida.

1.3.1. Animals amb MRC

Els mateixos experiments realitzats en animals sans van ser repetits en animals que patien de MRC. Així es va realitzar un tractament curt amb NMDA on es va recollir sang abans i després del tractament. Quan els animals ja estaven completament recuperats (passades unes setmanes) eren sacrificats i n'obteníem les seves glàndules paratiroides.

1.3.1.1. PTH en sang

Després de la injecció intraperitoneal de NMDA veiem que els animals amb MRC no responien al tractament ja que passats 15 minuts de la injecció no apreciàvem canvis en els nivells de PTH circulants quan ho comparàvem amb els nivells dels mateixos animals abans del tractament (figura 20A).

1.3.1.2. Incubació de les glàndules

Les glàndules de rates amb MRC un cop extretes i posades a incubar en el medi amb baix calci tampoc responien a la incubació amb NMDA. Val a dir que els controls d'aquestes glàndules tampoc responien als nivells de baixa concentració de calci en el medi ja que aquests animals expressen molt poc CaSR (figura 20B).

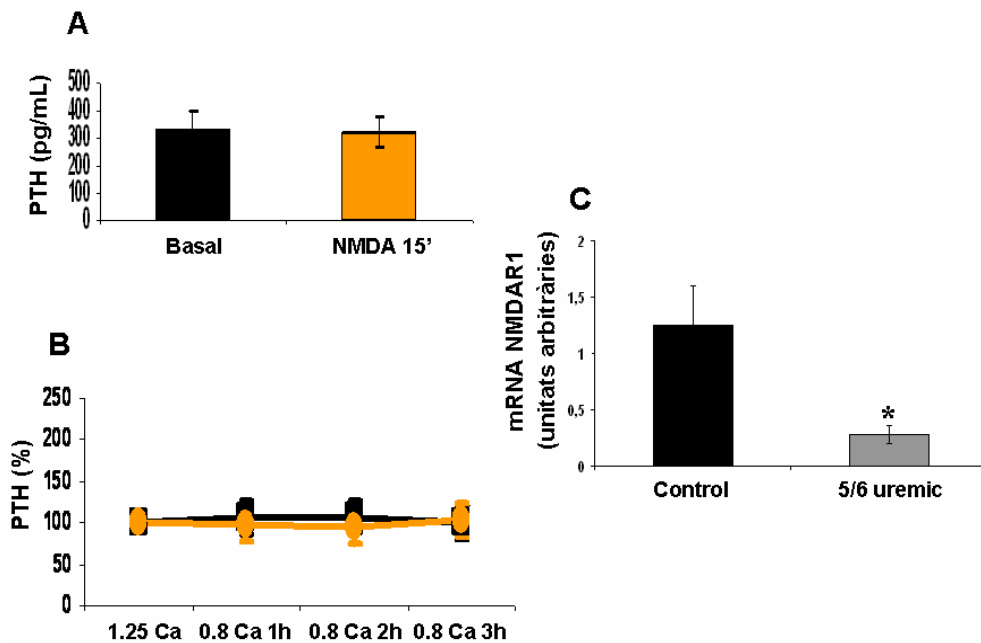


Figura 20. PTH en la Malaltia Renal Crònica (MRC). **A**) Nivells de PTH en sang després de 15 min de tractament amb NMDA (10 mg/Kg). Els valors estan representats amb la mitja \pm eem. **B**) Nivells de secreció de PTH en medi amb baixa concentració de calci on no s'aprecien diferències entre les glàndules incubades amb NMDA (taronja) i les incubades sense (negre). Els resultats estan representats amb un percentatge de secreció \pm eem, essent el valor de secreció d'inici de 100. **C**) Nivells de mRNA de NMDAR1 en glàndules d'animals amb MRC. Els valors estan representats amb la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el control.

Quan vàrem analitzar per RT-PCR els nivells d'expressió de NMDAR1 vam descobrir que estaven clarament inhibits si els comparàvem amb els nivells d'expressió en animals normals (figura 20C). En canvi els nivells de PreProPTH no es veien modificats. Per tant, en el desenvolupament de la MRC es va perdre l'expressió del receptor de NMDA.

1.3.2. Animals hipocalcèmics

En una altra sèrie d'experiments vàrem provocar un augment en la secreció de PTH però sense l'hiperparatiroidisme secundari provocat per

MRC mitjançant un clamp hipocalcèmic. Els animals eren tractats amb EDTA que provocava un descens en els nivells de calci circulant, aquesta baixada de calci provocava un augment en la secreció de PTH que era inhibida als 15 minuts mitjançant el tractament amb NMDA (figura 21A). Aquesta inhibició de la secreció es duia a terme tot i la persistència de la hipocalcèmia (figura 21B).

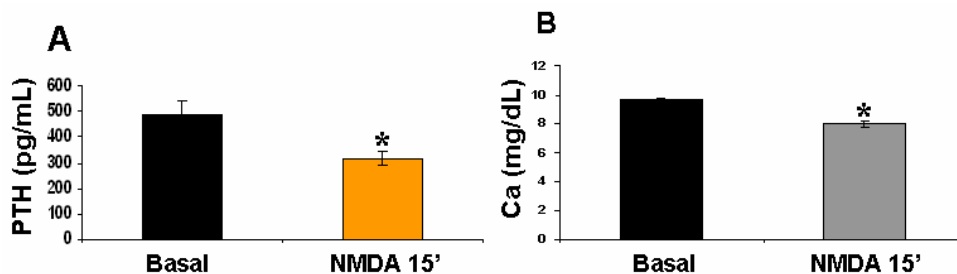


Figura 21. Activació de NMDAR en la hipocalcèmia. A) Nivells de PTH en sang després de 15 min de tractament amb NMDA. B) Nivells de calci en sang 15 min després de la injecció intraperitoneal de NMDA. Els valors estan representats com la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el basal.

2. EL RECEPTOR DE NMDA EN EL RONYÓ

La regulació de la secreció de PTH no és un procés que es duu a terme solament en la pròpia glàndula sinó que hi intervenen diversos factors externs. Un d'aquests factors és la vitamina D, la forma activa de la qual es sintetitza al ronyó, on curiosament també s'expressa el receptor de NMDA.

L'estudi de l'activitat del receptor en teixit renal el vàrem dur a terme en dos models experimentals clarament diferenciats com són els experiments *in vitro* amb cèl·lules HK-2, línia cel·lular provinent de ronyó humà adult, i amb experiments *in vivo*, on estudiàvem l'efecte del tractament amb NMDA en rates Sprague-Dawley.

2.1. Experiments *in vitro*

2.1.1. NMDAR en les cèl·lules HK-2

A través de la tècnica de PCR, vàrem detectar la presència de la subunitat NR1 i totes les NR2 en la línia de cèl·lules renals HK-2 (figura 22A). També es va detectar la proteïna per la subunitat NR1, sense la presència de la qual el receptor no es funcional (22B).

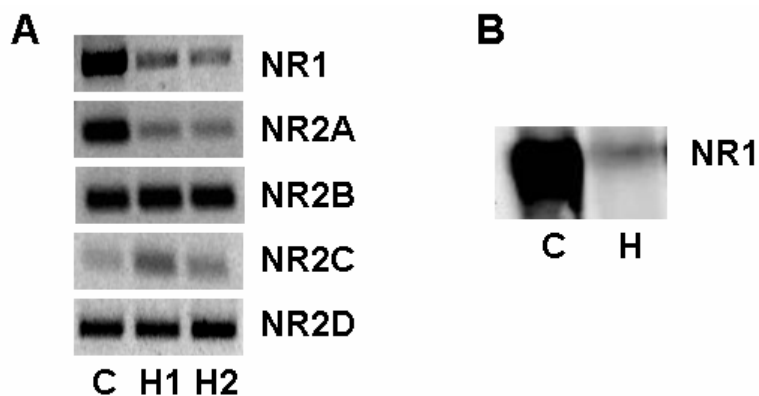


Figura 22. PCR per les diferents subunitats del NMDAR en cèl·lules HK-2. A) Es pot veure la presència del mRNA codificant per les subunitats NR1 i totes les NR2. B) Per la tècnica de western blot vàrem determinar la presència de la subunitat catalítica NR1 en la línia cel·lular renal.

2.1.2. Funcionalitat del NMDAR en les cèl·lules HK-2

Un cop determinada la presència del receptor en la línia cel·lular provinent de ronyó humà vàrem passar a comprovar si l'activació del receptor per part de l'anàleg induïa una entrada de calci dins la cèl·lula. La utilització del reactiu Fluo-4 permet l'anàlisi dels nivells de calci intracel·lulars. Per tant, mitjançant aquesta tècnica podem ser capaços de veure una entrada de calci a l'interior cel·lular. En primer lloc es carreguen les cèl·lules amb la substància fluorescent (Fluo-4) que s'unirà al calci emetent fluorescència que pot ser visualitzada i quantificada.

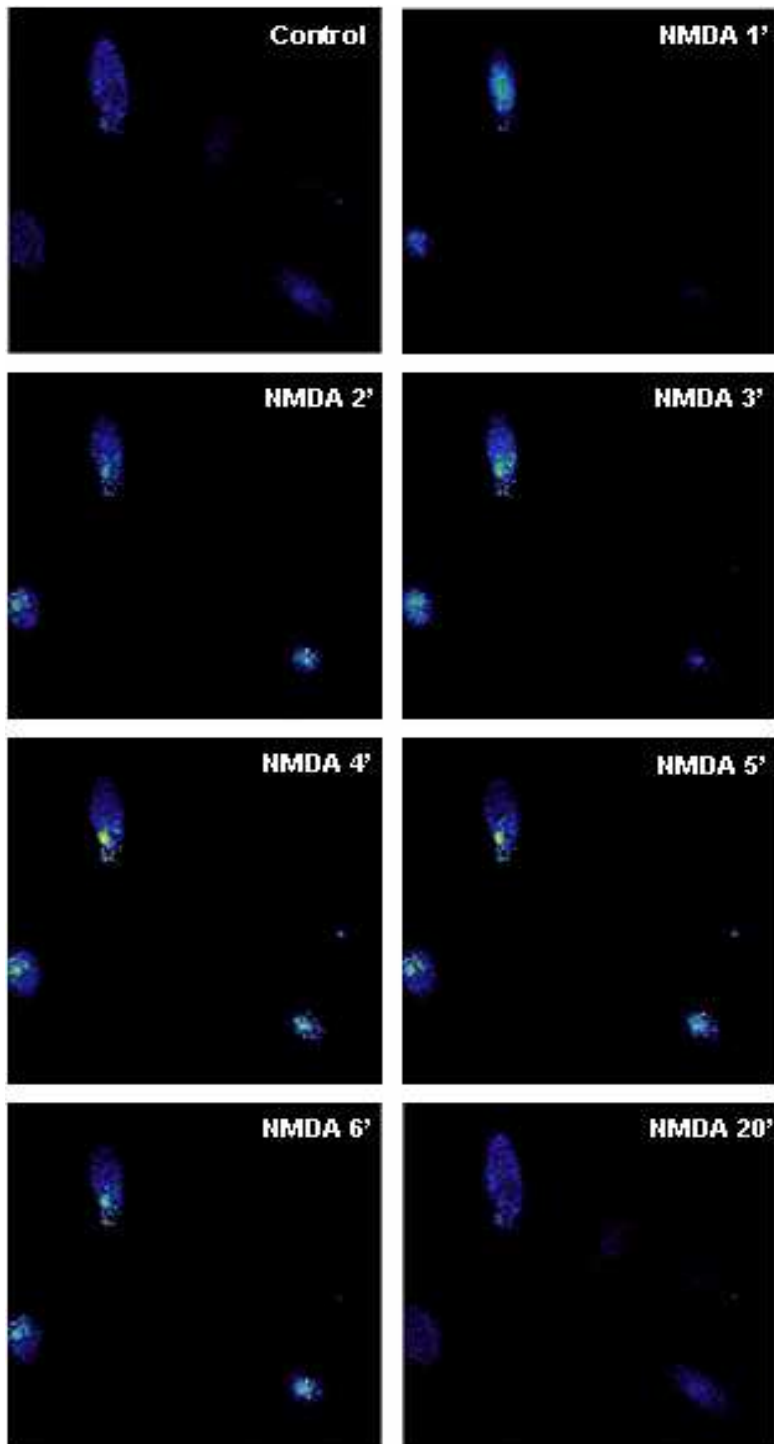


Figura 23. Activació del NMDAR en les cèl·lules HK-2. L'entrada de calci en la cèl·lula a través del receptor activat es pot visualitzar mitjançant l'emissió de fluorescència produïda pel Fluo-4, substància fluorescent que s'uneix al calci.

Tal com s'aprecia en la figura 23, quan s'afegia NMDA (500 μ M) al medi on hi havia les cèl·lules HK-2 hi havia un augment en la quantitat de calci intracel·lular provocat per l'entrada massiva d'aquest a través del canal de NMDAR que s'havia obert. Passat un cert interval de temps, els nivells de calci intracel·lular tornaven a baixar ja sigui perquè són internalitzats als diferents reservoris citoplasmàtics o perquè són expulsats novament a l'exterior.

2.1.3. Toxicitat del NMDA

2.1.3.1. Anàlisi per MTT

Mitjançant l'anàlisi per MTT vàrem veure que el tractament de les cèl·lules HK-2 amb NMDA a diferents concentracions durant 4 dies no era tòxic per les cèl·lules fins que no arribàvem a la concentració de 1 mM (figura 24). A 500 μ M/dia vàiem que les cèl·lules seguien creixent amb normalitat i els índexs de mortalitat eren molt semblants al control.

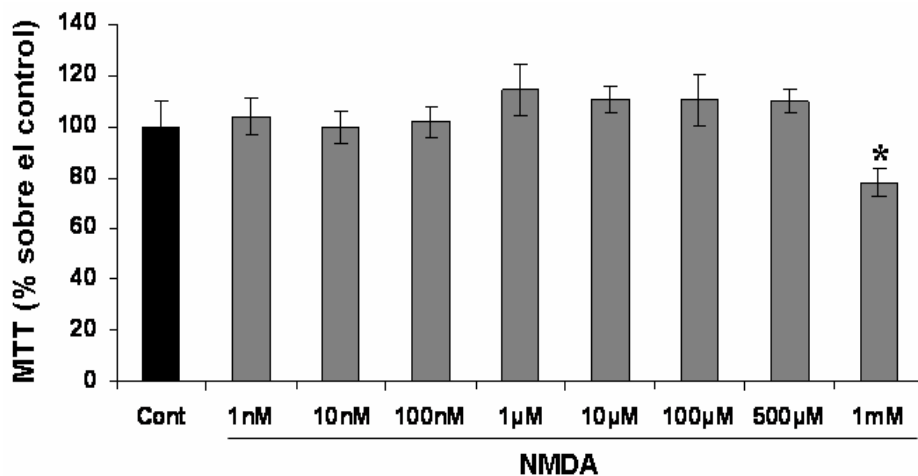


Figura 24. MTT per diferents concentracions de NMDA. El tractament durant 4 dies de les cèl·lules HK-2 a diferents concentracions de NMDA ens mostra que la viabilitat cel·lular no es veu modificada fins al tractament amb 1mM. Els valors estan representats com la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el control.

2.1.3.2. Cultius en 3 dimensions

Els cultius en 3 dimensions ens permeten observar el creixement i la formació de túbuls per part de les cèl·lules HK-2. Tal com s'aprecia en la figura 25 el tractament amb NMDA 500 μ M/dia no afectava ni el creixement ni la formació de túbuls de les cèl·lules.



Figura 25. Cultius en 3D. El tractament durant 4 dies de les cèl·lules HK-2 no modifica la seva capacitat per a formar túbuls, ja que no s'aprecien diferències entre el control i el tractament amb NMDA.

D'aquesta manera veïem que la dosi de 500 μ M utilitzada per als tractaments de les cèl·lules HK-2 no els hi era tòxica.

2.1.4. Nivells de vitamina D

Vàrem utilitzar la línia cel·lular renal per tal d'estudiar l'efecte de l'activació del receptor en la síntesi de la forma activa de la vitamina D, la 1,25(OH)₂D₃.

2.1.4.1. 1 α -hidroxilasa

Analitzant els nivells d'expressió de la 1 α -hidroxilasa vàrem veure que aquests eren inhibits al llarg del tractament amb NMDA (500 μ M/dia; figura 26). En canvi els nivells de VDR (receptor a través del qual la vitamina D exerceix la seva acció) no canviaven.

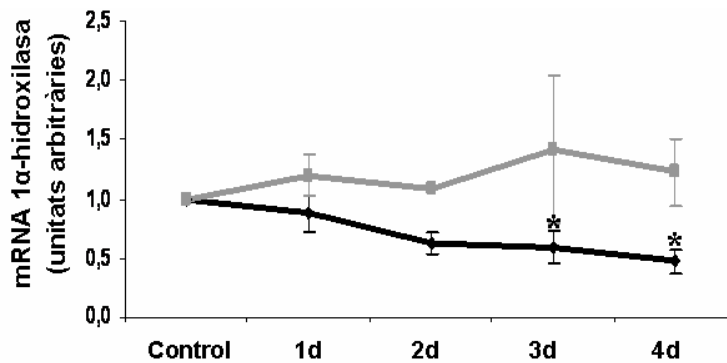


Figura 26. Enzim 1α -hidroxilasa en cèl·lules HK-2 al llarg del temps. A) PCR per mRNA codificant per l'enzim 1α -hidroxilasa (negre) al llarg de 4 dies de tractament amb NMDA ($500 \mu\text{M}/\text{dia}$). No hi ha canvis en l'expressió de VDR (gris). Els valors estan representats com la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el control.

2.1.4.2. Producció de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Vàrem mesurar també els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produïda per les cèl·lules. Tractàvem les cèl·lules durant 4 dies amb NMDA ($500 \mu\text{M}/\text{dia}$) i el quart dia afegíem $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($200 \text{ ng}/\text{ml}$) al medi durant una hora. Com que aquestes cèl·lules posseeixen 1α -hidroxilasa es produïa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que era alliberada al medi i podia ésser mesurada.

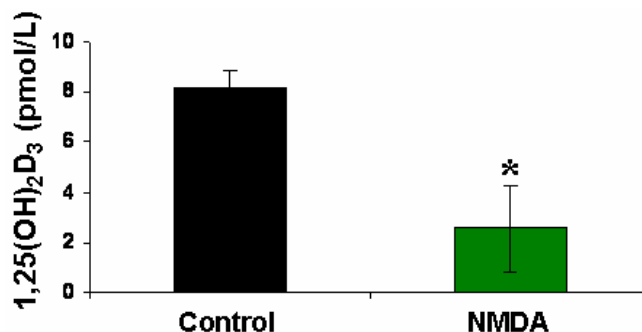


Figura 27. Nivells de producció de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Nivells de producció de la forma activa de la vitamina D en cèl·lules HK-2 tractades durant 4 dies amb NMDA. S'aprecia un descens significatiu en la producció de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en les cèl·lules amb tractament. Els valors estan representats com la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el control

Comparant la producció en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb NMDA veiem que la producció $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ era menor en les

tractades (figura 27), cosa que indica que l'activitat de l'enzim 1 α -hidroxilasa es veu inhibida.

2.2. Experiments *in vivo*

2.2.1. NMDAR en el ronyó

La presència de la subunitat NR1 del receptor en cèl·lules renals ha estat àmpliament demostrada. En el nostre grup a través de la tècnica de RT-PCR, no només vàrem veure la presència de la subunitat NR1 sinó que les cèl·lules renals de rates Sprague-Dawley expressaven totes les subunitats NR2 (figura 16A).

2.2.2. És el NMDA tòxic per al ronyó?

La primera cosa que ens vàrem plantejar (igual que en el cas dels experiments *in vitro*) va ser analitzar si el tractament amb l'agonista del receptor a una dosi de 10 mg/Kg/dia durant 4 dies podia tenir efectes nocius sobre el correcte funcionament del ronyó.

Mitjançant tècniques de microscòpia òptica i electrònica vàrem comparar teixit renal de rates tractades amb NMDA durant 4 dies i d'animals sans i vam veure que no hi havia diferències en quan a l'anatomia histològica entre els dos (figura 28A i 28B respectivament).

Endemés, també vàrem analitzar els nivells de Gamma-glutamilttransferasa (γ -GT) i de N-Acethyl- β -D-glucosaminidasa (NAG) d'animals control, amb 4 dies de tractament amb NMDA i amb isquèmia aguda (utilitzats com a control positiu de dany renal).

Quan hi ha algun tipus de dany en l'organisme tant els nivells de γ -GT com els de NAG augmenten (tal com es mostra en els animals amb isquèmia aguda) en canvi amb el tractament amb NMDA aquests efectes tòxics no es presentaven. Els resultats els podem apreciar en les figures 28C i 28D respectivament.

D'aquesta manera vàrem posar de manifest que la dosi de 10 mg/Kg/dia de NMDA no tenia efectes tòxics per al ronyó.

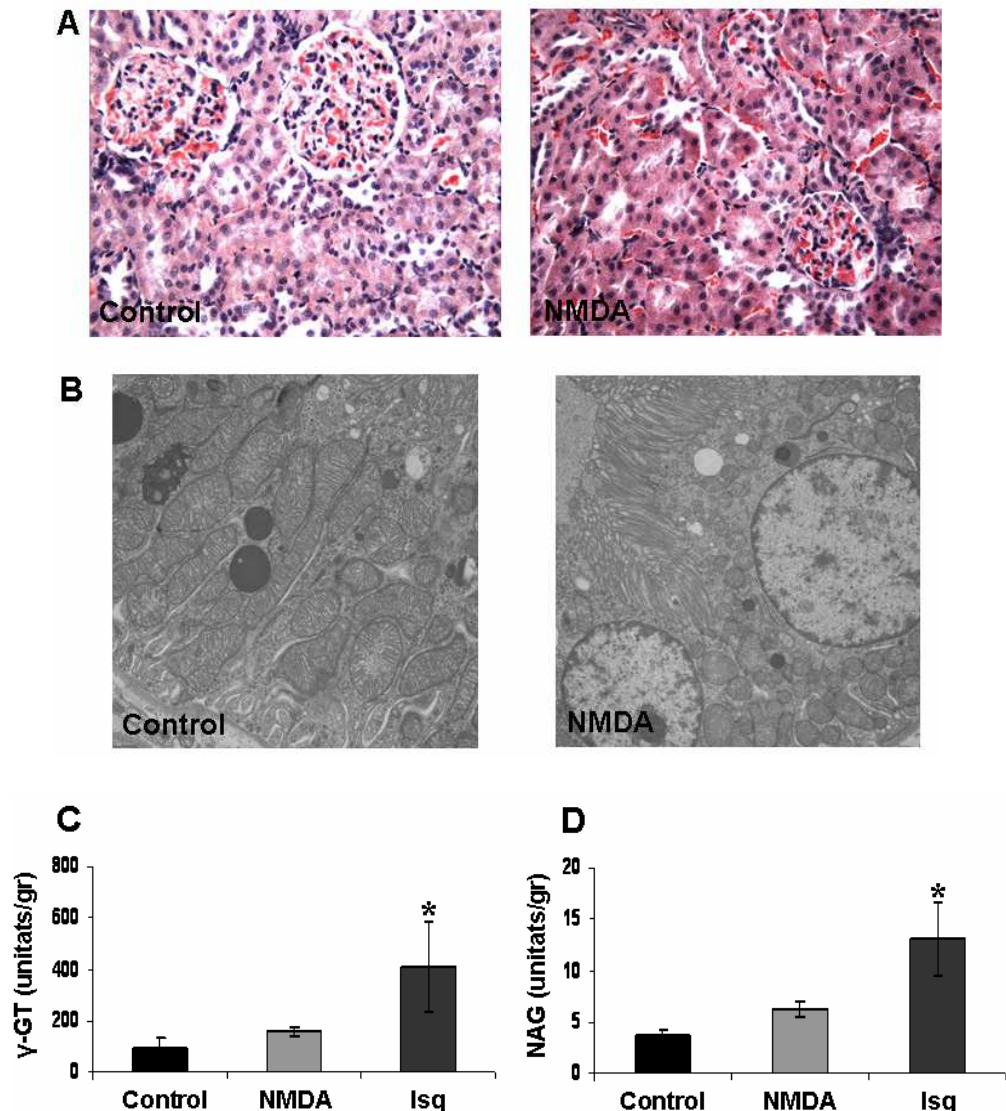


Figura 28. Toxicitat del tractament amb NMDA durant 4 dies. A i B) Comparació entre teixit renal de rates control i rates tractades amb NMDA durant 4 dies mitjançant la tècnica de tinció amb hematoxilina eosina i la tècnica de microscòpia electrònica respectivament. C i D) Determinació dels nivells de Gamma-glutamilttransferasa (γ -GT) i de N-Acethyl- β -D-glucosaminidasa (NAG) entre animals control, tractats amb NMDA (10 mg/Kg) i animals amb isquèmia aguda (usats com a control positiu de dany renal). Els valors estan representats com la mitja \pm eem (unitats de l'enzim en relació amb els grams de proteïna del teixit analitzat). * $p < 0.05$ vs el control.

2.2.3. Efectes de l'activació del NMDAR en els nivells de PTH

Al tractar els animals amb NMDA durant períodes llargs de temps (4 dies) els nivells de PTH es veuen clarament alterats. Al contrari que el que passa en temps de tractament curt, la PTH augmenta (figura 29A) en animals amb 4 dies d'administració de la droga.

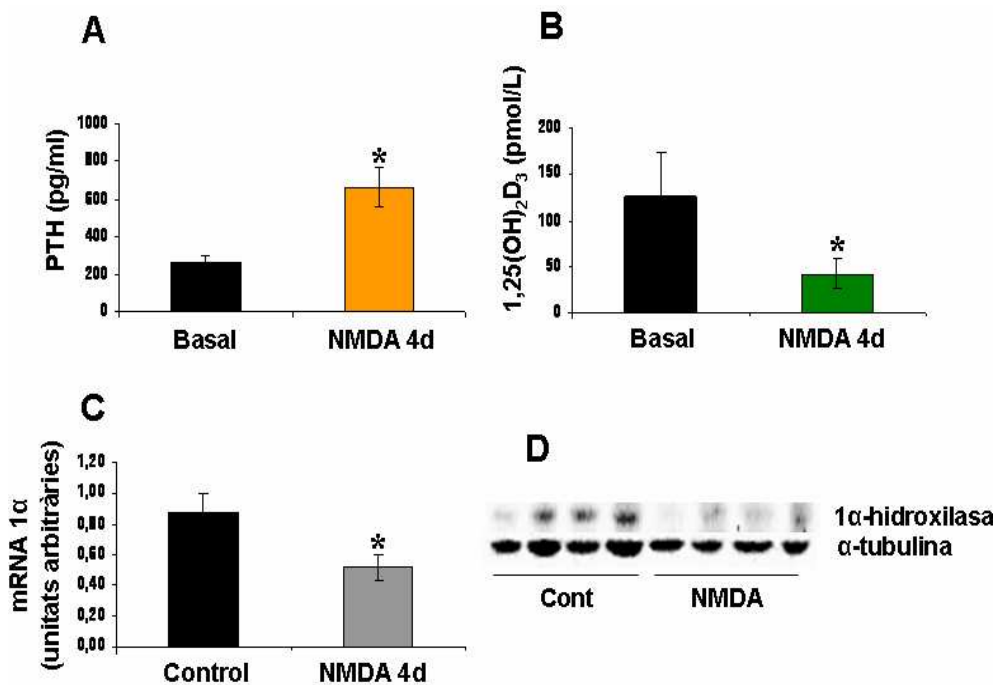


Figura 29. Nivells de PTH i 1,25(OH)₂D₃. **A)** Nivells de PTH intacta abans i després del tractament durant 4 dies amb NMDA (10 mg/Kg/dia). **B)** Nivells de 1,25(OH)₂D₃ en els mateixos animals. **C)** Expressió de l'enzim 1α-hidroxilasa (1α) en teixit renal d'animals control i animals tractats amb NMDA 4 dies. Els valors estan representats com la mitja ± eem. *p < 0.05 vs el control o el basal. **D)** Western blot de 1α-hidroxilasa on s'aprecia que la quantitat de proteïna present en el ronyó d'animals control és superior a la dels animals tractats amb NMDA.

Els nivells de PTH circulants depenen de diversos factors entre ells la vitamina D, la forma activa de la qual es sintetitzada al ronyó per l'enzim 1αhidroxilasa. Per tant, podem suposar que aquests nivells de PTH alts no són un efecte directe del NMDA sobre la glàndula paratiroides (on ja hem

vist que a curts intervals de temps, produeix just l'efecte contrari) sinó que són una conseqüència del descens en els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, forma activa de la vitamina D (figura 29B).

Els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ depenen de l'activitat de l'enzim 1α -hidroxilasa renal. Si analitzàvem la presència d'aquest enzim veiem que estava clarament disminuïda en els animals amb 4 dies de tractament amb NMDA (figura 29C i 29D). Així, la baixada d'expressió i activitat de l'enzim 1α -hidroxilasa provocava un descens en els nivells de vitamina D activa suggerint un possible mecanisme de regulació de la síntesi i secreció de PTH, augmentant-ne els seus nivells circulants.

2.2.4. Efectes de l'activació del NMDAR en el funcionament renal

A més dels nivells de PTH i de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en sang, gràcies a la utilització de les gàbies metabòliques que ens permetien recollir l'orina dels animals abans i després del tractament; de la mesura de la pressió arterial; així com el control de la ingesta d'aigua i menjar, vàrem poder determinar en tot moment els diferents paràmetres metabòlics i bioquímics de cada rata (taula 2).

D'aquesta manera vam veure que el tractament amb NMDA durant 4 dies no provocava canvis ni en la quantitat d'aigua ni en la d'aliment consumit ja que en ambdós casos no hi ha diferències significatives (taula 2).

En el cas de l'anàlisi de la pressió sanguínia de cada animal, tampoc hi havia canvis ni en la pressió sistòlica ni en la diastòlica. Tampoc observàvem canvis en el número de batecs del cor per minut.

El recull de sang i orina abans i després del tractament també ens va permetre l'anàlisi de les variacions en la concentració de diferents ions en sang i la seva excreció en orina (taula 2).

n = 10	Basal	NMDA 4d	p
Menjar (gr)	13,22	13,97	n.s.
Aigua (ml)	27,5	25,91	n.s.
Volum d'orina (ml)	8	30	$p < 0.05$
Srm Calci (mg/dL)	11,42	9,87	$p < 0.05$
Srm Fòsfor (P) (mg/dL)	9,48	9,41	n.s.
Srm Potassi (K) (mEq/L)	4,96	5,63	$p < 0.05$
Srm Sodi (Na) (mEq/L)	138	140,5	n.s.
Srm Urat (AU) (mg/dL)	1,1	1,87	$p < 0.05$
Srm Magnesi (Mg) (mmol/L)	0,93	1,01	n.s.
Aclarament de Creatinina (ml/min)	1,48	1,11	$p < 0.05$
EU Ca (mg/dia)	4,77	1,2	$p < 0.05$
EU P (mg/dia)	2,04	19,6	$p < 0.05$
EU Na (mEq/dia)	0,45	1,2	$p < 0.05$
EU Albúmina (mg/dia)	0,025	0,13	n.s.
EU AU (mg/dia)	1,54	3,11	$p < 0.05$
EU K (mEq/dia)	2,18	1,98	n.s.
Osmolaritat (mOsm/Kg)	1440	396	$p < 0.05$
Fragments de col·lagen tipus I (ng/dia)	3127	8022	$p < 0.05$
Osteocalcina (ng/dia)	98,42	178,19	$p < 0.05$
Batecs per minut	436,63	412,86	n.s.
Sistòlica	120,73	121,09	n.s.
Diastòlica	87,06	92,83	n.s.
Mitja	97,94	102,16	n.s.

Taula 2. Paràmetres metabòlics i bioquímics del tractament amb NMDA durant 4 dies. Es pot apreciar la ingesta de menjar i aigua, el volum d'orina recollit gràcies a la gàbia metabòlica, i la concentració dels diferents ions en el sèrum i l'orina [expressat com a excreció urinària (EU)], així com la pressió sanguínea abans i després del tractament amb NMDA durant 4 dies. Es mostra la presència de diferències significatives ($p < 0.05$) o la seva absència (n.s.).

Els resultats obtinguts els podem separar en dos grans blocs:

- El relacionat amb l'excreció d'aigua i sodi: hi havia un augment en el volum d'orina i l'excreció urinària (EU) de sodi; així com un descens en l'aclarament de creatinina i en l'osmolaritat.

- El relacionat amb l'homeòstasi del calci i el fòsfor: existia un descens en l'EU de calci, un augment en la de fòsfor i una baixada en els nivells de calci en el sèrum i un augment en el col·lagen tipus I i l'osteocalcina.

2.2.5. Diüresis i natriüresis

Una de les primeres coses que ens van cridar l'atenció fou que després del tractament els animals presentaven un efecte diürètic i natriürètic molt clar.

Les excrecions de sodi i aigua estan estrictament relacionades ja que quan hi ha un augment en la reabsorció de sodi també hi ha un augment en l'excreció d'aigua degut als diferents processos osmòtics i oncòtics. També és lògic que si augmenta el volum d'aigua excretada l'orina contindrà menys concentració de soluts, d'aquí que l'osmolaritat en orina sigui menor.

Al augmentar l'excreció renal d'aigua i sodi s'activa el sistema de retroalimentació tubular (TGF). El TGF provoca una sèrie de canvis en l'absorció de sodi i aigua per tal de minimitzar les pèrdues d'aquestes substàncies.

2.2.5.1. Activació del TGF

L'activació del TGF degut a les grans pèrdues en aigua i sodi va quedar palès en un assaig amb Suramin. El suramin és un antagonista dels receptors purinèrgics on actua l'adenosina per tal de provocar una vasoconstricció de l'arteriola aferent i així disminuir el volum de FG. Quan hi ha un augment en la concentració de sodi en l'ultrafiltrat tubular, s'activa el TGF que té com a conseqüència l'alliberament d'adenosina entre altres reguladors del FG.

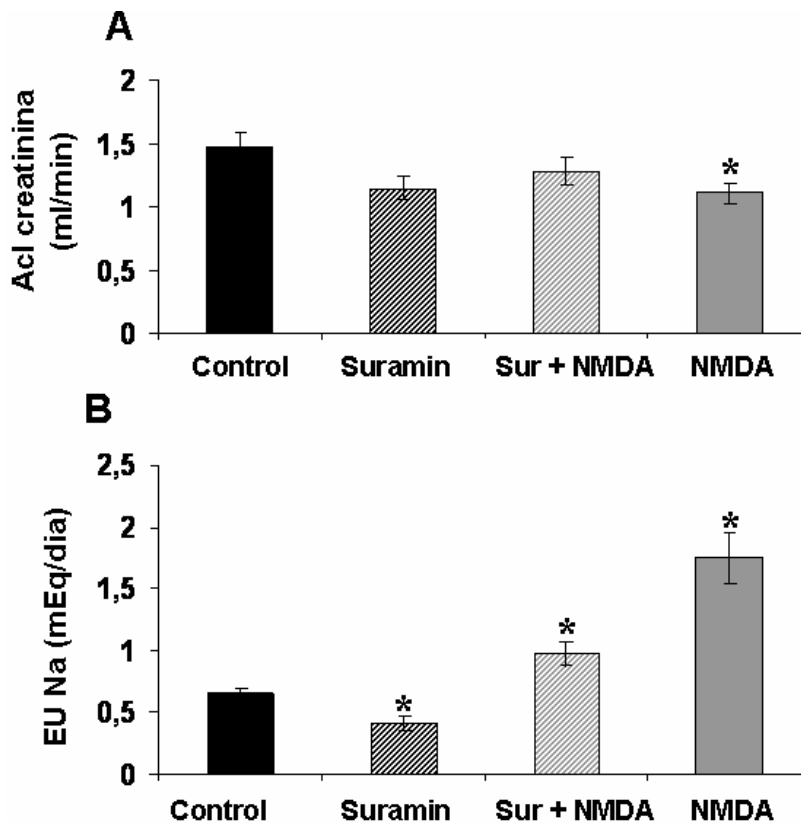


Figura 30. Tractament amb un inhibidor de la TGF, el Suramin. **A)** Aclariment de creatinina en rates control, tractades amb Suramin (50 mg/Kg/dia), amb NMDA (10 mg/Kg/dia) i amb Suramin + NMDA durant 4 dies. **B)** Excreció urinària de sodi en els mateixos animals. Els valors estan representats com la mitja \pm eem. * $p < 0.05$ vs el control.

En el nostre cas vàrem realitzar un estudi tractant rates amb suramin i suramin més NMDA per tal de determinar les conseqüències de l'augment en l'excreció de sodi en la regulació del FG. Com podem observar en la figura 30, el tractament amb NMDA durant 4 dies provoca un augment de la EU de sodi i un descens paral·lel del FG. Després de tractar les rates amb suramin + NMDA, es manté l'augment en la EU de sodi però s'elimina la baixada en el FG, per tant, sembla ser que les diferències en quan a FG que observem en el tractament amb NMDA són degudes a una activació del TGF.

2.2.5.2. Els transportadors de sodi tubulars

El sodi, un cop s'ha filtrat en el glomèrul, és reabsorbit en el túbul a través de diferents transportadors entre els que destaquen el NHE3, el NaPi2 i el BSC1 en la membrana tubular i la Na⁺,K⁺-ATPasa en la basolateral. Per tal de determinar si l'augment en l'excreció de sodi era degut a una baixada en la reabsorció tubular d'aquest, vàrem mesurar els nivells dels diferents transportadors de sodi presents al llarg del túbul renal.

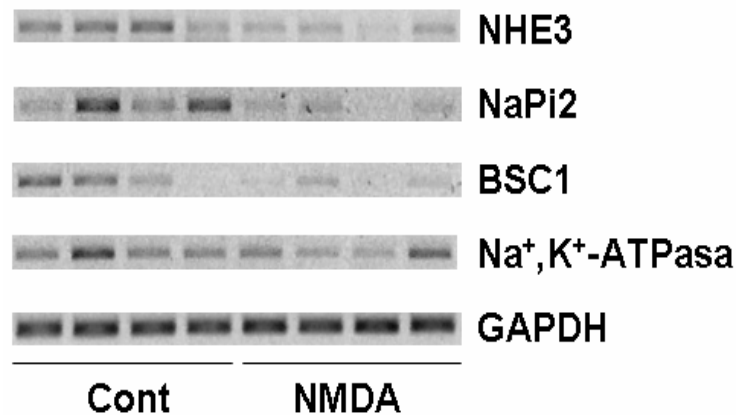


Figura 31. PCR pels diferents transportadors de sodi. Es pot veure que en la mostra obtinguda d'animals tractats durant 4 dies amb NMDA l'expressió d'aquests transportadors es veu inhibida sent significatiu en el cas del NHE3 i del BSC1.

Tal com s'aprecia en la figura 31 els principals transportadors de sodi en el túbul presenten una inhibició en la seva expressió en els animals tractats amb NMDA durant 4 dies, arribant a ser significativa en el cas del NHE3 i del BSC1. Per tant, podem suggerir que l'augment en la EU de sodi produïda pel NMDA es deu a una baixada en l'expressió dels transportadors de sodi renals.

2.2.6. Calci i fòsfor

El segon grup de resultats obtinguts a partir de l'anàlisi dels ions en sèrum i en orina són els relacionats amb l'homeòstasi del calci i el fòsfor.

Tal com es veu a la taula 2 quan tractem rates 4 dies amb NMDA hi ha una sèrie de canvis relacionats entre ells: l'EU de calci baixa i puja la de fòsfor; els nivells de calci en sèrum baixen; a més, els marcadors de remodelatge òssi com el col·lagen tipus I i l'osteocalcina estan més elevats, cosa que indica un augment en la resorció òssia. Tots aquests factors estan controlats per dos hormones: la PTH i la vitamina D, i aquesta última regula la síntesi i secreció de la primera.

Discussió

1. EL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA PARATIROIDES

El receptor de NMDA és un potent canal de calci de membrana que es troba principalment en el sistema nerviós central. És un canal ionotròpic de glutamat l'obertura del qual està regulada per la unió del seu lligand, el glutamat, i del seu cofactor, la glicina [134]. El paper del NMDAR ha estat àmpliament estudiat en el SNC on està involucrat en diverses funcions importants del desenvolupament neural i en formes de plasticitat sinàptica relacionades amb processos de memòria i aprenentatge [11,124]. Poc es coneix de la presència i funció del receptor fora del SNC encara que s'ha detectat també en altres teixits com la medulla adrenal, pulmons, illots pancreàtics, cor i aorta [88,112,170,176,206]. Estudis recents demostren també la presència del receptor de NMDA en l'os on estimula el remodelatge ossi [41,153] modulant l'activitat osteoclàstica. Endemés, s'ha detectat també en el ronyó [53] on juga un paper important en el manteniment del to arterial basal [21].

La presència del receptor de NMDA en òrgans que controlen la homeòstasi del calci (ronyó i os) indica que el receptor podria estar implicat en la regulació del metabolisme mineral, concretament en la homeòstasi del calci i del fòsfor. Una de les molècules més importants en la regulació d'aquests nivells sèrics de calci i fòsfor és l'hormona paratiroidal o PTH que es sintetitzada en la glàndula paratiroides. La PTH és un component essencial d'interacció entre el ronyó, l'os i l'intestí que exerceix un control molt estricte sobre els nivells de Ca^{2+} extracel·lular. La seva principal funció és la de regular la distribució del calci total de l'organisme. Així quan és secretada a la circulació sanguínia es duen a terme les seves accions: promoure la síntesi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al ronyó [63,67]; regular el transport renal de calci i fòsfor [136] i incrementar la resorció òssia [13,20,36]. És lògic pensar, doncs, que la glàndula

paratiroides podria expressar el receptor de NMDA i que l'activació d'aquest podria intervenir en la regulació de la secreció de PTH.

Per tot això, vàrem voler determinar si la glàndula paratiroides expressava el receptor de NMDA i si aquest estava involucrat d'alguna manera en la regulació de la secreció de la PTH.

El NMDAR és un tetràmer format per diferents subunitats NR1 i NR2 que constituïran un canal regulat per lligand que permet el pas de calci dins l'interior cel·lular un cop obert [134]. Recentment s'ha descobert una subunitat NR3 que pot formar part també del receptor però les funcions i localització de la qual encara no estan completament determinades [38,50]. Per tant, perquè el receptor sigui funcional és necessària la presència almenys de la subunitat NR1 i alguna de les NR2. En els nostres assaigs, hem identificat l'expressió tant de la subunitat NR1 com de totes les NR2 (sobretot hem apreciat l'alta quantitat expressada de NR2A) en teixit paratiroidal, suggerint la presència d'un NMDAR completament funcional.

El fet que el receptor estigui modulats per la unió del glutamat i la glicina, indica un nou paper dels aminoàcids neuroexcitadors en la funció de la glàndula paratiroides. De fet, la regulació de la secreció de PTH per aminoàcids no és un concepte nou. Hi ha nombrosos estudis que relacionen canvis en la homeòstasis del calci (secreció de PTH, EU de calci) amb els nivells de proteïna de la dieta suggerint una relació entre el calci i el metabolisme proteic [98,196]. D'aquesta manera, una dieta alta en proteïnes promou l'excreció urinària de calci [3,93] i una dieta baixa en proteïnes induïx hiperparatiroidisme secundari en absència de canvis en el calci ionitzat [97]. A més, s'ha vist que alguns aminoàcids (particularment els aminoàcids aromàtics) actuen com a reguladors al·lostèrics del CaSR regulant així la secreció de PTH [197]. A més, ha estat

publicat prèviament que aquests efectes reguladors poden ser mitjançant increments en el calci intracel·lular [43].

2. ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR DE NMDA EN LA GLÀNDULA PARATIROIDES

El receptor de NMDA s'activa per la unió del glutamat i la glicina, hi ha un compost però que funciona com a agonista per al glutamat i que també activa el receptor, és el NMDA. Aquest compost és un agonista selectiu del canal de NMDA i no activa els altres receptors ionotròpics de glutamat. Nosaltres vàrem utilitzar el NMDA per tal d'estudiar els efectes de l'activació del receptor i la posterior entrada de calci dins la cèl·lula paratiroidal. Vam analitzar la funcionalitat del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides tant en experiments *in vivo* com *ex vivo*.

El CaSR és una proteïna de membrana que es troba a la glàndula paratiroides i que detecta petites variacions en la concentració de calci extracel·lular modulant així la secreció de PTH. Si s'incuben glàndules paratiroides en un medi amb baixa concentració de calci, s'activa el CaSR que permet que aquestes glàndules secretin PTH, en canvi, si al medi la concentració de calci és elevada la secreció de PTH es veu inhibida. Si posem glàndules paratiroides aïllades en condicions de baixa concentració de calci veiem que hi ha un augment en l'excreció de PTH, en canvi, si afegim NMDA al medi veiem que la secreció de PTH baixa dràsticament. Aquest efecte però, no s'aprecia en el medi amb calci alt degut a que la secreció de PTH ja està molt baixa de partida i no es poden apreciar canvis addicionals. A més a més, aquest efecte inhibitori del NMDA pot ser bloquejat per l'addició de MK-801, un antagonista específic dels receptors de NMDA. El fet que el cotractament amb NMDA + MK-801 no produeixi canvis en la secreció de PTH indica que l'increment en la concentració de calci intracel·lular produït per l'activació del NMDAR és el que inhibeix

aquesta secreció. Els nostres resultats concorden amb d'altres publicats anteriorment on es demostra que l'activació dels canals de calci poden inhibir la secreció de PTH [61,62,146].

L'alliberament de l'hormona a la sang es regulada per la via de les MAPK. Aquesta via de les MAPK es activada per les PLC i les PKC (que poden ser fosforilades i activades pel calci extracel·lular a través del CaSR o del calci intracel·lular). Les MAPK actives fosforilen i activen la fosfolipasa A cíclica (cPLA₂), que allibera àcid araquidònic (AA) que es metabolitza en els seus mediadors biològicament actius que suprimeixen la secreció de PTH [179]. També es veu inhibició de la secreció de PTH mitjançant el tractament amb taspigargina que allibera el calci dels seus reservoris intracel·lulars augmentant-ne així la seva concentració citoplasmàtica [4,178]. El mecanisme pel qual el calci bloqueja la secreció de PTH ha estat àmpliament estudiat. Kifor *et al* [100] varen mostrar que increments en calci intracel·lular produïen també una ràpida fosforilació de les ERK 1/2 (un tipus de MAPK). Aquestes ERK 1/2 un cop activades poden fosforilar, al seu torn, els seus substrats citosòlics com la fosfolipasa A (PLA) [78,110] produint així un increment en la producció d'àcid araquidònic i regulant així l'alliberament de PTH [4,27]. Endemés, s'ha vist també que la inhibició de l'activitat d'aquestes ERK 1/2 induïdes per l'augment del calci intracel·lular [100] provoquen una davallada en la secreció de PTH [44]. Els nostres resultats mostren un descens en l'alliberació de PTH produïda pel NMDA que pot ser bloquejada amb l'adició de PD-98059, un inhibidor de la fosforilació de les MAPK, cosa que indica un paper de les MAPK en l'efecte de l'activació del NMDAR en la secreció de PTH, probablement mitjançant un increment del calci intracel·lular després de l'obertura del canal. A més, la baixada en la secreció de PTH no es deguda a un declivi en la seva síntesis, perquè l'expressió de PreProPTH no es veu modificada, sinó que es deu a una

inhibició del seu alliberament. Per tant, podem suggerir que l'activació del receptor de NMDA provoca una entrada de calci dins la cèl·lula que causa un augment en la concentració de calci intracel·lular. Aquest augment en el calci citoplasmàtic activa la via de les MAPK, a través de la fosforilació de PLC i PKC, i conseqüentment, hi ha una alliberació d'àcid araquidònic que serà metabolitzat en els seus mediadors biològicament actius que suprimeixen la secreció de PTH (figura 32).

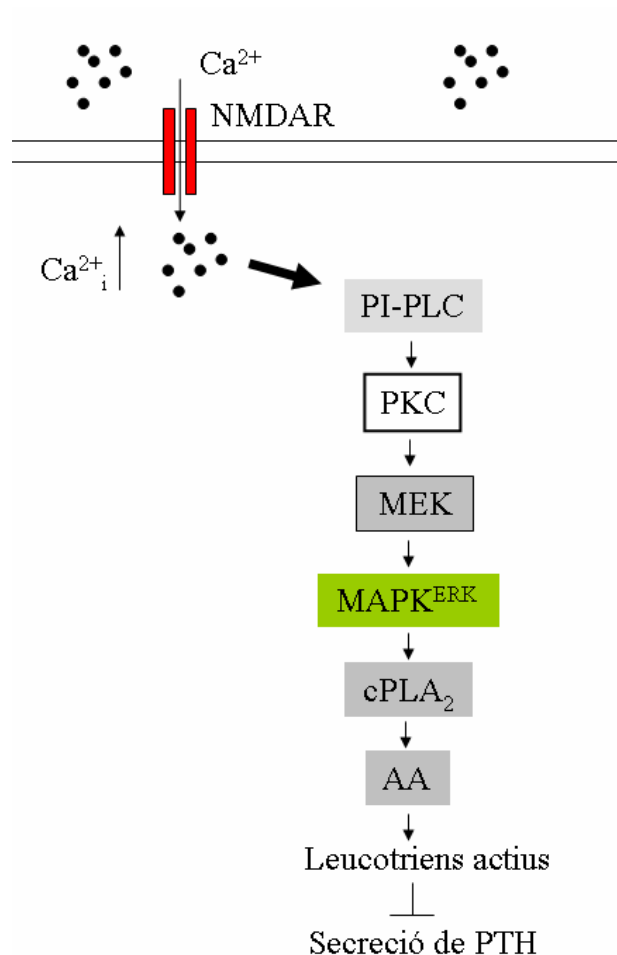


Figura 32. Possible via de regulació de la secreció de PTH pel NMDAR. L'augment de calci intracel·lular a través del pas pel canal del receptor de NMDA provoca l'activació de la fosfolipasa C (PLC) i la via de les MAPK que a través de la fosfolipasa A cíclica (cPLA) i l'àcid araquidònic (AA) inhibeixen la secreció de PTH.

El paper del NMDAR en la regulació de la secreció de PTH va ser demostrat també en el nostre model *in vivo* de rata, on els animals eren tractats amb NMDA (10 mg/Kg) i es recollien mostres de sèrum abans i després del tractament a intervals de temps diferents. L'administració de l'agonista del receptor a animals normals va provocar un descens del 60% en els nivells de PTH 15 minuts després del tractament. Passats 30 minuts de l'administració del fàrmac, els nivells de PTH varen incrementar-se i van retornar als seus nivells normals al cap de 60 minuts. El pic observat als 30 minuts pot ser explicat perquè, tal com havíem vist analitzant l'expressió de la PreProPTH, l'efecte de l'activació del NMDA sembla que actua a través de la inhibició de la secreció i no de la seva síntesi. D'aquesta manera, un cop el NMDA ha deixat d'exercir el seu efecte sobre la glàndula, hi ha una acumulació de PTH que pot ser alliberada de cop, incrementant així els nivells de secreció de manera puntual. A més, tots els canvis observats en els nivells de PTH van ocórrer sense canvis en els nivells de calci sèric, suggerint altre cop l'efecte directe del NMDA sobre la glàndula paratiroides i no a través de l'activació del CaSR per baixos nivells en la concentració del calci en el sèrum.

Els pacients amb malalties renals sovint pateixen de complicacions extrarenals que agreugen la seva ja de per si adversa situació. Un d'aquests agreujants és l'hiperparatiroidisme secundari (HPT2), que es caracteritza per una alta activitat òssia i per una secreció continua de PTH, provinent d'una davallada de calci i de la forma activa de la vitamina D, la 1,25(OH)₂D₃, com a resultat d'una reducció en el parènquima renal [49]. En estadis més tardans de l'HPT2, els nivells de CaSR i VDR en la glàndula paratiroides decreixen, dificultant així la glàndula de respondre a canvis en la modulació per calci i vitamina D [65,99]. En el nostre laboratori utilitzem models de rates amb nefrectomia 5/6 com a model d'estudi de l'HPT2. Aquests animals tenen només 1/6 del teixit renal i desenvolupen

una malaltia renal crònica (MRC) i el consegüent HPT2 en poques setmanes. Contràriament als resultats obtinguts en animals sans, quan tractem les rates urèmiques amb HPT2 amb NMDA no apreciem canvis en la secreció de PTH. Els mateixos resultats foren obtinguts a l'incubar les glàndules aïllades obtingudes d'aquests animals en un medi amb NMDA. Aquesta diferència pot ser deguda al fet que les glàndules provinents d'aquests animals amb HPT2 mostren un marcat descens en l'expressió de NMDAR, calculat a partir de l'expressió de NR1 que és fonamental en el funcionament del receptor. Aquests resultats indiquen que el NMDAR1 presenta un comportament similar al VDR i al CaSR, que també estan regulats a la baixa en l'HPT2 [65,99]. Així, la glàndula no respon a canvis en l'administració de NMDA de la mateixa manera que no es modulada per la vitamina D o pel calci.

En un altre assaig, vàrem voler demostrar si l'activació del NMDAR podia reduir la secreció de PTH en un model animal de PTH elevada diferent a l'HPT2. Vàrem escollir el clamp hipocalcèmic on mitjançant una injecció d'EDTA (un quelant del calci) induïem condicions de baix calci en sang que provocaven un augment en la secreció de PTH a través d'una disminució del senyal a través del CaSR. En aquests cas, al contrari que en l'HPT2, els nivells d'expressió del receptor no haurien d'estar modificats. El tractament d'aquests animals amb NMDA també produïa un descens en els nivells de PTH, inclús amb la persistència de la hipocalcèmia, provant així altre cop que l'activació del NMDAR pot modular la secreció de PTH independentment dels nivells de calci, i per tant de l'activació del CaSR.

Els nostres resultats demostren, per tant, que el receptor de NMDA es troba present en la glàndula paratiroides i està involucrat en la regulació de la funció de la glàndula inhibint la secreció de PTH. El mecanisme pel qual el NMDAR exerceix la seva funció és a través de l'entrada de calci en la cèl·lula paratiroidal amb la consegüent activació de la cascada de PLC i

MAPK. En condicions de urèmia, l'expressió del receptor es veu disminuïda i per tant, el tractament amb NMDA no modifica la secreció de PTH.

3. ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR DE NMDA EN EL RONYÓ

Analitzant l'efecte del tractament amb NMDA a més llarg termini (4 dies) en els nivells de PTH circulants, vàrem veure que aquests no només no disminuïen sinó que estaven molt augmentats. Aquest efecte que sembla contradictori amb els resultats obtinguts de l'anàlisi a temps curts no ho és si recordem que el receptor de NMDA també s'expressa en un altre òrgan que regula la síntesi i secreció de PTH. Aquest òrgan és el ronyó [53,54,112], on a través del control de la síntesi de vitamina D es regulen els nivells de PTH.

Nosaltres hem determinat la presència de les diferents subunitats del receptor (NR1, NR2A, NR2B, NR2C i NR2D) necessàries per al seu funcionament tant en el ronyó de les rates com en una línia cel·lular de cèl·lules de ronyó humanes, les HK-2. Hem vist que el receptor no només és troba en aquests dos models experimentals diferents, sinó que és funcional en tots dos.

Tanmateix, els estudis realitzats en el ronyó es basen fonamentalment en la relació entre el NMDAR i la formació d'òxid nítric (NO). En el cervell el Ca^{2+} que entra a través dels receptors de NMDA un cop aquests han estat activats, estimula la NOS1 gràcies a la presència de la PSD-95, que assegura que el calci que entra a través del NMDAR sigui selectivament acoblat a l'activitat NOS1 [9,29]. En el ronyó s'ha vist que la infusió sistèmica de glicina causa vasodilatació renal, que es bloquejada per l'addició d'inhibidors de NO [46]. La NOS1 s'expressa també en la màcula densa del ronyó [151], on modula el sistema de TGF [143]. Aquests

estudis indiquen que l'activació aguda del NMDAR pot estar relacionada amb la formació del NO i dels diversos efectes que aquest té en el sistema renal tals com en la regulació de la hemodinàmica renal, en el filtrat glomerular renal, en el mecanisme de pressió-natriuresis, en el procés de TGF [113], en el fracàs renal agut isquèmic [141] i en el desenvolupament del fracàs renal crònic, tant en models experimentals [1,10,30] com en pacients [23,144].

En el nostre cas, però, vàrem voler analitzar l'efecte de l'activació del receptor en un camp completament diferent com és el de la síntesi de vitamina D i la regulació de la secreció de PTH. En aquest sentit, el tractament amb NMDA durant 4 dies indica que l'activació del NMDAR en les cèl·lules renals provoca una davallada en l'expressió de la 1α -hidroxilasa tant *in vivo* com *in vitro*. Aquesta baixada en expressió de la 1α -hidroxilasa es tradueix en que els nivells de síntesi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es veuen disminuïts. D'aquesta manera, els nivells de la forma activa de la vitamina D en la circulació són més baixos tant en el model experimental animal com en les cèl·lules HK-2 tractades amb NMDA.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es sintetitzada a partir de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ per l'acció de la 1α -hidroxilasa renal [58]. L'activitat de l'enzim 1α -hidroxilasa està controlada per la pròpia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que juntament amb la PTH, l'interferó- γ i el factor de creixement insulínic incrementen la seva acció, mentre que el calci, el fosfat i el factor klotho disminueixen la seva activitat [26,163]. Altres estudis mostren que el promotor gènic de la 1α -hidroxilasa presenta elements de resposta per diferents factors de transcripció com l'AP-1 i l'AP-2 (*activating protein 1 i 2*), la Sp1 (*Specific protein-1*) i el NF- κ B [104,165]. De fet, un estudi de *Ebert et al.* relacionen una activació de NF- κ B amb un descens de l'activitat del promotor de la 1α -hidroxilasa i un estímul de l'expressió endògena del mRNA de la 1α -hidroxilasa per l'inhibidor del NF- κ B, la sulfasalazina, en cèl·lules HEK-293 (*human*

embryonic kidney cells 293) [59]. El NF- κ B és un complex proteínic que funciona com a factor de transcripció, està involucrat en processos de resposta cel·lular tals com l'estrès, les citoquines, els radicals lliures, la radiació ultraviolada, les LDL oxidades i els antígens bacterians o vírics. El NF- κ B també juga un paper important en la regulació de la resposta immune a la infecció. La incorrecta regulació de NF- κ B ha estat involucrada en processos de càncer, malalties inflamatòries i autoimmunes, xoc sèptic i infecció viral. S'ha implicat també NF- κ B en processos de plasticitat sinàptica i memòria [127,168]. De fet, es pensa que la major part d'aquestes implicacions en la plasticitat sinàptica i la memòria són degudes a l'activació de NF- κ B per part del receptor de NMDA [116,150]. D'aquesta manera el calci que entra pel canal de NMDA activa el factor de transcripció NF- κ B que es translocat al nucli de la cèl·lula on exerceix la seva acció. D'aquesta manera l'entrada de calci a través del canal NMDA podria produir una inhibició en l'activitat de l'enzim 1 α -hidroxilasa a través de l'activació de NF- κ B, cosa que provocaria una davalla en la síntesi de 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

A més dels baixos nivells de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ en el sèrum dels animals tractats durant 4 dies amb NMDA també veiem diferències en la concentració plasmàtica de calci i PTH. La vitamina D regula elements associats amb el procés d'absorció intestinal de calci com el TRPV6 i la calbindina-D9K [60,130]. El TRPV6 és un canal de calci de membrana que es troba a l'epiteli de l'intestí prim i és el màxim responsable de l'absorció de calci, i la calbindina-D9K és una molècula que facilita la difusió del calci a través la membrana intestinal. La 1,25(OH) $_2$ D $_3$ regula també la resorció òssia [58]. Així quan els nivells de vitamina D són baixos l'expressió dels gens relacionats amb l'homeòstasi del calci es veuen afectats i els nivells de calci en sang baixen.

El dèficit de vitamina D juntament amb la baixada del calci en sang, causen una activació de la glàndula paratiroides on es produeix un augment de la síntesi i secreció de PTH, tal com podem apreciar en les rates tractades 4 dies amb NMDA. Ha estat àmpliament demostrat que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ actua de manera basal a través del seu receptor, el VDR, per tal de regular la síntesi de PTH [58]. A més a més, la deficiència de vitamina D provoca una hiperplàsia de la glàndula paratiroides i un increment de la síntesi i secreció de PTH. L'administració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibeix la síntesi de PTH i el creixement cel·lular, per això aquest compost s'usa com a tractament per l'hiperparatiroidisme secundari [8,66,181]. El calci baix, en canvi, actua a través del CaSR per tal d'augmentar també la secreció de PTH. La baixa concentració de calci en sang incrementa la secreció de PTH a curt termini, els nivells de mRNA de PTH en hores i dies, i el nombre de cèl·lules paratiroidals si l'estimulació és prolongada [132,145].

3.1. Efectes d'una PTH elevada

L'augment de PTH causa una sèrie de modificacions en el control del calci i del fòsfor a nivell renal: mitjançant la seva actuació en el túbul proximal, en la porció gruixuda de la nansa de Henle i en els túbuls distals; augmenta la reabsorció de calci i magnesi, i disminueix la reabsorció de fosfats [17,94,136,161]. En els nostres animals els resultats concorden amb els estudis anteriors ja que hem vist que l'augment en la secreció de PTH produïda pel tractament amb NMDA durant 4 dies causa un augment en la reabsorció renal de calci i una disminució en la de fòsfor.

Per tal d'eleva els nivells de calci, la PTH també activa la resorció òssia [13,20,36]. A part d'això, a través dels diversos receptors de PTH presents als osteoblasts, la PTH té una gran varietat d'accions que estan directament involucrades en la promoció de formació òssia, tals com

canvis en l'activitat de diverses proteïnes, incloent el factor de diferenciació osteoclastogènica (TRANCE), RANKL o el lligand d'osteoprotegerina [164,205]. El més important fisiològicament però, és la seva acció en l'estimulació de la diferenciació i el desenvolupament dels osteoclasts per finalment promoure la resorció òssia.

Així la principal funció de la PTH és la de retornar els nivells de calci als seu estat normal, cosa que normalment s'aconsegueix en qüestió de minuts. En el nostre cas però, el fet que l'alta concentració de PTH circulant sigui incapaç de normalitzar els nivells de calci ens pot indicar o bé que hi ha una resistència de l'os a la reabsorció (cosa que veiem que no passa perquè hi ha un augment de la resorció òssia, encara que també hi ha creació de novo d'os) o que aquest calci sí que surt de l'os però es diposita en teixits tous. Tanmateix, s'ha de tenir en compte el fet de que el receptor de NMDA es troba present també en cèl·lules òssies on és necessari per al correcte funcionament d'aquestes cèl·lules [41,153]. L'activació del receptor està involucrada en el control de la maduració dels osteoblasts i provoca un increment en la deposició de calci i augmenta l'expressió d'osteocalcina [115]. Així, per una banda tenim formació de novo d'os (degut a l'activació del receptor en els osteoblasts) i per l'altra un augment de la resorció òssia provocada pels alts nivells sèrics de PTH. Aquesta balanç entre resorció i formació d'os pot no ser equilibrat i ser el responsable de que la PTH, tot i trobar-se en una alta concentració en sang, sigui incapaç de normalitzar els nivells de calci.

Endemés dels diferents efectes de la PTH sobre l'homeòstasi del calci, una PTH elevada pot modificar també la reabsorció de sodi renal. Estudis previs han demostrat que el tractament amb PTH està associat amb increments en la diüresis i la natriüresis [173,174], que causen canvis en l'activitat, el tràfic i l'expressió dels transportadors renals de sodi [198]. En el túbul proximal la isoforma NHE3 del transportador de Na/H és el

principal responsable de la reabsorció de sodi i bicarbonat [18]. El cotransportador apical de Na-P_i (la isoforma NaPi2) està involucrada en la reabsorció del 80% del fòsfat filtrat i pot estar involucrada també en la reabsorció d'una petita porció del sodi filtrat en el túbul proximal. Hi ha evidències que el tractament amb PTH està associat amb un descens de l'activitat [57,79,138], la ràpida degradació [156], i la redistribució i internalització de NHE3 i NaPi2 [209]. La bomba Na⁺,K⁺-ATPasa és la responsable del transport transepitelial del sodi reabsorbit en la membrana basolateral [95] i estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que el tractament amb PTH decreix o inhibeix l'activitat Na⁺,K⁺-ATPasa [171,209]. En la nansa de Henle, la reabsorció de sodi es duu a terme pel cotransportador apical BSC-1 amb l'ajut del NHE3, el canal de potassi ROMK i la Na⁺,K⁺-ATPasa basolateral [64,73]. Doncs bé, com a conseqüència de l'augment en els nivells de PTH degut al tractament amb NMDA tots aquests transportadors renals de sodi (NHE3, NaPi2, Na⁺,K⁺-ATPasa i BSC-1) veuen disminuïda la seva expressió provocant així un efecte natriürètic.

La reabsorció d'aigua està lligada a la reabsorció de sodi: el moviment de sodi des de la llum cap al líquid intersticial redueix l'osmolaritat total i al mateix temps augmenta l'osmolaritat en el líquid intersticial. Aquest gradient osmòtic des de la llum del túbul cap a l'espai intersticial causa una difusió neta d'aigua des de la llum a través de les membranes plasmàtiques cap al líquid intersticial [195]. D'aquesta manera al augmentar l'excreció urinària de sodi augmenta també la d'aigua.

Els canvis observats en la disminució del filtrat glomerular (FG) no són causats per una toxicitat del tractament amb NMDA (cosa que va quedar palesa en l'anàlisi per microscòpia òptica i electrònica, a més de la mesura dels nivells de γ -GT i de NAG) sinó que són conseqüència de l'activació del sistema de retroalimentació tubulo-glomerular (TGF). El TGF és el responsable de l'adequada excreció de sodi i aigua. Així, es

secreten una sèrie de vasodilatadors o vasoconstrictors cap a les arterioles aferents o eferents per tal de regular el filtrat glomerular (FG) i evitar la pèrdua de sodi i aigua. Una d'aquestes molècules és l'adenosina que provoca una vasoconstricció de l'arteriola aferent disminuint així el FG [194]. En el nostre model experimental, quan hi ha un augment en la concentració de sodi en l'ultrafiltrat tubular com a conseqüència de l'augment en PTH, s'activa el TGF que provoca una disminució del FG. El suramin és un antagonista dels receptors purinèrgics on actua l'adenosina, en conseqüència, funciona com a inhibidor del TGF. Per tant, quan tractem animals amb NMDA veiem un augment en l'excreció de sodi i una activació del TGF que es tradueix en un descens en el FG, en canvi al cotractar amb NMDA i suramin s'inhibeix l'activació del TGF i no veiem els canvis en el FG encara que es manté l'elevada excreció de sodi per l'orina.

Així doncs, podem resumir aquesta part del treball dient que l'activació del receptor de NMDA en el ronyó causa un augment en la síntesi i secreció de PTH degut al descens en els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. El descens en els nivells de la forma activa de la vitamina D són causats per la baixada en la síntesi i l'activitat de l'enzim 1α -hidroxilasa renal (possiblement a través de l'activació de NF- κ B). El descens en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (juntament amb la baixada en el calci sèric produït també per la vitamina D) produeixen un augment en la síntesi i secreció de PTH. Aquests nivells alts de PTH són els responsables de la disminució de l'excreció urinària de calci i l'augment en la del fòsfor, així com de l'augment dels marcadors de formació i degradació ossis. Els alts nivells de PTH en sang són també els responsables de l'augment en la diüresis i la natriüresis (figura 33).

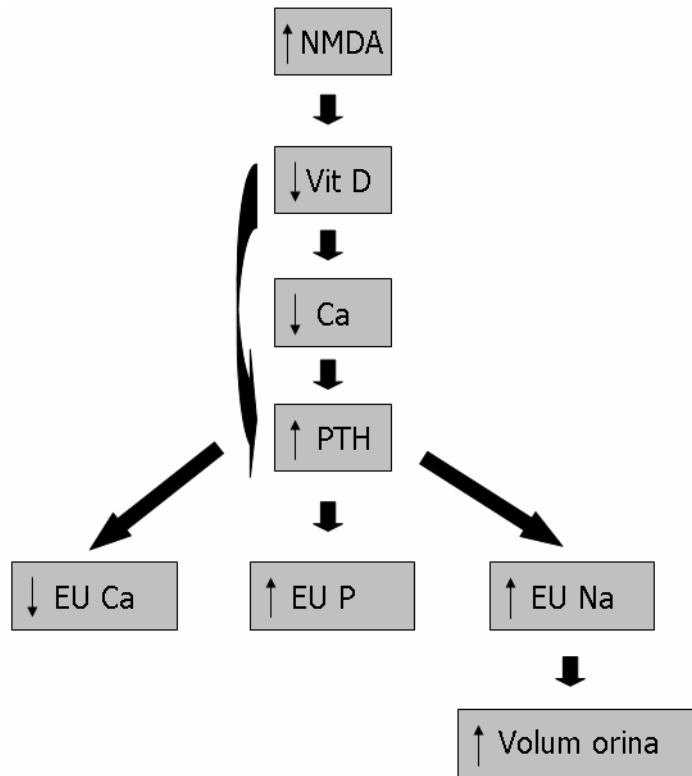


Figura 33. Efectes fisiològics de l'activació del NMDAR present en el ronyó. L'augment de calci intracel·lular a través del pas pel canal del receptor de NMDA provoca un descens en els nivells de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (probablement modulada per NF- κB) que juntament amb la baixada en el calci sèric produeixen un augment en la síntesi i secreció de PTH. Els alts nivells de PTH provoquen una disminució en l'excreció urinària de calci i un augment en la de fòsfor així com un increment de la diüresis i la natriüresis.

Els efectes de l'activació del receptor de NMDA sobre la secreció de PTH a llarg termini poden semblar contradictoris comparats amb el tractament a espais curts de temps. Val a dir però, que els efectes del receptor de NMDA sobre la secreció de PTH a través del descens de vitamina D sembla ser que són més potents que els causats directament pel receptor sobre la glàndula paratiroides mateixa. En la glàndula paratiroides la quantitat de NMDAR és petita i és molt menor que la quantia de CaSR i VDR, així, encara que de manera immediata l'activació

del receptor provoca una inhibició en la secreció de PTH, els efectes del calci i la vitamina D sobre la glàndula són molt més poderosos i són els que prevalen en els tractaments a llarg termini produint així un augment en la síntesi i excreció de PTH. Per tant, sembla que l'activació del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides seria un efecte agut i de curta durada mentre que l'efecte global a més llarg terme seria un augment de la secreció de PTH.

Així, sembla que els efectes del tractament amb NMDA són semblants als causants de l'HPT2: en la progressió de la MRC es produeix una disminució del parènquima renal que provoca un descens en la síntesi de vitamina D activa que juntament amb la hipocalcèmia, provoquen que la síntesi i secreció de PTH es vegi crònicament estimulada. Per tant, l'estudi dels mecanismes involucrats en el control de la síntesi de vitamina D i la síntesi i secreció de PTH, tals com l'activació del receptor de NMDA, poden ajudar-nos a entendre els inicis de l'HPT2 i a descobrir noves dianes terapèutiques que ens permetin intervenir en l'evolució de la MRC.

Conclusions

Primera. El receptor de NMDA es troba present en la glàndula paratiroides de rata.

Segona. L'activació del receptor de NMDA en la glàndula paratiroides produeix una inhibició de la secreció de PTH a curt termini.

Tercera. L'efecte del NMDA és una acció directa a través de la via de les MAPK per tal de realitzar la seva funció inhibidora.

Quarta. En animals amb MRC i HPT2 l'expressió del receptor de NMDA està disminuïda, raó per la qual el tractament amb NMDA no té efectes.

Cinquena. El receptor de NMDA es troba present en la línia cel·lular renal humana HK-2 on és funcional.

Sisena. El tractament d'animals sans durant 4 dies amb NMDA produeix un descens en la síntesi de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produïda per una davallada en l'expressió de la 1α -hidroxilasa renal.

Setena. La baixada en la concentració de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ és la causa principal de que la síntesi i secreció de PTH estigui elevada als quatre dies de tractament amb NMDA.

Vuitena. La PTH elevada modifica l'excreció urinària de calci i fòsfor, i activa la resorció òssia.

Novena. La PTH elevada provoca efectes diürètics i natriürètics degut a un descens en l'expressió dels transportadors de sodi.

Bibliografia

1. Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A, Corna D, Zoja C, Cavallotti D, Remuzzi G. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney International* 1997;52:171-181.
2. Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: Some recent research. *General Pharmacology* 1995;26:1477-1487.
3. Allen LH, Oddoye EA, Margen S. Protein-induced hypercalciuria: a longer term study. *Am J Clin Nutr* 1979;32:741-749.
4. Almaden Y, Canalejo A, Ballesteros E, Anon G, Canadillas S, Rodriguez M. Regulation of arachidonic acid production by intracellular calcium in parathyroid cells: Effect of extracellular phosphate. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002;13:693-8
5. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res* 1996;11:970-976.
6. Altmann L, Mundy WR, Ward TR, Fastabend A, Lilienthal H. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on long-term potentiation and [3H]MK-801 binding in occipital cortex and hippocampus. *Toxicol Sci* 2001;61:321-330.
7. Anbar M. Nitric-Oxide - A Synchronizing Chemical Messenger. *Experientia* 1995;51:545-550.
8. Andress DL, Norris KC, Coburn JW, Slatopolsky EA, Sherrard DJ. Intravenous calcitriol in the treatment of refractory osteitis fibrosa of chronic renal failure. *N Engl J Med* 1989;321:274-279.
9. Aoki C, Rhee J, Lubin M, Dawson TM. NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res* 1997;750:25-40.
10. Ashab I, Peer G, Blum M, Wollman Y, Chernihovsky T, Hassner A, Schwartz D, Cabili S, Silverberg D, Iaina A. Oral-Administration of L-Arginine and Captopril in Rats Prevents Chronic-Renal-Failure by Nitric-Oxide Production. *Kidney International* 1995;47:1515-1521.

11. Asztely F, Gustafsson B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 1996;12:1-11.
12. Ault B, Hildebrand LM. Activation of nociceptive reflexes by peripheral kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:927-932.
13. Barnicot N.A.. The local action of the parathyroid and other tissues on bone in intracerebral grafts. *J Anat* 1948;82:233-248.
14. Bear MF, Rittenhouse CD. Molecular basis for induction of ocular dominance plasticity. *J Neurobiol* 1999;41:83-91.
15. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC, Kumar R. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 2003;112:785-794.
16. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, Lanske B, Sitara D, Razzaque MS, Pragnell M, Bowe AE, O'Brien SP, Schiavi SC, Kumar R. Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch* 2007;454:615-623.
17. Beutner EH, Munson PL. Time course of urinary excretion of inorganic phosphate by rats after parathyroidectomy and after injection of parathyroid extract. *Endocrinology* 1960;66:610-616.
18. Biemesderfer D, Pizzonia J, bu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 1993;265:F736-F742.
19. Bigge CF. Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:441-447.
20. Bingham PJ, Brazell IA, Owen M. The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma calcium levels in vivo. *J Endocrinol* 1969;45:387-400.
21. Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, Thomson SC. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int* 2002;61:782-785.
22. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-39.

23. Blum M, Yachnin T, Wollman Y, Chernihovsky T, Peer G, Grosskopf I, Kaplan E, Silverberg D, Cabili S, Iaina A. Low nitric oxide production in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1998;79:265-268.
24. Boast CA, Gerhardt SC, Pastor G, Lehmann J, Etienne PE, Liebman JM. The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. *Brain Res* 1988;442:345-348.
25. Bonomini V, Orsoni G, Sorrentino MA, Todeschini P. Hormonal changes in hemodialysis. *Blood Purif* 1990;8:54-68.
26. Bouillon R.: *Vitamin D: From Photosynthesis, Metabolism, and Action to Clinical Applications*. 5th ed. 2006
27. Bourdeau A, Moutahir M, Souberbielle JC, Bonnet P, Herviaux P, Sachs C, Lieberherr M. Effects of lipoxygenase products of arachidonate metabolism on parathyroid hormone secretion. *Endocrinology* 1994;135:1109-1112.
28. Brann DW. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 1995;61:213-225.
29. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996;84:757-767.
30. Brezis M, Rosen S, Epstein FH: *The kidney*. Philadelphia. 1991. Chap 17: Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates in the kidney. p 713-753.
31. Bringhurst FR, Leder BZ: Regulation of calcium and phosphate homeostasis, in *Endocrinology*, edited by Degroot L, Jameson JL 2006,
32. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999;277:F157-F175.
33. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993;366:575-580.

34. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987;262:7151-7156.
35. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett* 1995;197:25-28.
36. Chang HY. Grafts of parathyroid and other tissues to bone. *Anat Rec* 1951;111:23-47.
37. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005;310:490-493.
38. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 2002;415:793-798.
39. Chen L, Gu Y, Huang LY. The opioid peptide dynorphin directly blocks NMDA receptor channels in the rat. *J Physiol* 1995;482 (Pt 3):575-581.
40. Chen L, Gu Y, Huang LY. The mechanism of action for the block of NMDA receptor channels by the opioid peptide dynorphin. *J Neurosci* 1995;15:4602-4611.
41. Chenu C, Serre CM, Raynal C, Burt-Pichat B, Delmas PD. Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. *Bone* 1998;22:295-299.
42. Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology* 1983;113:1511-1518.
43. Conigrave AD, Mun HC, Delbridge L, Quinn SJ, Wilkinson M, Brown EM. L-amino acids regulate parathyroid hormone secretion. *J Biol Chem* 2004;279:38151-38159.
44. Corbetta S, Lania A, Filopanti M, Vicentini L, Ballare E, Spada A. Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and

- tumoral parathyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2201-2205.
45. Cozzolino M, Gallieni M, Corsi C, Bastagli A, Brancaccio D. Management of calcium refilling post-parathyroidectomy in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2004;17:3-8.
 46. Crespi F, Lazzarini C, Andreoli M, Vecchiato E. Voltammetric and functional evidence that N-methyl-D-aspartate and substance P mediate rat vascular relaxation via nitrogen monoxide release. *Neuroscience Letters* 2000;287:219-222.
 47. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 2001;66:287-292.
 48. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:327-335.
 49. Cunningham J. Achieving therapeutic targets in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2004;19:9-14.
 50. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998;393:377-381.
 51. De BA, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:114-120.
 52. Delmez JA, Slatopolsky E. Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1992;19:303-317.
 53. Deng AH, Valdivielso JM, Munger KA, Blantz RC, Thomson SC. Vasodilatory N-methyl-D-aspartate receptors are constitutively expressed in rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002;13: 1381-4

54. Denicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric-Oxide and Angiotensin-II - Glomerular and Tubular Interaction in the Rat. *Journal of Clinical Investigation* 1992;89:1248-1256.
55. Dickman KG, Youssef JG, Mathew SM, Said SI. Iontropic glutamate receptors in lungs and airways: molecular basis for glutamate toxicity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:139-144.
56. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 1999;51:7-61.
57. Dolson GM, Hise MK, Weinman EJ. Relationship among parathyroid hormone, cAMP, and calcium on proximal tubule sodium transport. *Am J Physiol* 1985;249:F409-F416.
58. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F8-28.
59. Ebert R, Jovanovic M, Ulmer M, Schneider D, Meissner-Weigl J, Adamski J, Jakob F. Down-regulation by nuclear factor kappaB of human 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase promoter. *Mol Endocrinol* 2004;18:2440-2450.
60. Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 1992;262:C517-C526.
61. Fitzpatrick LA, Brandi ML, Aurbach GD. Control of PTH secretion is mediated through calcium channels and is blocked by pertussis toxin treatment of parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138:960-965.
62. Fitzpatrick LA, Yasumoto T, Aurbach GD. Inhibition of parathyroid hormone release by maitotoxin, a calcium channel activator. *Endocrinology* 1989;124:97-103.
63. Fraser DR, Kodicek E. Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone. *Nat New Biol* 1973;241:163-166.
64. Friedman PA. Codependence of renal calcium and sodium transport. *Annu Rev Physiol* 1998;60:179-197.
65. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is

- associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 1993;92:1436-1443.
66. Gallieni M, Brancaccio D, Padovese P, Rolla D, Bedani P, Colantonio G, Bronzieri C, Bagni B, Tarolo G. Low-dose intravenous calcitriol treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. Italian Group for the Study of Intravenous Calcitriol. *Kidney Int* 1992;42:1191-1198.
 67. Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1673-1676.
 68. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:107-119.
 69. Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Moncada S. NmDA Receptor Activation Induces Nitric-Oxide Synthesis from Arginine in Rat-Brain Slices. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* 1989;172:413-416.
 70. Genever PG, Wilkinson DJP, Patton AJ, Peet NM, Hong Y, Mathur A, Erusalimsky JD, Skerry TM. Expression of a functional N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor by bone marrow megakaryocytes. *Blood* 1999;93:2876-2883.
 71. Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF. Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Res Bull* 1998;46:429-434.
 72. Goodman WG. Calcium and phosphorus metabolism in patients who have chronic kidney disease. *Med Clin North Am* 2005;89:631-647.
 73. Greger R. Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 2000;319:51-62.
 74. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:763-786.
 75. Guyton A.C.: *Fisiologia Médica*. 11^a ed. 2006. p 914-917.

76. Haddad JJ. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol* 2005;77:252-282.
77. Hayashi Y, Zviman MM, Brand JG, Teeter JH, Restrepo D. Measurement of membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in cell ensembles: application to the study of glutamate taste in mice. *Biophys J* 1996;71:1057-1070.
78. Hazan I, Dana R, Granot Y, Levy R. Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase. *Biochem J* 1997;326 (Pt 3):867-876.
79. Hensley CB, Bradley ME, Mircheff AK. Parathyroid hormone-induced translocation of Na-H antiporters in rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1989;257:C637-C645.
80. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 1999;57:417-428.
81. Hinoi E, Fujimori S, Takarada T, Taniura H, Yoneda Y. Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:452-458.
82. Hinoi E, Fujimori S, Yoneda Y. Modulation of cellular differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors in osteoblasts. *FASEB J* 2003;17:1532-1534.
83. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003;88:296-307.
84. Honda N, Hishida A. Pathophysiology of experimental nonliguric acute renal failure. *Kidney Int* 1993;43:513-521.
85. Huang DC, Papavasiliou V, Rhim JS, Horst RL, Kremer R. Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol Cancer Res* 2002;1:56-67.

86. Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001;62:401-405.
87. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999;283:70-74.
88. Inagaki N, Kuromi H, Gono T, Okamoto Y, Ishida H, Seino Y, Kaneko T, Iwanaga T, Seino S. Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J* 1995;9:686-691.
89. Itzstein C, Cheynel H, Burt-Pichat B, Merle B, Espinosa L, Delmas PD, Chenu C. Molecular identification of NMDA glutamate receptors expressed in bone cells. *J Cell Biochem* 2001;82:134-144.
90. Jellinek DA, Chang AC, Larsen MR, Wang X, Robinson PJ, Reddel RR. Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells. *Biochem J* 2000;350 Pt 2:453-461.
91. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jing G. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 2000;857:71-77.
92. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, Jing G. N-methyl-D-aspartate receptor activation results in regulation of extracellular signal-regulated kinases by protein kinases and phosphatases in glutamate-induced neuronal apoptotic-like death. *Brain Res* 2000;887:285-292.
93. Johnson NE, Alcántara EN, Linkswiler H. Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males. *J Nutr* 1970;100:1425-1430.
94. Jüppner HW, Gardella TJ, Brown EM: Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development, chap. 2, in *Endocrinology*, 4 ed., edited by LI DeGroot, JL Jameson, Philadelphia, Elsevier, 2006, p 969-998
95. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B, III. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 1985;28:899-913.

96. Kato K, Li ST, Zorumski CF. Modulation of long-term potentiation induction in the hippocampus by N-methyl-D-aspartate-mediated presynaptic inhibition. *Neuroscience* 1999;92:1261-1272.
97. Kerstetter JE, Caseria DM, Mitnick ME, Ellison AF, Gay LF, Liskov TA, Carpenter TO, Insogna KL. Increased circulating concentrations of parathyroid hormone in healthy, young women consuming a protein-restricted diet. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1188-1196.
98. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003;133:855S-861S.
99. Kifor O, Diaz R, Butters R, Brown EM. The Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:715-725.
100. Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2001;280:F291-F302.
101. Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 1995;96:327-333.
102. King AJ, Troy JL, Anderson S, Neuringer JR, Gunning M, Brenner BM. Nitric-Oxide - A Potential Mediator of Amino Acid-Induced Renal Hyperemia and Hyperfiltration. *Journal of the American Society of Nephrology* 1991;1:1271-1277.
103. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res* 2004;19:1411-1419.
104. Kong XF, Zhu XH, Pei YL, Jackson DM, Holick MF. Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6988-6993.
105. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007;195:125-131.

106. Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:48-55.
107. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999;399:A7-14.
108. Lee KH, Park JY, Kim K. NMDA receptor-mediated calcium influx plays an essential role in myoblast fusion. *FEBS Lett* 2004;578:47-52.
109. Leonard AS, Hell JW. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 1997;272:12107-12115.
110. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997;272:16709-16712.
111. Leung JC, Marphis T, Craver RD, Silverstein DM. Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: Protection with a receptor antagonist. *Kidney Int* 2004;66:167-176.
112. Leung JC, Travis BR, Verlander JW, Sandhu SK, Yang SG, Zea AH, Weiner ID, Silverstein DM. Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R964-R971.
113. Lin HC, Wan FJ, Tseng CJ. Modulation of cardiovascular effects produced by nitric oxide and ionotropic glutamate receptor interaction in the nucleus tractus solitarii of rats. *Neuropharmacology* 1999;38:935-941.
114. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004;26:21-28.
115. Lin TH, Yang RS, Tang CH, Wu MY, Fu WM. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur J Pharmacol* 2008;28:37-44
116. Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, Marini AM. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J Neurochem* 2001;78:254-264.

117. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1637-1647.
118. Llansola M, Saez R, Felipe V. NMDA-induced phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP-2 is mediated by activation of nitric oxide synthase and MAP kinase. *Eur J Neurosci* 2001;13:1283-1291.
119. Lopez-Colome AM, Ortega A. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res* 1997;22:679-685.
120. Ma J, Stampfer MJ, Gann PH, Hough HL, Giovannucci E, Kelsey KT, Hennekens CH, Hunter DJ. Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:385-390.
121. Magazanik LG, Tikhonov DB, Bol'shakov KV, Gmiro VE, Buldakova SL, Samoilova MV. Studies of the structure of glutamate receptor ion channels and the mechanisms of their blockade by organic cations. *Neurosci Behav Physiol* 2003;33:237-246.
122. Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993;16:521-527.
123. Mandsager NT, Brewer AS, Myatt L. Vasodilator effects of parathyroid hormone, parathyroid hormone-related protein, and calcitonin gene-related peptide in the human fetal-placental circulation. *J Soc Gynecol Investig* 1994;1:19-24.
124. Maren S, Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63:1-18.
125. Martinez ME, Willett WC. Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:163-168.
126. Masood K, Wu C, Brauneis U, Weight FF. Differential ethanol sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Mol Pharmacol* 1994;45:324-329.

127. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 2000;74:443-456.
128. Mentaverri R, Kamel S, Wattel A, Prouillet C, Sevenet N, Petit JP, Tordjmann T, Brazier M. Regulation of bone resorption and osteoclast survival by nitric oxide: possible involvement of NMDA-receptor. *J Cell Biochem* 2003;88:1145-1156.
129. Merle B, Itzstein C, Delmas PD, Chenu C. NMDA glutamate receptors are expressed by osteoclast precursors and involved in the regulation of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 2003;90:424-436.
130. Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Shevde NK, Pike JW. The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal cells. *Mol Endocrinol* 2006;20:1447-1461.
131. Miyamoto K, Tatsumi S, Morita K, Takeda E. Does the parathyroid 'see' phosphate? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2727-2729.
132. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem* 1998;273:5253-5259.
133. Montoliu C, Llansola M, Monfort P, Corbalan R, Fernandez-Marticorena I, Hernandez-Viadel ML, Felipe V. Role of nitric oxide and cyclic GMP in glutamate-induced neuronal death. *Neurotox Res* 2001;3:179-188.
134. Mori H, Mishina M. Structure and Function of the Nmda Receptor-Channel. *Neuropharmacology* 1995;34:1219-1237.
135. Moseley JM, Kubota M, efenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, . Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5048-5052.
136. Munson P.L. Studies on the role of the parathyroids in calcium and phosphorus metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1955;60:776-796.
137. Murer H, Forster I, Hernando N, Lambert G, Traebert M, Biber J. Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II

- transporter in response to PTH and dietary P(i). *Am J Physiol* 1999;277:F676-F684.
138. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev* 2000;80:1373-1409.
139. Murphy TH, Blatter LA, Bhat RV, Fiore RS, Wier WG, Baraban JM. Differential regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and p42 MAP kinase activity by synaptic transmission. *J Neurosci* 1994;14:1320-1331.
140. Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: Evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocrine Reviews* 2005;26:78-113.
141. Nagata O, Li WM, Sato A. Glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists administered into the brain stem depress the renal sympathetic reflex discharges evoked by single shock of somatic afferents in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 1995;201:111-114.
142. Nahm WK, Philpot BD, Adams MM, Badiavas EV, Zhou LH, Butmarc J, Bear MF, Falanga V. Significance of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated signaling in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2004;200:309-317.
143. Nassar GM, Badr KF. Endothelin in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994;3:86-91.
144. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
145. Naveh-Many T, Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 1990;86:1313-1319.
146. Nemeth EF, Kosz LM. Adenine nucleotides mobilize cellular Ca²⁺ and inhibit parathyroid hormone secretion. *Am J Physiol* 1989;257:E505-E513.
147. Niall HD, Keutmann H, Sauer R, Hogan M, Dawson B, Auerbach G, Potts J. Amino Acid Sequence of Bovine Parathyroid Hormone-I.

- Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie 1970;351:1586-&.
148. Norman AW, Roth J, Orci L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocr Rev* 1982;3:331-366.
 149. Nussey SS, Whitehead SA: *Endocrinology, an integrated approach*. 2001
 150. Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, Yoneda Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem* 2003;85:1336-1346.
 151. Ozyurt E, Graham DI, Woodruff GN, McCulloch J. Protective effect of the glutamate antagonist, MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:138-143.
 152. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:39-47.
 153. Patton AJ, Genever PG, Birch MA, Suva LJ, Skerry TM. Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone* 1998;22:645-649.
 154. Peet NM, Grabowski PS, Laketic-Ljubojevic I, Skerry TM. The glutamate receptor antagonist MK801 modulates bone resorption in vitro by a mechanism predominantly involving osteoclast differentiation. *FASEB J* 1999;13:2179-2185.
 155. Perez-Ruiz L, Ros-Lopez S, Cardus A, Fernandez E, Valdivielso JM. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma. *Nephron Experimental Nephrology* 2006;103:E126-E130.
 156. Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lotscher M, Quabius ES, Biber J, Murer H. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem* 1997;272:20125-20130.
 157. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996;76:127-173.

158. Philpot BD, Sekhar AK, Shouval HZ, Bear MF. Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 2001;29:157-169.
159. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005;187:311-325.
160. Priestley T, Laughton P, Myers J, Le BB, Kerby J, Whiting PJ. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 1995;48:841-848.
161. Pullman TN, Lavender AR, Aho I, Rasmussen H. Direct renal action of a purified parathyroid extract. *Endocrinology* 1960;67:570-582.
162. Quarles LD, Yohay DA, Carroll BA, Spritzer CE, Minda SA, Bartholomay D, Lobaugh BA. Prospective trial of pulse oral versus intravenous calcitriol treatment of hyperparathyroidism in ESRD. *Kidney Int* 1994;45:1710-1721.
163. Quesada JM: Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Capítulo 6: Vitamina D 2004,
164. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:4424-4427.
165. Ramasamy I. Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:237-273.
166. Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol* 2007;194:1-10.
167. Rixon R.H., Whitfield J.F., Youdale T. Increased survival of rats irradiated with x-rays and treated with parathyroid extract. *Nature* 1958;182:1374.
168. Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A. Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 2006;24:1507-1516.

169. Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C, Pacini P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncol Res* 1998;10:43-46.
170. Said SI, Berisha HI, Pakbaz H. Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4688-4692.
171. Satoh T, Cohen HT, Katz AI. Different mechanisms of renal Na-K-ATPase regulation by protein kinases in proximal and distal nephron. *Am J Physiol* 1993;265:F399-F405.
172. Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int* 2004;65:1-14.
173. Schneider EG. Effect of parathyroid hormone secretion on sodium reabsorption by the proximal tubule. *Am J Physiol* 1975;229:1170-1173.
174. Schor N, Ichikawa I, Brenner BM. Mechanisms of action of various hormones and vasoactive substances on glomerular ultrafiltration in the rat. *Kidney Int* 1981;20:442-451.
175. Shan J, Pang PK, Lin HC, Yang MC. Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23 Suppl 2:S38-S41.
176. Shannon HE, Sawyer BD. Glutamate receptors of the N-methyl-D-aspartate subtype in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251:518-523.
177. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:409-414.
178. Shoback D, Chen TH, Pratt S, Lattyak B. Thapsigargin stimulates intracellular calcium mobilization and inhibits parathyroid hormone release. *J Bone Miner Res* 1995;10:743-750.

179. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2002;283:F367-F376.
180. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth - High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97:2534-2540.
181. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ. Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 1984;74:2136-2143.
182. Slomowitz LA, Gabbai FB, Khang SJ, Satriano J, Thareau S, Deng A, Thomson SC, Blantz RC, Munger KA. Protein intake regulates the vasodilatory function of the kidney and NMDA receptor expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1184-R1189.
183. Spedding M, Neau I, Harsing L. Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:33-40.
184. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987;80:1803-1807.
185. Takeda E, Taketani Y, Sawada N, Sato T, Yamamoto H. The regulation and function of phosphate in the human body. *Biofactors* 2004;21:345-355.
186. Talmage RV, Krintz FW. Progressive changes in renal phosphate and calcium excretion in rats following parathyroidectomy or parathyroid administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;87:263-267.
187. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani Y, Miyamoto KI, Takeda E. Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 1998;139:1692-1699.

188. Tenenhouse HS. Regulation of phosphorus homeostasis by the type ii a na/phosphate cotransporter. *Annu Rev Nutr* 2005;25:197-214.
189. Thomas S, Movsowitz C, Epstein S, Jowell P, Ismail F. The response of circulating parameters of bone mineral metabolism to ethanol- and EDTA-induced hypocalcemia in the rat. *Bone Miner* 1990;8:1-6.
190. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 2004;279:9777-9784.
191. Town MH, Gehm S, Hammer B, Ziegenhorn J. A Sensitive Colorimetric Method for the Enzymatic Determination of Uric-Acid. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1985;23:591.
192. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995;270:15455-15458.
193. Usdin TB, Wang T, Hoare SR, Mezey E, Palkovits M. New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol* 2000;21:349-383.
194. Vallon V. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F10-F27.
195. Vander AJ: *Fisiología renal*. 4a Edición ed. 1995. p 19-40.
196. Walker RM, Linkswiler HM. Calcium retention in the adult human male as affected by protein intake. *J Nutr* 1972;102:1297-1302.
197. Wang M, Yao Y, Kuang D, Hampson DR. Activation of family C G-protein-coupled receptors by the tripeptide glutathione. *J Biol Chem* 2006;281:8864-8870.
198. Wang W, Li C, Kwon TH, Miller RT, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Reduced expression of renal Na⁺ transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F534-F545.
199. Weaver CD, Gundersen V, Verdoorn TA. A high affinity glutamate/aspartate transport system in pancreatic islets of

- Langerhans modulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 1998;273:1647-1653.
200. Weaver CD, Yao TL, Powers AC, Verdoorn TA. Differential expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 1996;271:12977-12984.
201. Whitfield J.F., Perris A.D., Youdale T. The calcium-mediated promotion of mitotic activity in rat thymocyte populations by growth hormone, neurohormones, parathyroid hormone and prolactin. *J Cell Physiol* 1969;73:203-211.
202. Williams K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 1993;44:851-859.
203. Wollmuth LP, Sobolevsky AI. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 2004;27:321-328.
204. Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)₂ vitamin D(3). *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C487-C493.
205. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3597-3602.
206. Yoneda Y, Ogita K. Localization of [3H]glutamate binding sites in rat adrenal medulla. *Brain Res* 1986;383:387-391.
207. Youssef F, Stone TW, Addae JI. Interactions of glutamate receptor agonists with long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Eur J Pharmacol* 2000;398:349-359.
208. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:621-629.

209. Zhang Y, Norian JM, Magyar CE, Holstein-Rathlou NH, Mircheff AK, McDonough AA. In vivo PTH provokes apical NHE3 and NaPi2 redistribution and Na-K-ATPase inhibition. *Am J Physiol* 1999;276:F711-F719.

Annex

1. PUBLICACIONES

1. ** **Parisi E**, Ibarz M, Cardús A, Panizo S, Fernandez E, Valdivielso JM. Role of N-Methyl-D-Aspartate Receptor activation on vitamin D synthesis and PTH release.

2. ** **Parisi E**, Almadén Y, Ibarz M, Panizo S, Rodriguez M, Fernández E, Valdivielso JM. N-Methyl-D-Aspartate receptors are expressed in rat parathyroid gland and regulate PTH secretion.

3. ** Arndt MA, Battaglia V, **Parisi E**, Isome M, Baskerville C, Pizzo DP, Colombatto S, Toninello A, Satriano J. The Arginine Metabolite Agmatine is a Free Radical Scavenger that Confers Resistance to Cellular Apoptosis.

4. ** Panizo S, Cardus A, Encinas M, **Parisi E**, Valcheva P, Fernandez E, Valdivielso JM. RANKL increases VSMC calcification through a RANK-dependent pathway.

5. **Parisi E**, Reñé JM, Cardús A, Valcheva P, Piñol-Felis C, Valdivielso JM, Fernández E. Vitamin D receptor levels in colorectal cancer. Possible role of BsmI polymorphism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 111(1-2):87-90.

6. Isome M, Lortie MJ, Murakami Y, **Parisi E**, Matsufuji S, Satriano J. The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293(2):C705-11.

7. Cardús A, Panizo S, **Parisi E**, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(6):860-6.

8. Panizo S, **Parisi E**, Valdivielso JM, Rosello L, Fernández E. Polimorfismo del gen receptor de la Vitamina D en personas con Síndrome de Down. *SD, Revista Médica Internacional sobre el Síndrome de Down*. 2006 Mar; 10(1).

9. Cardús A, **Parisi E**, Gallego C, Aldea M, Fernández E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int*. 2006; 69(8):1377-84.

10. Muray S, **Parisi E**, Cardús A, Craver L, Marco MP, Fernández E. Influence of vitamin D receptor gene polymorphism and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently health subject. *J Hypertens* 2003; 21(11): 2069-75.

11. Muray S, **Parisi E**, Cardús A, Craver L, Marco MP, Fernández E. El polimorfismo BsmI del gen del VDR influye en la tensión arterial en hombres sanos. *Nefrología* 2003; 23 Suppl 2:32-6.

12. Cardús A, Gallego C, Muray S, **Parisi E**, Aldea M, Fernández E. El calcitriol estimula la proliferación de las células de músculo liso vascular por un mecanismo mediado por TGF beta. *Nefrología* 2003; 23 Suppl 2:117-21.

** Manuscrits en premsa

2. PARTICIPACIONES EN CONGRESSOS

1. Pòster: Presence of the N-methyl-D-aspartate receptor on the parathyroid gland and their role on PTH secretion. **E Parisi**; Y Almaden; M Ibartz; S Panizo; E Fernández; J.M. Valdivielso. ASN 40th Annual Renal Week Meeting. *Philadelphia 2008*.

2. Comunicació oral: Presencia del receptor de N-metil-D-aspartato en la glándula paratiroides y su papel en la secreción de PTH. **E Parisi**; Y Almaden; M Ibartz; S Panizo; E Fernández; J.M. Valdivielso. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. *San Sebastián 2008*.

3. Pòster: Role of N-methyl-D-aspartate receptor activation in renal function. **E Parisi**; M Ibarz; P Gassiot; P Valcheva, S Panizo; A Cardús; E Fernández; JM Valdivielso. ASN 39th Annual Renal Week Meeting. *San Diego 2006*.

4. Pòster: Papel de la activación del receptor de N-Metil-D-Aspartato en la función renal. **E Parisi**; M Ibartz; P Gassiot; S Panizo; A Cardús; E Fernández; J.M. Valdivielso. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. *Madrid 2006*.

5. Pòster: Role of the N-Methyl-D-Aspartate receptor in the renal excretion of electrolytes. **E Parisi**; M Ibarz; P Gassiot; S Panizo; A Cardús; E Fernández; J.M. Valdivielso. ASN 38th Annual Renal Week Meeting. *Philadelphia 2005*.

6. Pòster: Papel del receptor de n-metil-d-aspartato en la excreción renal de electrolitos relacionados con el metabolismo mineral. **E Parisi**; M

Ibarz; P Gassiot; S Panizo; A Cardús; E Fernández; J.M. Valdivielso. XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. *Málaga 2005*.

7. Pòster: Papel del receptor de n-metil-d-aspartato en la excreción renal de electrolitos. **E Parisi**; M Ibarz; P Gassiot; S Panizo; A Cardús; E Fernández; J.M. Valdivielso. Reunión Anual de la Societat Catalana de Nefrologia. *Tortosa 2005*.

8. Comunicació oral: Evidencia molecular de la influencia del polimorfismo del gen del receptor de la vitamina D (VDR) en el cáncer colorrectal. **E Parisi**, JM Reñé, C Piñol, A Cardús, J Buenestado, S Muray, J Viñas, E Fernandez. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diálisis y Transplantes. *Puerto de Santa María 2003*

9. Comunicació oral: Evidencia molecular de la influencia del polimorfismo del gen del receptor de la vitamina D (VDR) en el cáncer colorrectal. **E Parisi**, JM Reñé, C Piñol, A Cardús, J Buenestado, S Muray, J Viñas, E Fernandez. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Patología digestiva. *Marbella 2003*.

