



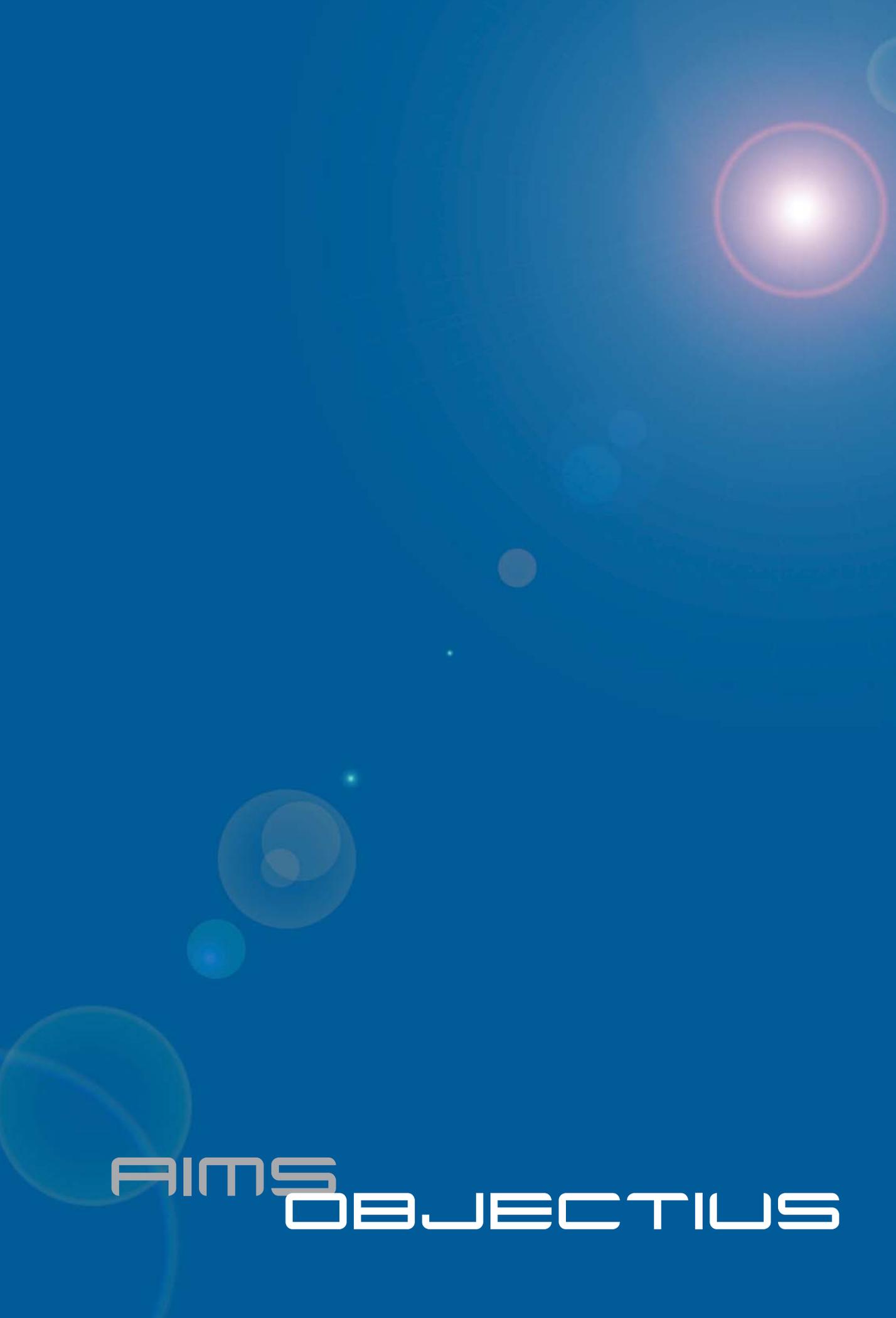
UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia

**ADAPTACIONS DEL CÒLON DE RATA
AL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA:
PAPER DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
I DE LA VASOPRESSINA**

**ESTHER CRISTIÀ CIVIT
2006**

The background is a solid blue color with several bokeh effects. A prominent lens flare is located in the upper right quadrant, consisting of a bright white center surrounded by concentric circles of light blue and purple. Other smaller, semi-transparent blue circles of various sizes are scattered across the page, creating a sense of depth and movement.

AIMS OBJECTIVUS

El còlon distal és, juntament amb el ronyó, un dels principals teixits que regulen l'homeòstasi hídrica i electrolítica de l'organisme. El manteniment d'aquesta homeòstasi depèn de diferents factors, entre ells, factors hormonals com el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) i la vasopressina. El fet que l'ió sodi sigui el principal determinant de l'osmolalitat del plasma i del volum extracel·lular, implica que la seva absorció i excreció estiguin altament regulades per aquests mecanismes homeostàtics. En el còlon distal la capacitat d'adaptació al contingut de sodi de la dieta dóna lloc a canvis en la seva estructura i la seva funció. El grup del Professor Richard Naftalin, del King's College de Londres, ha estudiat àmpliament l'estructura i les funcions del còlon, així com la seva regulació. Els resultats d'aquests estudis han demostrat que els miofibroblasts presents a l'espai pericriptal del còlon distal estan implicats en els processos d'absorció d'aigua i electròlits (Naftalin i Pedley, 1990), permetent l'absorció de fluids en contra d'un gran gradient osmòtic (Naftalin *et al.*, 1999). Aquests fets indiquen que l'absorció al còlon distal depèn de les propietats epitelials de permeabilitat i transport i del desenvolupament de la beina de miofibroblasts que envolta les criptes. A més, s'ha descrit que la proliferació d'aquests miofibroblasts està augmentada quan els animals són sotmesos a una dieta amb baix contingut en sodi (Naftalin i Pedley, 1999), mostrant característiques pròpies dels estats de fibrosi (Thiagarajah *et al.*, 2002). Continuant amb aquesta línia d'investigació l'objectiu general de la tesi ha estat estudiar la regulació de les adaptacions funcionals i estructurals del còlon distal en resposta a canvis en la ingesta de sodi, per tal d'identificar els mediadors responsables d'aquestes adaptacions.

El primer objectiu va ser reproduir un model animal d'activació del RAAS en rata, aplicable a estudis de fisiologia i fisiopatologia d'aquest sistema i descriure'n les variables fisiològiques més rellevants. Mitjançant la utilització de dietes amb alt (HS; *high sodium*) i baix (LS; *low sodium*) contingut en sodi es van reproduir les adaptacions funcionals i estructurals en la mucosa del còlon distal. Per fer-ho es va estudiar el transport de Na^+ , la permeabilitat de la paret intestinal a macromolècules, l'estructura de les unions intercel·lulars i la proliferació dels miofibroblasts de la zona pericriptal.

El fet que l'activació del RAAS augmenti tant la síntesi d'angiotensina II com d'aldosterona no permet diferenciar les accions concretes de cadascuna d'elles. A més, ambdues hormones han estat relacionades amb la inducció de fibrosi en altres teixits, com el ronyó o el cor (Remuzzi *et al.*, 2005; Kurdi *et al.*, 2005; Duprez, 2006). Per tant, el següent objectiu va ser establir un segon model d'activació del RAAS en rata que permetés separar els efectes de l'angiotensina i l'aldosterona. Per fer-ho, es van establir condicions experimentals caracteritzades per una síntesi molt reduïda d'aldosterona i es va controlar la concentració plasmàtica de les dues hormones mitjançant la seva administració exògena amb bombes osmòtiques d'alliberació controlada. D'aquesta manera es va poder estudiar el paper específic de cadascuna d'aquestes hormones en la permeabilitat i en el desenvolupament de fibrosi en el còlon distal.

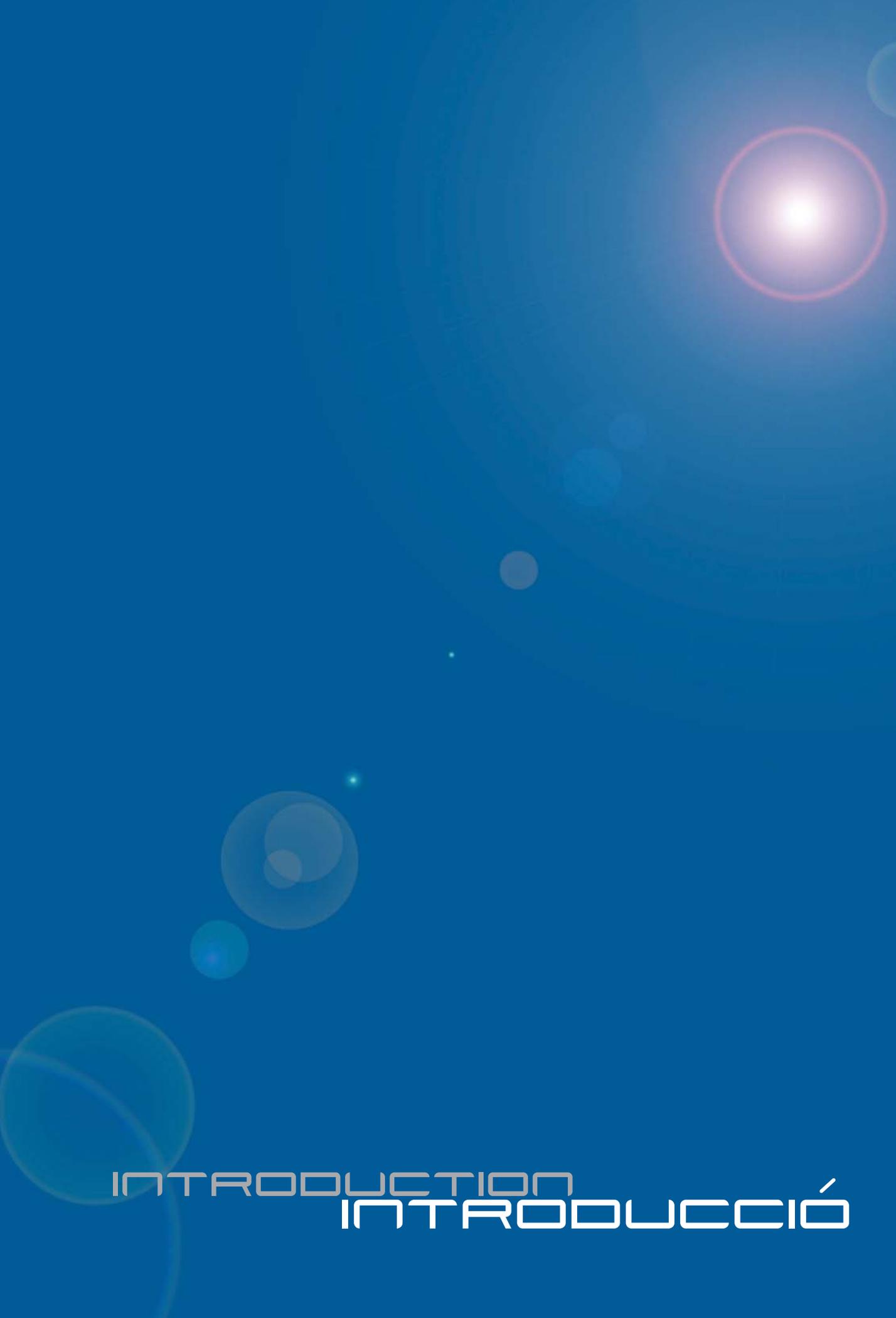
Un cop comprovades les accions de l'angiotensina II i de l'aldosterona, es va voler estudiar el paper de la vasopressina donada la seva implicació en l'homeòstasi hídrica i electrolítica i a que diferents estudis han descrit accions sinèrgiques de la vasopressina i l'aldosterona tant en el còlon (Fukushima *et al.*, 2004; 2005), com en el ronyó (Verrey, 1994; Hawk *et al.*, 1996). Un primer pas va ser estudiar els efectes del grau de deshidratació sobre les funcions del còlon distal. Per tant, el tercer objectiu va ser establir un model animal per estudiar els efectes de la deshidratació en el model ja establert d'activació del RAAS. El protocol va consistir en restringir la ingesta d'aigua durant 24 h en animals

alimentats amb dietes HS i LS per tal de descriure'n les variables fisiològiques i els seus efectes en la permeabilitat i en la proliferació de la beina de miofibroblasts.

Ja establerts els efectes de la deshidratació en el còlon distal, l'últim objectiu va ser comprovar la participació de la vasopressina en els canvis de permeabilitat, el desenvolupament de la fibrosi i en la regulació del moviment d'aigua en el còlon distal, mitjançant la seva administració exògena. A més, es va determinar el receptor involucrat en cadascuna de les accions de la vasopressina mitjançant inhibidors selectius per a cadascun dels receptors.

Els estudis que s'han portat a terme a partir d'aquests objectius estan repartits en tres articles, dos d'ells ja publicats en revistes indexades i un tercer en forma de manuscrit a l'espera de ser acceptat. Els articles ja publicats inclouen els dos primers objectius, referents al paper de l'angiotensina II i l'aldosterona en la permeabilitat i fibrosi al còlon distal, mentre que el tercer i el quart objectiu, per estudiar el paper de la vasopressina en les funcions del còlon distal, estan recollits en el manuscrit.





INTRODUCTION
INTRODUCCIÓ

FISIOLOGIA INTESTINAL

L'epiteli intestinal constitueix la major superfície mucosa de l'organisme humà, proporcionant la interacció entre l'organisme i el medi ambient. Per aquest motiu, l'intestí té dues funcions cabdals, per una banda actua com a filtre, permetent només l'entrada a la circulació dels nutrients necessaris; i per una altra, actua com a barrera per evitar l'entrada d'agents perjudicials com poden ser els microorganismes, els antígens luminals o els factors proinflamatoris. Per tant, l'epiteli intestinal constitueix una barrera selectiva que permet el pas de nutrients, electròlits i aigua des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica, però en restringeix el pas de substàncies potencialment tòxiques.

FUNCIÓ ABSORTIVA

Els aliments arriben parcialment digerits a la llum de l'intestí prim després d'haver passat per l'esòfag i l'estómac. A l'intestí prim és on es realitzen la major part dels processos de digestió i d'absorció dels nutrients. Els nutrients travessen l'epiteli i van a parar als capil·lars subepiteliais, des d'on passen a la circulació general per ser distribuïts a la resta de l'organisme. L'intestí prim es pot dividir en tres zones: duodè, jejú i ili. El contingut romanent al final de l'ili passa a l'intestí gros que en el cas de l'home es divideix en quatre segments anomenats còlon ascendent, còlon transvers, còlon descendent i còlon sigmoide. En el cas de la rata, el còlon es diferencia en còlon proximal i còlon distal. Aquesta diferenciació no es deu tan sols a característiques anatòmiques, sinó també a la diferent distribució de proteïnes que presenten aquestes dues zones. En el còlon és on es realitza l'absorció última d'aigua i electròlits, així com la formació de gasos i un seguit de transformacions metabòliques a càrrec de la flora microbiana, que participaran en la formació de les femtes. Els estudis de Naftalin i col·laboradors (1990; 1999) han demostrat que

l'absorció al còlon no depèn tan sols de les cèl·lules epitelials sinó que també depèn de la capa de miofibroblasts que envolta les criptes, en el que s'anomena espai pericriptal.

► Epiteli intestinal

La paret intestinal està composta per quatre capes: serosa, muscular, submucosa i mucosa. La capa serosa està formada per teixit connectiu i teixit epitelial i és on arriben els vasos sanguinis provinents de l'artèria aorta. A continuació hi ha la capa muscular, que dóna consistència a l'intestí i en regula la seva peristalsi. La submucosa està formada per teixit connectiu dens i és on arriben tots els vasos i nervis que innerven l'intestí. Finalment, la mucosa és la capa en contacte amb la llum intestinal i està formada per una monocapa de cèl·lules epitelials que està en contínua renovació i que recobreix la làmina pròpia, consistent en teixit connectiu. La mucosa es troba replegada formant les vellositats, la finalitat de les quals és incrementar la superfície d'absorció. En el cas de la mucosa del còlon, a diferència de la mucosa de l'intestí prim, l'epiteli no conté vellositats. A més, l'epiteli presenta unes invaginacions cap al teixit connectiu anomenades criptes de Lieberkühn. En el fons de les criptes hi trobem les **cèl·lules indiferenciades**, que són cèl·lules mare pluripotents que proliferen i donen lloc a la resta de fenotips cel·lulars que migren cap a la superfície a mesura que es van diferenciant (Crosnier *et al.*, 2006). El procés de renovació cel·lular és continu podent durar de 2 a 7 dies. Tant en l'intestí prim com en el còlon, el resultat d'aquesta diferenciació dóna lloc a tres tipus cel·lulars: els enteròcits o colonòcits, les cèl·lules caliciformes i les cèl·lules endocrines. A més, a l'intestí prim hi trobem les cèl·lules de Paneth. En algunes criptes, sobretot en aquelles adjacents a les plaques de Peyer, es diferencia un cinquè tipus cel·lular, les cèl·lules M.

Els **enteròcits** (en l'intestí prim) o **colonòcits** (en l'intestí gros) són les cèl·lules majoritàries. Són cèl·lules absorbives altament polaritzades amb una

membrana apical que dona a la llum intestinal i una membrana basolateral orientada a l'espai intersticial. Aquesta divisió està limitada per les diferències en les proteïnes transportadores i canals existents a cada una de les membranes i per la situació de les unions estretes, que uneixen les cèl·lules entre elles. En el cas dels enteròcits, la membrana apical, mitjançant les microvellositats, augmenta encara més la superfície d'absorció.

Les **cèl·lules caliciformes** o **cèl·lules goblet**, són cèl·lules polaritzades que representen la major font de mucus a l'intestí. El component principal d'aquest mucus són les mucines, proteïnes glicosilades que participen en la funció de barrera epitelial (Khan i Collins, 2004). Hi ha diferents estudis que demostren un increment de la producció de mucus en resposta a infeccions, una alteració en la resposta de les cèl·lules *goblet* en animals lliures de gèrmens i canvis en les mucines en condicions inflamatòries (Moal i Servin, 2006).

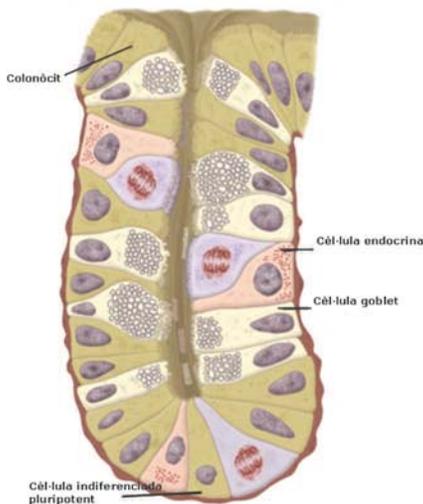


Figura 1-I. Representació d'una cripta de Lieberkühn en el coló amb els diferents tipus cel·lulars.

Les **cèl·lules endocrines** són cèl·lules columnars que componen una població complexa i especialitzada de cèl·lules epitelials que produeixen una gran varietat d'hormones i transmissors. Aquestes cèl·lules estan considerades sensors luminals, ja que detecten el contingut luminal de nutrients, així com els canvis en l'osmolalitat o l'acidesa (Flemström i Sjöblom, 2005).

Les **cèl·lules de Paneth** participen en la funció de barrera intestinal. Quan entren en contacte

amb bacteris, tant Gram positius com negatius, o antígens bacterians, com el lipopolisacàrid, secreten molècules antimicrobianes a la llum de la cripta. Algunes d'aquestes molècules antimicrobianes inclouen la lisosima, fosfolipasa A2, la α -antitripsina i la α -defensina, entre d'altres (Moal i Servin, 2006) .

Les **cèl·lules M** són cèl·lules absorbents especialitzades que recobreixen l'epiteli dels fol·licles limfoides que s'agreguen i formen les anomenades plaques de Peyer. Les cèl·lules M juguen un paper principal en la inducció de la resposta immunitària, degut a la seva capacitat per transportar macromolècules i microorganismes des del lumen cap a les plaques de Peyer (Buda *et al.*, 2005).

► Miofibroblasts intestinals

Els miofibroblasts constitueixen una família de cèl·lules que juguen un paper molt important en la regulació de processos biològics fonamentals com són la motilitat, proliferació, diferenciació, apoptosi, morfogènesi, reparació i inflamació cel·lular. A nivell intestinal s'han identificat dos tipus de miofibroblasts: les cèl·lules intersticials de Cajal (ICC) i els miofibroblasts subepitelials intestinals (ISEMF). Aquests miofibroblasts estan units entre ells principalment per unions adherents consistents en caderines unides al citoesquelet d'actina a través de β -catenina (Danjo i Gipson, 1998). Els anticossos que reaccionen contra l'actina de múscul llis (α -SMA) permeten identificar tant els ISEMF com les ICC (Powell *et al.*, 1999). Diferents estudis com, per exemple, els de Jain i col·laboradors (1998) han demostrat que els anticossos contra α -SMA són el millor marcador d'aquests miofibroblasts.

Les **cèl·lules intersticials de Cajal** es van descobrir fa més de 100 anys, però no va ser fins a mitjans segle XX que es van identificar com a fibroblasts (Sanders, 1996). Estan situades a la submucosa i a la muscular en associació amb el múscul llis de l'intestí. Les ICC tenen tres funcions principals: regulen la

motilitat intestinal del múscul llis, faciliten la propagació elèctrica i modulen la neurotransmissió (Sanders *et al.*, 2006). A més, com a miofibroblasts també actuen com a moduladors immunològics, en el creixement, en processos de reparació i en la fibrosi (Sanders *et al.*, 2002).

Els **miofibroblasts subepiteliais intestinals** estan localitzats a la làmina pròpia per sota de les cèl·lules epitelials de les criptes i van ser descoberts per Pascal i col·laboradors fa més de 30 anys (1968). En la figura 2-I (Powell *et al.*, 2005) en les dues seccions de les criptes de còlon s'aprecia la tinció de α -SMA en els miofibroblasts, situats per sota les cèl·lules epitelials. Aquests miofibroblasts expressen i secreten un gran repertori de citoquines, factors de creixement, hormones, neurotransmissors, mediadors de la inflamació i proteïnes d'adhesió, així com expressen receptors per a tots aquests lligands (Powell *et al.*, 2005). Expressen diverses proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM), incloent el col·lagen IV, 1- β i γ 1-laminina i fibronectina, i poden alliberar enzims responsables de la remodelació de l'ECM, com les metaloproteinases (MMP) i inhibidors de metaloproteinases en teixit (TIMP).

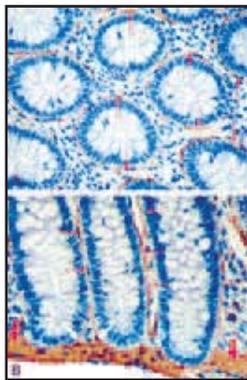


Figura 2-I. Imatges d'immunohistoquímica d'una secció transversal (A) i una secció longitudinal (B) de la mucosa de còlon distal on s'aprecia el marcatge de α -SMA (color marró). S'assenyalen els miofibroblasts subepiteliais (fletxa prima) i la capa muscular (fletxa gruixuda) (Powell *et al.*, 2005).

Les MMP són una família de 24 membres d'enzims que degraden l'ECM, com per exemple, la MMP-2 és capaç de degradar el col·lagen tipus IV i V i la MMP-3 degrada els proteoglicans, la laminina, fibronectina i col·lagens no fibrilars. El balanç entre MMP i TIMP regula la remodelació de l'ECM. Els ISEMF s'ha vist que proliferen en resposta a diferents factors com poden ser el factor de

creixement epidèrmic (EGF), factors de creixement d'insulina I i II (IGF-I i IGF-II), l'interleucina-1 β (IL-1 β), i el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Andoh *et al.*, 2005).

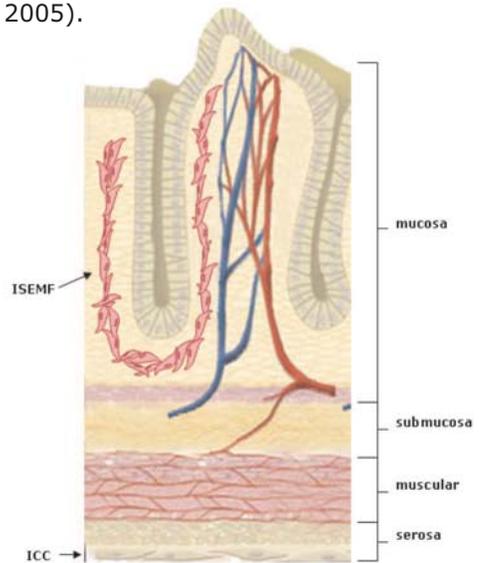


Figura 3-I. Representació de la situació dels miofibroblasts intestinals respecte les quatre capes de la paret intestinal al còlon distal.

Els ISEMF intervenen en diferents funcions com pot ser en el creixement i el desenvolupament mucosal, en la contracció intestinal, reparació, fibrosi, neoplàsia, transport d'aigua i electròlits i també en processos immunològics i en la inflamació (Powell *et al.*, 2005). En situacions d'altres concentracions plasmàtiques d'angiotensina II i d'aldosterona s'ha vist que també proliferen donant lloc a una xarxa al voltant de les criptes del còlon, juntament amb les proteïnes de l'ECM que alliberen, que intervé en el transport d'aigua i electròlits en aquesta zona intestinal (Naftalin i Pedley, 1999).

► Absorció d'aigua i electròlits

Les molècules poden travessar l'epiteli intestinal mitjançant dues vies, la transcel·lular i la paracel·lular. La via de pas **transcel·lular** consisteix en el pas de substàncies a través dels enteròcits per la membrana apical, citoplasma i membrana basolateral. Aquesta via pot utilitzar com a mecanismes de pas la difusió, el transport actiu i la transcitosi. La via **paracel·lular** implica el pas de les molècules a través de les unions intercel·lulars cap a l'espai intersticial.

► Absorció i secreció d'electròlits

El moviment d'ions a través de les membranes pot tenir lloc per difusió o mitjançant una proteïna de membrana. L'entrada per difusió és un procés que no requereix energia, és a dir, electroneutre, ja que es realitza a favor de gradient de concentració. Les proteïnes de membrana constitueixen porus o canals i transportadors. Els mecanismes que requereixen un aport d'energia, electrogènics, són mediats per transportadors, i es caracteritzen en que poden transportar els soluts en contra del seu gradient electroquímic. L'ió que s'absorbeix majoritàriament és el Na^+ , mentre que la secreció està protagonitzada pel Cl^- . A la base de les criptes es donen majoritàriament processos de secreció, però a mesura que les cèl·lules avancen cap a la part superior de la cripta els processos d'absorció són més importants. En l'intestí prim, els mecanismes que es troben de forma majoritària a la membrana apical dels enteròcits són l'intercanviador Na^+/H^+ , el transport acoblat de Na^+ i no-electròlits i l'absorció electroneutra de NaCl . L'intestí gros té dues zones diferenciades, la part més proximal que comparteix els mateixos mecanismes que l'intestí prim, i la part més distal on hi predomina l'absorció electrogènica de Na^+ . La membrana apical dels colonòcits es caracteritza per la presència de canals selectius per al Na^+ , mentre que la membrana basolateral conté canals específics per al K^+ . En tots els segments intestinals, l'entrada de sodi a través de la membrana apical comporta la seva sortida a través de la membrana basolateral per l'ATPasa Na^+/K^+ , responsable de la sortida de Na^+ de la cèl·lula en contra del gradient electroquímic (Kunzelmann i Mall, 2002).

En l'**absorció electroneutra de NaCl** no hi ha moviment net de càrregues ja que la seva estequiometria és 1:1. De fet consisteix en el funcionament de dos intercanviadors alhora, Na^+/H^+ i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, situats a la membrana apical. L'intercanvi de Na^+ i H^+ és un mecanisme de transport electroneutre que utilitza una proteïna transportadora. L'intercanviador Na^+/H^+ rep l'acrònim de NHE i se n'han identificat 9 tipus. En el tracte gastrointestinal hi ha tres isoformes a la membrana plasmàtica, de les quals la NHE1 es troba a la membrana basolateral i les NHE2 i

NHE3 estan a la membrana apical, i 3 isoformes intracel·lulars, NHE6, 7 i 9 (Zachos *et al.*, 2005). L'ió Na^+ entra a favor del seu gradient electroquímic a la vegada que té lloc la sortida d'un ió H^+ en sentit contrari. El transportador es pot inhibir amb concentracions milimolars d'amilorida (Wormmeester *et al.*, 1998), un diürètic del grup dels estalviadors de potassi. La proteïna encarregada de l'intercanvi de Cl^- i HCO_3^- rep el nom d'intercanviador d'anions tipus 1 (AE1). A la membrana basolateral s'expressen tant l'AE1 com l'AE2. L'expressió de l'AE1 és inhibida per aldosterona (Kunzelmann i Mall, 2002).

L'**absorció electrogènica de Na^+** es realitza a través del canal apical anomenat canal epitelial de sodi (ENaC). Tot i que es va identificar i caracteritzar ja fa més de mig segle (Ussing i Zerahn, 1951), la seva estructura molecular es va determinar molt posteriorment mitjançant l'expressió de mRNA extret de còlon distal de rata en oòcits de *Xenopus* (Canessa *et al.*, 1994). Aquests experiments van revelar que estan constituïts per tres subunitats glicoproteïques d'entre 60 i 75 kDa, la α , la β i la γ . Tot i que s'han proposat diverses estequiometries, una d'elles la de $2\alpha:1\beta:1\gamma$ (Rossier *et al.*, 2002), l'estequiometria exacta és incerta (Staruschenko *et al.*, 2005). Les tres subunitats juntes formen un canal funcional, tot i que la unitat α per si sola també en pot formar. El canal està format per dos segments transmembrana, un llarg domini extracel·lular i els residus amino i carboxiterminals al cantó citoplasmàtic. El canal és extremadament més selectiu pel Na^+ que pel K^+ , i és inhibit pel diürètic amilorida i anàlegs (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2000). L'entrada de Na^+ sensible a l'amilorida varia segons l'estat d'hidratació i de salinització de l'animal. Els canals ENaC s'expressen al ronyó, al còlon, a les glàndules salivals, als pulmons i a la pell dels amfibis. El segment intestinal on s'expressen més canals ENaC és el còlon distal. L'aldosterona i la vasopressina són dues de les hormones que regulen aquests canals, tant incrementant la inserció de nous canals com reduint la seva degradació i reciclatge (Malik *et al.*, 2006). Però

la regulació d'ENaC és dependent del teixit diana, ja que s'ha descrit que tant l'aldosterona com els glucocorticoides actuen tant al ronyó com al còlon (Stokes i Sigmund, 1998) però la vasopressina tan sols s'ha vist que actua al ronyó (Malik *et al.*, 2006).

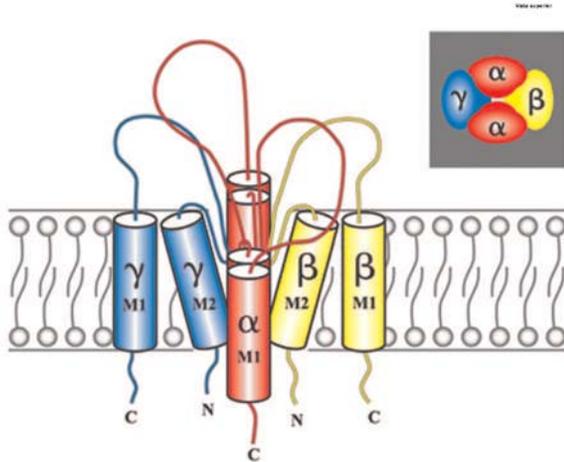


Figura 4-I. Estructura del canal ENaC (modificat de Gormley *et al.*, 2003).

Cada subunitat d'ENaC és capaç d'arribar a la membrana plasmàtica però perquè el *trafficking* sigui eficient requereix l'assemblatge de les tres subunitats. En el ronyó, en condicions basals hi ha una transcripció major de subunitats α i γ -ENaC. L'aldosterona actua augmentant la transcripció de la subunitat α -ENaC, que té com a resultat l'assemblatge del canal i el *trafficking* cap a la membrana. En el còlon, en canvi, l'aldosterona augmenta principalment la transcripció de les subunitats β i γ -ENaC (Snyder, 2005).

La part distal del còlon és capaç d'absorbir i secretar K^+ . A la membrana apical hi ha canals específics per aquest ió, responsables de la seva secreció, i que són inhibibles per Ba^{++} aplicat al cantó mucosal o per l'addició serosal d'ouabaina. A la membrana basolateral el K^+ entra dins la cèl·lula mitjançant l'ATPasa Na^+/K^+ , però també hi ha canals específics per aquest ió, ATPases H^+/K^+ (Kunzelmann i Mall, 2002).

El principal mecanisme de secreció de Cl^- a la membrana apical del còlon està mediat pel transportador denominat regulador del transport

transmembrana de fibrosis quística (CFTR). El CFTR és un membre de la família de transportadors ABC (*ATP-binding cassette*), l'únic membre de la família que transporta clorur (Gadsby *et al.*, 2006).

Veure Figura 5-I pàgina 12.

» Absorció d' H_2O

En condicions normals l'organisme absorbeix gairebé el 99% de l'aigua i dels ions que arriben al tracte gastrointestinal. L'aigua s'absorbeix majoritàriament a l'intestí prim. L'absorció d'aigua al còlon, que reabsorbeix diàriament aproximadament 1,5 litres d'aigua en el cas del humans, és una de les seves principals funcions. El moviment d'aigua té lloc a favor del seu gradient químic. El flux net d'aigua és el resultat del gradient de concentració de l'aigua a ambdós costats de l'epiteli i de la diferència de pressió hidrostàtica. A la part proximal de l'intestí hi ha un balanç favorable a la seva absorció. En el jejú s'absorbeixen grans quantitats d'aigua de forma isotònica. A partir de l'ili, en canvi, l'epiteli intestinal és capaç d'absorbir aigua en contra de gradients osmòtics elevats.

En el còlon el moviment de l'aigua es troba amb una forta oposició degut a l'alta osmolalitat de les femtes (Ma i Verkman, 1999; Kunzelmann i Mall, 2002). El mecanisme pel qual el còlon absorbeixi aigua en contra de grans gradients osmòtics encara no s'ha establert del tot, i s'han suggerit diferents models i teories per explicar-ho. Hi ha hagut diferents models que han proposat l'existència de 3 compartiments amb diferents gradients (Edmonds, 1981; Jodal i Lundgren, 1983), però la localització anatómica d'aquests compartiments no s'ha definit. La hipòtesi més acceptada actualment, proposada per Naftalin i col·laboradors (1999), es basa en que la xarxa de miofibroblasts de la zona pericriptal representa una barrera per als soluts, dificultant la difusió del Na^+ cap als capil·lars sanguinis, de manera que es crea un espai hipertònic en aquesta zona de la paret intestinal. La pressió negativa dóna lloc a un gradient osmòtic que afavoreix l'absorció d'aigua des de la llum de la cripta, resultant en femtes amb un elevat grau de deshidratació.

L'aigua travessa l'epiteli per la via paracel·lular, a

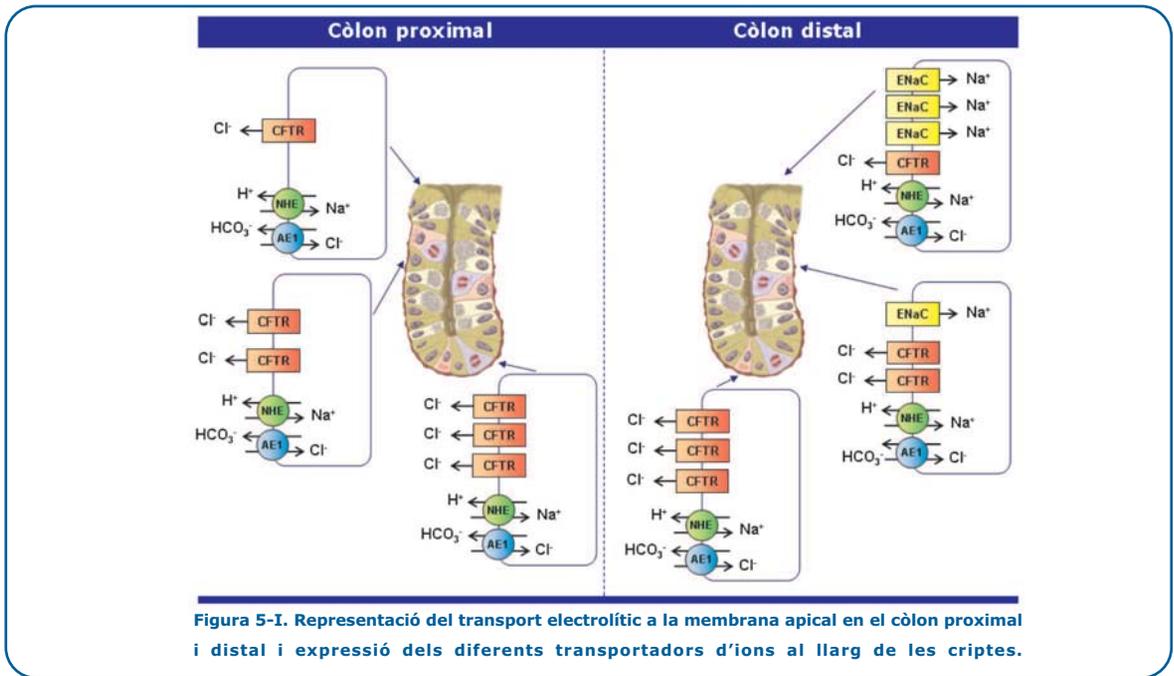


Figura 5-I. Representació del transport electrolític a la membrana apical en el còlon proximal i distal i expressió dels diferents transportadors d'ions al llarg de les criptes.

través de les unions estretes, i també per la via transcel·lular. El moviment d'aigua per via transcel·lular es pot donar per difusió passiva a través de la bicapa lipídica, mitjançant el co-transport amb electròlits i altres nutrients (Loo *et al.*, 1996; Meinild *et al.*, 1998) i per difusió a través de canals específics d'aigua anomenats **aquaporines** (AQP). Les aquaporines constitueixen una família de proteïnes de membrana integrals que s'expressen en diversos teixits amb alta permeabilitat a l'aigua, com és el cas del còlon. Cada proteïna està composta per una cadena polipeptídica d'aproximadament 270 aminoàcids amb 6 segments transmembrana, units per 3 segments extracel·lulars i 2 intracel·lulars, i els dos extrems carboxi i amino terminals en el citoplasma (Figura 6-I). Fins ara, en els mamífers se n'han identificat 13 isoformes (AQP-0/AQP-12) (Noda i Sasaki, 2006). En el tracte gastrointestinal se n'han descrit 8 de diferents, que s'expressen de forma característica en cada un dels diferents segments (Matsuzaki *et al.*, 2004). En concret, en el colonòcits de la zona distal del còlon s'ha demostrat la presència de les següents isoformes: AQP-1 (Koyama *et al.*, 1999), AQP-2 (Gallardo *et al.*, 2001; Mobasher

et al., 2005), AQP-3 (Mobasher *et al.*, 2005), AQP-4 (Koyama *et al.*, 1999), AQP7 (Laforenza *et al.*, 2005) i AQP8 (Koyama *et al.*, 1999).

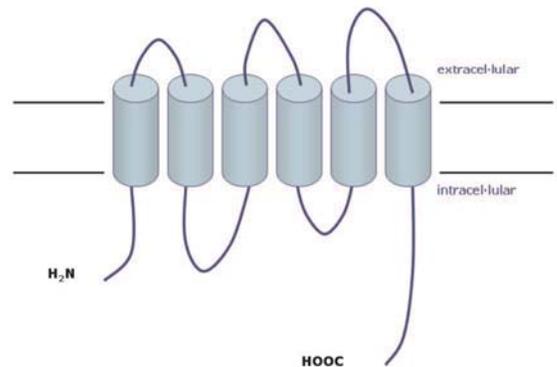


Figura 6-I. Estructura de les aquaporines.

► Propietats elèctriques intestinals

Com a conseqüència de la polarització de les membranes, hi ha un moviment de matèria de la llum intestinal a l'interior de l'organisme. Aquesta funció implica un moviment asimètric de les partícules a través de la paret intestinal. Els fluids intersticials i intracel·lulars són solucions d'electròlits i, per tant, conductors iònics, i a més estan separats per una membrana que fa d'aïllant. Per tant, tots aquests mecanismes donen lloc a l'existència de propietats elèctriques intestinals: la diferència de potencial, el corrent de curtcircuit i la resistència transepitelial. Les

tres es relacionen mitjançant la llei d'Ohm, segons la qual, el quocient entre la diferència de potencial i la intensitat del corrent dóna lloc a la resistència elèctrica.

La diferència de potencial (PD) que s'estableix en l'epiteli intestinal és deguda a diferents factors, entre ells, la separació de càrregues produïda pels gradients dels diferents ions a través de la membrana, la permeabilitat que presenta la membrana als diferents ions, la presència d'anions no difusibles dins la cèl·lula i al moviment de sodi, que entra dins les cèl·lules des de la part luminal i després surt pel cantó serosal a través de l'ATPasa Na^+/K^+ , per la qual surten 3 Na^+ i entren dins la cèl·lula 2 K^+ . Tots aquests mecanismes donen lloc a que l'interior de la cèl·lula sigui més negatiu que l'exterior i, per tant, que hi hagi una diferència de potencial (Powell, 1981).

Ussing i Zerahn (1951) van establir la correlació entre el transport actiu de Na^+ i el corrent elèctric, ja que s'ha demostrat que aquest és l'ió que participa majoritàriament en aquests processos. Per tal que el transport actiu de Na^+ no es trobi influenciat per cap mena de força elèctrica ni química i no hi hagi fluxos passius nets, es neutralitza la diferència de càrrega aplicant una tensió de la mateixa magnitud que la que passa pel teixit però de sentit contrari. En aquestes condicions la intensitat del corrent que passa pel circuit extern s'anomena Intensitat de corrent de curt-circuit (Isc) i equival al sumatori de tots els mecanismes que transporten ions des del cantó mucosal al serosal.

La resistència transepitelial (TER) que presenten els epitelis està condicionada per la composició de les unions estretes. Tenint en compte la resistència elèctrica, es poden diferenciar tres tipus d'epiteli (Powell, 1981):

- Epitelis laxos o porosos: transporten una gran quantitat de fluids i electròlits i presenten una resistència baixa que origina una diferència de potencial baixa, entre 0 i 5 mV. Alguns exemples són l'epiteli de l'intestí prim i el túbul proximal dels mamífers.

- Epitelis moderadament compactes: presenten característiques intermèdies entre els epitelis laxos i els compactes. L'exemple més representatiu és l'epiteli del còlon.

- Epitelis compactes: transporten soluts en contra de gradients electroquímics elevats i presenten una resistència elevada que origina una diferència de potencial gran, entre 20 i 100 mV. Un exemple és l'epiteli de la bufeta urinària.

FUNCIÓ DE BARRERA

Tot i que l'epiteli intestinal és indispensable per la seva funció d'absorció de nutrients, també representa una porta d'entrada a infinitat de patògens. Per aquest motiu, l'intestí també desenvolupa una funció de barrera, preveient l'accés de substàncies nocives a l'organisme. El control de la interacció entre el medi ambient i l'organisme el realitzen dos elements clau: la permeabilitat intestinal i la defensa intestinal mucosal (Fasano i Shea-Donohue, 2005). A més, l'intestí gaudeix d'una sèrie de mecanismes protectors no específics que participen en aquesta funció de defensa. Així, el mateix epiteli intestinal actua de barrera física a l'entrada d'agents nocius, la integritat de la qual es manté mitjançant les unions intercel·lulars. Des de l'epiteli, alguns tipus cel·lulars participen amb la producció i alliberació de substàncies defensores, com el mucus produït per les cèl·lules *goblet* o la α -defensina produïda per les cèl·lules de Paneth (Moal i Servin, 2006).

► Permeabilitat intestinal

La permeabilitat de l'epiteli intestinal depèn de la regulació de les unions intercel·lulars. Les unions intercel·lulars són dinàmiques, molt ben regulades i intervenen en el desenvolupament i en processos tant fisiològics com fisiopatològics (Fasano i Shea-Donohue, 2005). Hi ha diferents tipus d'unions intercel·lulars, entre elles les **unions estretes**, que constitueixen una banda contínua a la zona subapical de la cèl·lula; les **unions adherents**, que formen una banda d'adhesió, també contínua, per sota de les unions estretes; les **unions de comunicació**; i, finalment, els **desmosomes** que, com les anteriors,

són unions puntuals amb forma arrodonida o oval que es troben repartides al llarg de les membranes laterals de les cèl·lules epitelials (Lutz i Siahaan, 1997; Tsukita *et al.*, 2001).

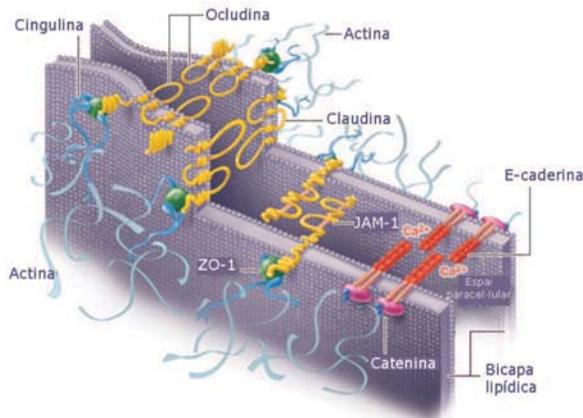


Figura 7-I. Representació de les unions intercel·lulars entre dues membranes lipídiques (modificat de www.nastech.com).

Les **unions estretes** tenen un paper fonamental en el moviment paracel·lular d'aigua i soluts a través de l'epiteli. Aquestes unions estan formades per partícules proteiques transmembranals que uneixen dues cèl·lules epitelials (Aijaz *et al.*, 2006). Entre les diferents famílies de proteïnes que conformen les unions estretes, les més importants són les proteïnes transmembrana formadores del complex d'unió, del qual se n'han identificat tres: la molècula d'adhesió JAM (Martin-Padura *et al.*, 1998), l'occludina (Furuse *et al.*, 1993) i la família de les claudines (Furuse *et al.*, 1998; Tsukita *et al.*, 2001).

Les claudines estan formades per quatre segments transmembrana amb terminacions amino i carboxi citoplasmàtiques (Tsukita i Furuse, 2002). Algunes claudines formen unions homodimèriques i altres poden formar unions heterodimèriques (Anderson, 2001). S'han identificat, com a mínim, 24 gens que codifiquen diferents claudines en humans i en ratolins, amb un pes molecular que va de 20 a 27 kDa (Van Itallie i Anderson, 2004). S'ha demostrat que les claudines són directament responsables del moviment selectiu d'ions en l'espai paracel·lular (Colegio *et al.*, 2002). Entre les diferents claudines, la claudina 4 és una de les més estudiades i s'ha descrit com una de les principals moduladores de les unions estretes (Le Moellic *et al.*, 2005).

Les **unions adherents**, per altra banda, formen una xarxa d'unió entre cèl·lules, principalment mitjançant la família de molècules anomenades caderines, glicoproteïnes transmembrana depenents de calci (Provost i Rimm, 1999). S'han identificat diferents caderines, entre d'altres l'E-caderina, la N-caderina, l'OB-caderina o la VE-caderina. Les caderines s'uneixen en el domini citoplasmàtic a la β -catenina, que al seu torn s'uneix a l' α -catenina, la qual s'acaba unint a l'actina o a altres proteïnes associades com poden ser la vinculina o l' α -actinina (Yagi i Takeichi, 2000).

Les unions intercel·lulars estan fortament regulades per tal d'actuar ràpida i coordinadament. Estudis *in vitro* suggereixen que diferents citoquines alliberades per cèl·lules immunes, com el TNF- α o l'interferó gamma (IFN- γ), i radicals com l'òxid nítric (NO), poden donar lloc a una disfunció de la barrera intestinal en malalties inflamatòries intestinals (Clayburgh *et al.*, 2004). La zonulina és una molècula que modula de forma reversible les unions intercel·lulars. Tot i que el seu paper fisiològic encara s'ha d'establir, està involucrada en diferents processos com el moviment de fluid, macromolècules i leucòcits tant del lumen cap als vasos sanguinis, com a l'inrevés, i en la defensa de l'intestí contra els microorganismes (Fasano i Shea-Donohue, 2005).

La mesura de la permeabilitat intestinal és un dels mètodes més directes per quantificar la funció de la barrera intestinal. Hi ha diferents mètodes per mesurar aquesta permeabilitat. En els models *in vitro* s'utilitzen macromolècules marcades radioactivament o amb fluorescència (Ghandehari *et al.*, 1997), la peroxidasa de rave (Kiliaan *et al.*, 1998) i, inclús, bacteries marcades (O'Brien *et al.*, 2002). En els models *in vivo* en animals i persones s'utilitzen macromolècules, com poden ser: sucres poc metabolitzables com el manitol o la lactulosa (Delahunty i Hollander, 1986), polietilenglicols de diferents mides, i manitol i EDTA marcats radioactivament (Oman *et al.*, 1995) o dextrans (Tagesson *et al.*, 1978). La permeabilitat a dextrans, macromolècules d'alt pes molecular, permet l'estudi de la

permeabilitat intestinal per la via paracel·lular, ja que a causa de les seves dimensions no travessen les cèl·lules per la via transcel·lular (Wang *et al.*, 2001).

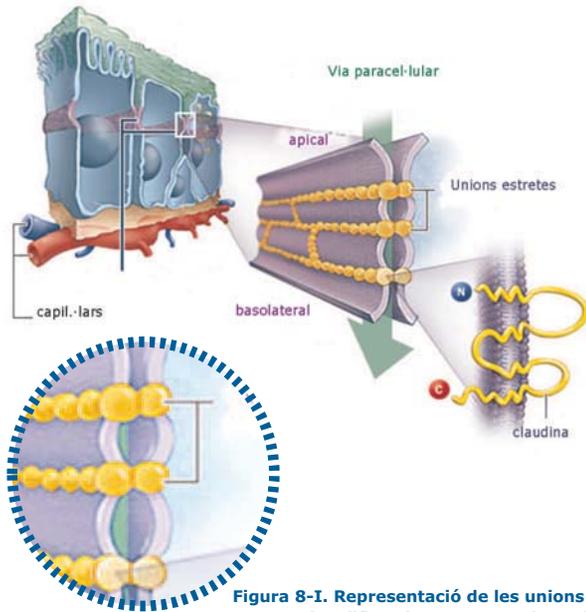


Figura 8-I. Representació de les unions estretes (modificat de www.nastech.com).

► Defensa intestinal mucosal

La defensa intestinal mucosal la duu a terme el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT). El GALT impedeix que els antígens intestinals potencialment perjudicials puguin arribar al sistema circulatori, donant lloc a una resposta immunitària contra aquests antígens luminals mitjançant la secreció d'IgA i la inducció de l'activació i diferenciació de les cèl·lules T. Aquest teixit limfoide associat a la mucosa intestinal es pot dividir en el GALT organitzat, integrat per les plaques de Peyer (PP), els fol·licles limfoides aïllats i els ganglis limfàtics mesentèrics, i el GALT difús, constituït per limfòcits intraepiteliais (IELs) i limfòcits de la làmina pròpia (Fasano i Shea-Donohue, 2005). El GALT organitzat es considera el compartiment inductor, on es produeix el contacte amb l'antigen i s'inicia la resposta immune. El GALT difús, en canvi, es considera el compartiment efector, on es troben les cèl·lules efectores que destrueixen l'agent patògen.

Les plaques de Peyer són agregats limfoides localitzats al llarg de l'epiteli intestinal, sobretot

a la zona de l'ili (Brayden *et al.*, 2005). Els antígens presents en el lumen intestinal són transportats a les PP per les cèl·lules M, que estan localitzades a l'epiteli associat al fol·licle (FAE), recobrint les PP. Els antígens són captats i presentats per les cèl·lules dendrítiques situades a l'anomenada volta subepitelial (SED), situada just per sota el FAE. Aquesta captació local d'antígens es creu que constitueix una etapa crítica en la inducció de la immunitat adaptativa mucosal (Sato i Iwasaki, 2005).

Els fol·licles limfoides aïllats són agregats limfoides que guarden una gran semblança a les plaques de Peyer pel que es refereix a la seva composició cel·lular i localització, i també les cobreix el FAE (Newberry i Lorenz, 2005).

Els ganglis limfàtics mesentèrics estan distribuïts en tres zones diferenciades, el còrtex, ric en limfòcits B i macròfags, el paracòrtex, que conté una gran quantitat de cèl·lules T i cèl·lules dendrítiques, i la medul·la, on s'hi troben cèl·lules B i T i cèl·lules plasmàtiques. Les seves funcions principals consisteixen en actuar com a filtre i presentar els antígens al sistema immunitari.

Els limfòcits intraepiteliais són majoritàriament cèl·lules T dispersades estratègicament entre l'epiteli intestinal, per sota de les unions estretes. Tot i que la seva funció no està totalment determinada, es creu que tenen una acció principalment citotòxica, possiblement a través de l'eliminació de cèl·lules epitelials danyades o transformades (Cheroutre, 2005).

Els limfòcits de la làmina pròpia constitueixen una població cel·lular heterogènia, en la que majoritàriament hi ha cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos i limfòcits T, a més de macròfags, cèl·lules dendrítiques, mastòcits i eosinòfils (Cheroutre i Madakamutil, 2005) ■

SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) és un dels mecanismes reguladors més importants de l'homeòstasi hídrica i electrolítica i, conseqüentment, de l'equilibri de la pressió arterial. El RAAS engloba un conjunt de reaccions químiques en forma de cascada enzimàtica, que es desencadenen per l'alliberació d'una proteasa, la renina, i que culminen en la síntesi d'angiotensina II i d'aldosterona. La producció de renina té lloc a les cèl·lules epitelials especialitzades de les arterioles aferents juxtaglomerulars del ronyó a partir de la prorenina, que és el precursor inactiu de la renina. La renina actua sobre l'angiotensinogen, una alfa 2 globulina circulant que es sintetitza en el fetge, catalitzant el pas d'un pèptid de 452 aminoàcids, a un decapeptid inactiu, l'angiotensina I. L'angiotensina I és transformada a l'octapeptid actiu angiotensina II (Ang II) per l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA). Per últim, l'angiotensina II actua a nivell dels seus receptors a les glàndules suprarenals donant lloc a l'alliberació d'aldosterona (Aldo) (Williams, 2005). L'alliberació de renina al ronyó està regulada per l'acció integrada de diferents factors, tant extra com intra renals, que actuen sobre les cèl·lules juxtaglomerulars. Entre els factors que n'estimulen

l'alliberació hi ha la disminució de la pressió de perfusió al ronyó, la disminució de la concentració plasmàtica de Na^+ , l'estimulació betaadrenèrgica i prostaglandines, com la PGI2. Els factors que, per contra, n'inhibeixen l'alliberació són l'angiotensina II, el potassi, el pèptid natriurètic atrial (ANP), la dopamina o l'estimulació alfaadrenèrgica, entre d'altres. De manera general, els factors que estimulen l'alliberació de renina ho fan incrementant l'AMPC a les cèl·lules juxtaglomerulars, mentre que els que l'inhibeixen ho poden fer mitjançant dos mecanismes, ja sigui incrementant el GMPc o activant la fosfolipasa C (Bader i Ganten, 2000).

Tot i que la síntesi majoritària de renina es produeix als ronyons hi ha diversos teixits que sintetitzen renina o algun dels components del RAAS (Lavoie i Sigmund, 2003). Tots els components del RAAS, constituint un RAAS local, han estat trobats en el cervell (Morimoto i Sigmund, 2002), el cor i teixit vascular (Bader *et al.*, 2001), el teixit adipós (Engeli *et al.*, 2000), les gònades (Speth *et al.*, 1999), el pàncrees (Sernia, 2001), la placenta (Nielsen *et al.*, 2000), les glàndules adrenals (Kifor *et al.*, 1991) o el ronyó (Bader *et al.*, 2001). També en el còlon s'ha suggerit la presència d'un RAAS local, ja que s'hi ha detectat renina i altres components (Hirasawa *et al.*, 2002). Tot i amb això, gairebé la totalitat de la renina circulant

Accions Angiotensina II

Homeòstasi hídrica i electrolítica:

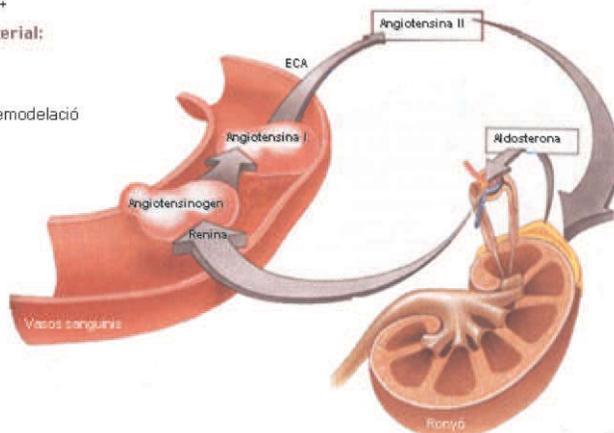
Estimulació síntesi aldosterona
Estímul set i ingesta de sal
Reabsorció renal de Na^+

Regulació pressió arterial:

Vasoconstricció

Accions paracrines:

Proliferació cel·lular i remodelació tissular
Dany tissular i fibrosi



Accions Aldosterona

Homeòstasi hídrica i electrolítica:

Reabsorció de Na^+ mitjançant estimulació ENaC a ronyó i còlon
Excreció de K^+ i H^+ i retenció d'aigua

Accions paracrines:

Disfunció vascular endotelial
Dany tissular i fibrosi

Figura 9-I. Esquema de la cadena enzimàtica del RAAS (modificada de www.health-on-topic.net).

prové dels ronyons, ja que s'ha comprovat que la nefrectomia bilateral en humans i animals redueix aquesta renina circulant a nivells indetectables. Els RAAS locals, doncs, actuen com a factors autocrins o paracrins (Williams, 2005).

La inhibició del RAAS es pot realitzar mitjançant quatre vies diferents (Erhardt, 2005; Robbins i Diz, 2006). Des del principi de la cascada enzimàtica, es pot bloquejar competitivament la unió renina-angiotensinogen amb els denominats inhibidors de la renina. També es pot inhibir l'ECA amb els denominats inhibidors de l'ECA (iECA), agents hipotensors amb efecte natriurètic i antihipertensiu. El seu mecanisme d'acció es basa en la interrupció de la síntesi d'angiotensina II, preveient l'efecte vasoconstrictor i la secreció d'aldosterona. Com a representants dels iECA hi trobem el Captopril, Lisinopril o Enalapril, entre d'altres. Una altra via consisteix en utilitzar antagonistes selectius dels receptors AT1 de l'angiotensina II, que disminueixen la síntesi d'aldosterona i són antihipertensius. El primer antagonista AT1 desenvolupat i el més estudiat és el Losartan. Finalment, hi ha antagonistes del receptor d'aldosterona, com per exemple l'espironolactona.

ANGIOTENSINA II

Fa més de 60 anys que els grups d'Helmer i Page (1939) i de Braun-Menendez i col·laboradors (1940) van identificar el pèptid vasoactiu del RAAS, anomenant-lo "hipertensina" i "angiotonina", respectivament. L'angiotensina, com es coneix actualment, prové de la fusió d'aquests dos primers noms que se li van donar. L'angiotensina II juga un paper primordial en la regulació de la pressió arterial, en l'homeòstasi hídrica i electrolítica i en la remodelació patològica del cor (Kurdi *et al.*, 2005).

La transformació plasmàtica del decapeptid inactiu angiotensina I a l'octapeptid angiotensina II la duu a terme l'ECA. L'ECA és una zinc metaloendopeptidasa, que actua com una peptidil dipeptidasa C-terminal, i s'expressa tant a l'endoteli vascular com a altres llocs com poden

ser els macròfags, a l'epiteli tubular renal o a l'epiteli intestinal proximal (Kurdi *et al.*, 2005). Un únic gen conté dos proteïnes ECA diferents, que s'expressen a través de la transcripció per diferents promotors (Soubrier *et al.*, 1994). L'ECA és el responsable de la síntesi d'angiotensina II. En canvi, l'ECA2 genera un nonapeptid (Ang 1-9) a partir de l'angiotensina I i degrada l'angiotensina II a un heptapeptid (Ang 1-7) (Outdit *et al.*, 2003). La funció de l'Ang (1-9) es desconeix (Robbins i Diz, 2006). En canvi, l'Ang (1-7) s'ha descrit que és un pèptid vasodilatador i antiproliferatiu, que juga un paper antihipertensiu important ja que contraresta els efectes de l'Ang II en la pressió arterial i en el creixement cel·lular (Chappell *et al.*, 2004). A més, al plasma, l'angiotensina II és convertida en angiotensina III i angiotensina IV, els quals tenen una certa activitat vasoconstrictora, per proteases anomenades angiotensinases, de les quals l'aminopeptidasa A és la més abundant a l'organisme (Song i Healy, 1999).

► Receptors d'angiotensina II

L'angiotensina II actua a través de dos tipus de receptors de membrana, l'AT₁ i l'AT₂. Tots ells han estat clonats i seqüenciats (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991). Tot i que s'han clonat altres tipus de receptors de l'angiotensina II, encara no estan prou ben caracteritzats. La majoria d'accions de l'Ang II estan mediatees pels receptors tipus AT₁,

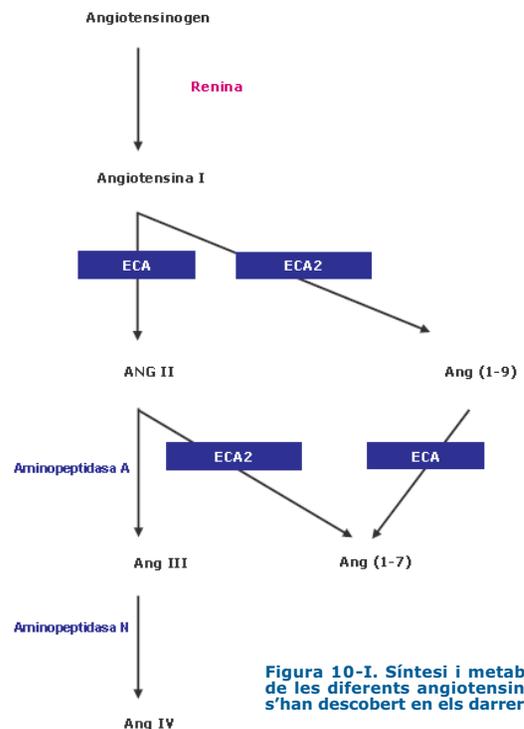


Figura 10-I. Síntesi i metabolisme de les diferents angiotensines que s'han descobert en els darrers anys.

que pertanyen a la família de receptors units a proteïna G, de set segments transmembrana. La unió de l'Ang II a aquests receptors activa la fosfolipasa C, que acaba donant lloc a l'activació de la proteïna quinasa C (PKC) i als canals de Ca^{2+} (Breitwieser, 2004). En humans tan sols s'expressa el gen AT_1 , mentre que rates i ratolins expressen dos subtipus, AT_{1A} i AT_{1B} , que comparteixen una homologia del 95% i són similars farmacològicament (Kurdi *et al.*, 2005). La majoria d'accions de l'Ang II estan mediades per aquest receptor, gairebé sempre a través del subtipus AT_{1A} , excepte en les glàndules adrenals on el control de la secreció d'aldosterona es realitza mitjançant l' AT_{1B} . Ambdós subtipus estan expressats en igualtat a la melsa, el fetge i els ronyons, però l' AT_{1A} predomina al múscul llis vascular, al cor, als pulmons i al cervell mentre que l' AT_{1B} és el majoritari a les glàndules adrenals i a la pituitària.

El paper del receptor AT_2 és més controvertit. En rates, aquest receptor és el predominant (>95%) durant el període fetal, però els seus nivells en teixits com el cor, ronyons i vasos sanguinis disminueixen a partir del naixement fins gairebé desaparèixer (Reudelhuber, 2005). Com els AT_1 , també pertanyen a la família de receptors units a proteïna G. Tot i que en un principi es va pensar que la seva única acció fisiològica era antagonitzar els efectes dels AT_1 , inhibint el creixement cel·lular i induint apoptosi (Berry *et al.*, 2001), estudis recents suggereixen que en alguns casos els AT_2 tenen accions proinflamàtores i d'estimulació del creixement com els AT_1 (Levy, 2004).

► Accions de l'angiotensina II

Una de les funcions clau de l'angiotensina II és la regulació del balanç hídric i electrolític, sobretot estimulants la secreció d'aldosterona, però també estimulants la set i la ingesta de sal i afectant directament la reabsorció de sodi al ronyó. L'altra funció clau de l'angiotensina II és la seva acció vasoconstrictora, que participa en la regulació de la pressió arterial. Tot i que l'angiotensina II augmenta la pressió arterial a través d'un efecte vasoconstrictor directe en els vasos sistèmics, la seva influència en l'hemodinàmica renal i en

l'excreció de sal i aigua també afecta la pressió arterial (Perazella i Setaro, 2003). A través de l'activació dels receptors AT_1 de les arterioles eferents, l'Ang II afecta l'hemodinàmica intrarenal reduint la pressió sanguínia renal i augmentant la taxa de filtració glomerular. Aquest efecte incrementa la fracció filtrada, modulant les forces de Starling peritubulars, disminuint la pressió hidroestàtica i incrementant la pressió oncòtica renal. La combinació d'aquests canvis en la pressió dóna lloc en últim terme a la reabsorció de sodi i d'aigua al túbul proximal. Aquesta reabsorció, que contribueix a l'augment del volum sanguini i dóna lloc a hipertensió, també es produeix per acció directa de l'angiotensina II, que estimula transportadors de sodi tant apicals com basolaterals. Al cantó apical incrementa l'activitat de l'intercanviador Na^+/H^+ (Liu i Cogan, 1989). A la membrana basolateral estimula l'ATPasa Na^+/K^+ i el cotransport de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Garvin, 1991).

L'estimulació en la set i en la ingesta de sal la porten a terme conjuntament l'angiotensina II circulants i l'angiotensina II produïda al SNC de forma local. Una disminució del volum sanguini dóna lloc a l'activació del RAAS i a la formació d'Ang II circulants, però també activa la formació d'Ang II cerebral, la interacció de les quals amb els seus receptors del SNC dóna lloc a l'estímul de la sensació de set (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). L'estimulació de la ingesta de sodi per part de l'Ang II cerebral implica no tan sols la despolarització neuronal sinó també síntesi proteica i creixement cel·lular (Fitzsimons, 1998). L'Ang II circulants també es creu que té un paper en el control de la ingesta de sodi, ja que s'ha demostrat que una nefrectomia bilateral disminueix aquest estímul (Fitzsimons i Wirth, 1978). Aquesta acció es podria donar per la interacció directa de l'hormona amb receptors del SNC o per l'estimulació de l'alliberació de mineralcorticoids (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

En els teixits amb RAAS local s'ha descrit que l'Ang II participa en el creixement i diferenciació del teixit. En el ronyó s'ha descrit que l'Ang II té propietats mitogèniques, ja que a través dels

seus receptors AT1 i activant la via de les MAP quinases, dona lloc a proliferació cel·lular i remodelació tissular. L'Ang II promou la deposició de col·lagen mitjançant la inhibició de proteases i, per tant, evitant la degradació proteica (Wolf, 2000). S'ha vist que estimula el factor transformador del creixement β (TGF- β), el factor de creixement derivat de plaquetes i el factor nuclear κ B donant lloc a inflamació, formació de miofibroblastes i a la deposició de col·lagen (Luft, 2002). Inhibidors de l'ECA i antagonistes de l'AT1 han demostrat efectes protectors en la fibrosi renal arribant a disminuir-la (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006). També en el cor, l'Ang II s'ha vist que estimula la fibrosi miocàrdica, segurament a través del TGF- β , ja que s'ha pogut determinar que la seva expressió està estimulada per l'Ang II tant en estudis *in vitro* (Wolf *et al.*, 1993) com *in vivo* (Campbell i Katwa, 1997). El TGF- β s'ha vist que incrementa la matriu extracel·lular estimulant la producció de col·lagen i altres proteïnes i inhibint la seva degradació (Roberts *et al.*, 1986; Campbell i Katwa, 1997). Aquest factor indueix el canvi fenotípic de fibroblasts a miofibroblasts (Lijnen *et al.*, 2003) i la seva inhibició s'ha vist que preveu la proliferació fibroblàstica i la disfunció cardíaca (Kuwahara *et al.*, 2002). En el cas de fibrosi en el fetge, s'ha detectat que hi ha síntesi local d'Ang II en les cèl·lules hepàtiques i que la utilització d'antagonistes del RAAS atenua el desenvolupament d'aquest estat de fibrosi (Bataller *et al.*, 2005).

ALDOSTERONA

Ja a l'any 1934, Zwemer i Sullivan van suggerir que "alguna substància" alliberada pel còrtex adrenal tenia la capacitat d'influir en el metabolisme cel·lular dels sucres i de l'aigua. Però no va ser fins a principis de la dècada dels 50 del segle passat, que la col·laboració entre Tait, Simpson, Reichstein i Wettstein, entre d'altres, va permetre identificar una substància en orina, sang i extractes adrenals amb aquestes propietats (Simpson *et al.*, 1954). Tot i que en un principi se la va anomenar "electrocortina", a causa del seu origen adrenal i a la identificació de la seva estructura esteroide de 18-aldehid,

finalment es va anomenar aldosterona.

L'aldosterona circulant es sintetitza principalment a la zona glomerular del còrtex adrenal a partir del colesterol (Williams, 2005). Les glàndules adrenals, també anomenades glàndules suprarenals es troben immediatament per sobre de cada ronyó. Des del punt de vista estructural i funcional s'hi diferencien dues regions. La part més externa, que s'anomena còrtex o escorça suprarenal, constitueix la major part del volum de la glàndula i envolta la capa més interna, anomenada medul·la suprarenal. El còrtex deriva del mesoderma embrionari i secreta tres classes d'hormones esteroides: glucocorticoides, mineralcorticoides i andrògens corticals. Les hormones del còrtex suprarenal són compostos derivats del colesterol i acaben derivant principalment en esteroides C_{21} i C_{19} . El còrtex suprarenal es subdivideix en tres zones, i cada una d'elles secreta hormones esteroides de grups diferents. La zona glomerular és la zona més externa, situada directament per sota de la càpsula de teixit conjuntiu, i secreta principalment els mineralcorticoides, esteroides C_{21} imprescindibles per al manteniment de l'homeòstasi del sodi i el volum del líquid extracel·lular (LEC). La zona fascicular és la zona intermèdia i secreta principalment glucocorticoides, també esteroides C_{21} , però que afecten principalment el metabolisme de la glucosa i les proteïnes. Finalment, la zona reticular és la zona més interna i sintetitza petites quantitats d'hormones, principalment els andrògens corticals. Tot i que el còrtex suprarenal secreta altres hormones amb activitat mineralcorticoide, aproximadament el 95% d'aquesta activitat és deguda a l'aldosterona.

Tot i que el principal lloc de síntesi d'aldosterona són les glàndules adrenals, s'ha descobert síntesi extraadrenal d'aquesta hormona. Entre el 1967 i el 1972, Lockett i Retallack van descriure la presència de síntesi de compostos esteroides al múscul cardíac i al cor de gats, si bé aquests resultats no es van tenir en compte fins la dècada dels 90, quan Takeda i col·laboradors (1995) van identificar mRNA d'aldosterona sintasa i d'aldosterona en el teixit vascular de rosegadors. Finalment, l'aldosterona sintasa es va identificar a teixit cardiovascular humà, localitzat a la musculatura llisa vascular i a les cèl·lules endotelials (Hatakeyama *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1996). Actualment està acceptat que hi ha síntesi

extraadrenal d'aldosterona al sistema cardiovascular i al sistema nerviós central, on s'ha localitzat síntesi *de novo* de l'hormona (Davies i MacKenzie, 2003).

A més del RAAS, a través de l'acció de l'Ang II sobre les glàndules adrenals, hi ha altres factors que regulen la secreció d'aldosterona. La concentració plasmàtica de K^+ estimula la secreció d'aldosterona independentment dels components del RAAS. Les cèl·lules de la zona glomerular són molt sensibles al potassi; s'ha descrit que un increment en 0,1 mEq/L en la concentració sèrica de potassi pot incrementar en un 25% la concentració plasmàtica d'aldosterona (Himathongkam *et al.*, 1975). L'acció del K^+ és de retroalimentació negativa (Williams, 2005); un augment de la concentració de K^+ en el líquid extracel·lular estimula directament la secreció d'aldosterona al còrtex suprarenal i produeix l'eliminació de l'excés de K^+ pels ronyons, mentre que una reducció de la concentració de K^+ al líquid extracel·lular té l'efecte contrari. Els ions K^+ despolaritzen la membrana cel·lular, produint l'activació dels canals de Ca^{2+} voltatge dependents. Per tant, el K^+ dóna lloc a un augment de la concentració citosòlica de Ca^{2+} que també estimula la secreció d'aldosterona (Boon *et al.*, 1997).

La resta de factors que regulen la secreció d'aldosterona no actuen per mecanismes de retroalimentació i normalment responen a situacions d'estrès. Un dels factors clàssics i més potents és la corticotropina (ACTH), secretada per la hipòfisi, i que activa la formació de pregnenolona i dels seus derivats en el còrtex adrenal. Tot i amb això, el seu efecte estimulador la síntesi d'aldosterona és tan sols agut, arribant a ser inhibidor en situacions cròniques (Seely *et al.*, 1989). Altres secretagogs, encara que amb una acció molt menor a la dels tres factors ja anomenats, són l'endotelina (Hinson *et al.*, 1991) i la serotonina (Ganguly i Hampton, 1985), que tenen receptors a la zona glomerular (Gomez-Sanchez *et al.*, 1990). Entre els factors que inhibeixen l'alliberació d'aldosterona hi ha l'adrenomedulina (AM). L'AM és un potent pèptid hipotensor que es produeix en diferents teixits, com poden ser el sistema nerviós central, el ronyó i les glàndules adrenals. S'ha vist, tant en humans

com en rates, que l'AM atenua l'alliberació d'aldosterona produïda tant per l'angiotensina II com per la concentració plasmàtica de potassi (Yamaguchi *et al.*, 1996; Andries *et al.*, 1997). L'ANP, també s'ha descrit que inhibeix la secreció d'aldosterona mediada per l'angiotensina II (Szalay *et al.*, 1998).

► Receptors d'aldosterona

S'ha descrit que l'aldosterona pot tenir accions genòmiques i no-genòmiques (Lösel *et al.*, 2004). El model clàssic d'acció de l'aldosterona, així com per totes les hormones esteroides, és genòmic, és a dir, inclou la transcripció de gens. Degut a la seva naturalesa lipòfila, l'aldosterona entra a la cèl·lula per difusió a través de la membrana cel·lular (Boldyreff i Wehling, 2004). Un cop al citoplasma s'uneix al receptor mineralcorticoide (MR) intracel·lular i el complex aldosterona-MR transloca cap al nucli, s'uneix a seqüències específiques de DNA i actua com a factor de transcripció. Els primers efectes generats per aquest mecanisme genòmic es poden observar als 30 minuts després de l'alliberació o de l'administració de l'hormona. Per tant, és un procés que requereix un cert temps de resposta. Moltes de les accions de l'aldosterona, però, no es poden descriure per aquest model clàssic, simplement perquè el temps de resposta és menor. En les accions no-genòmiques el temps de resposta pot ser fins i tot de pocs minuts, ja que no hi intervenen processos de transcripció. En aquest cas hi estan involucrats canvis en la concentració o en l'activitat de missatgers secundaris (Boldyreff i Wehling, 2003). La naturalesa dels receptors que donen lloc a l'acció no-genòmica de l'aldosterona no s'ha descrit i s'està investigant si l'aldosterona utilitza el mateix MR citosòlic o s'uneix a un receptor de membrana (Fuller i Young, 2005).

El MR és el principal efector de la resposta cel·lular als mineralcorticoids, com s'ha demostrat amb estudis utilitzant ratolins *knockout* per a aquest receptor (Berger *et al.*, 1998). Però el receptor MR no és selectiu per a cap lligand, ja que totes les hormones corticosteroides es poden unir tant al MR com

al receptor glucocorticoide (GR). Per tant, tant l'aldosterona com els glucocorticoids s'hi uneixen amb una alta afinitat. Ambdós receptors són membres de la família de receptors nuclears que inclou els receptors de les hormones esteroides i tiroïdals, vitamina D₃ i àcid retinoic (Farman i Rafestin-Oblin, 2001). El fet que la concentració plasmàtica de glucocorticoids sigui entre 100 i 1000 cops més elevada que la d'aldosterona limitaria la unió de l'aldosterona al seu receptor. Aquesta situació no succeeix degut a dos factors. Primer de tot, el 90% de glucocorticoids està unit a l'albumina plasmàtica, mentre que l'aldosterona circula majoritàriament en forma lliure. I en segon lloc, l'enzim 11 β -hidroxiesteroid deshidrogenasa (11 β -HSD), de la família d'alcohol deshidrogenases de cadena curta, preveu l'ocupació permanent del receptor MR pels glucocorticoids (Fuller i Young, 2005). Concretament, la isoforma responsable de la protecció és la 11 β -HSD2, que s'ha clonat i caracteritzat funcionalment (Albiston *et al.*, 1994). Aquesta isoforma s'expressa juntament amb el MR a les cèl·lules diana d'aldosterona, amb la funció de transformar els glucocorticoids (cortisol en humans, corticosterona en rosegadors) en metabòlits (cortisona, 11 β -deshidrocorticosterona) amb poca afinitat pel receptor MR (Seckl i Chapman, 1997; Funder *et al.*, 1988). Al còlon s'ha demostrat que una dieta amb un baix contingut de Na⁺ estimula l'expressió de 11 β -HSD2 en rates (Norregaard *et al.*, 2003). La 11 β -HSD2 s'ha trobat també en teixit cardíac humà (Slight *et al.*, 1996). Per tant, en les cèl·lules que coexpressen MR i 11 β -HSD2, l'enzim impedeix l'ocupació permanent del receptor MR per glucocorticoids, permetent la unió d'aldosterona de forma dependent a la seva concentració. La inactivitat de la 11 β -HSD2 causada per mutacions, com en la síndrome d'excés mineralcorticoide aparent, o la inhibició de l'11 β -HSD2 per àcid glicirètic, on els glucocorticoids endògens ocupen permanentment el receptor MR, provoca hipertensió, hipocalèmia i nivells molt baixos de renina i aldosterona (Farman i Rafestin-Oblin, 2001).

► Accions de l'aldosterona

L'aldosterona és una hormona amb accions tant

en cèl·lules epitelials com en no epitelials. El mecanisme d'acció clàssic de l'aldosterona es dona en les cèl·lules epitelials dels teixits diana clàssics, ronyons i còlon (Weber, 2003). Més recentment s'han descobert altres cèl·lules que també expressen el receptor mineralcorticoide, tant epitelials, com és el cas dels queratinòcits epidèrmics, com no epitelials, com les neurones del sistema nerviós central, els miòcits cardíacs, i les cèl·lules endotelials i musculars llises de la vasculatura (Farman i Rafestin-Oblin, 2001).

En els teixits epitelials com el ronyó, el còlon, les glàndules salivaries i les glàndules sudorípares, l'aldosterona promou la reabsorció de Na⁺. El transport de sodi en epitelis amb alta resistència elèctrica, com el ronyó i el còlon distal, aquest efecte està mediat per l'augment de l'activitat del canal ENaC (Williams, 2005). El temps d'actuació de l'aldosterona en l'activació del canal ENaC en teixits epitelials té dues fases. Una resposta aguda que té lloc entre les 0,5 i 3 h i es caracteritza per un increment de 2 a 3 cops de la reabsorció de sodi. En aquest cas, els nivells de mRNA de les tres subunitats incrementen molt poc o gens. I una resposta crònica que té lloc a partir de les 3 h i es caracteritza per un progressiu i gran augment, fins a 20 cops a les 24 h, de la reabsorció de sodi. La regulació del canal ENaC s'aconsegueix incrementant el nombre de canals a la membrana o incrementant la seva probabilitat d'obertura. S'ha vist que l'eliminació de canals a la membrana està mediada per la proteïna Nedd4-2, que al seu torn està inhibida via fosforilació per la quinasa regulada per sèrum i glucocorticoids (sgk1) (Snyder *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2004). L'expressió de sgk1 augmenta ràpidament per l'acció de l'aldosterona, com s'ha demostrat *in vivo* tant en el ronyó com en el còlon (Chen *et al.*, 1999; Naray-Fejes-Toth *et al.*, 1999; Shigaev *et al.*, 2000). A més de la seva interacció amb la Nedd4-2, s'ha vist que la sgk1 podria fosforilar la part carboni terminal de la subunitat α -ENaC alterant l'activitat del canal (Diakov i Korbmacher, 2004) i que pot regular l'expressió gènica de les seves subunitats (Boyd i Naray-Fejes-Toth, 2005). Hi ha altres gens que estan regulats per l'aldosterona en epitelis transportadors. Per exemple, l'aldosterona augmenta l'activitat de la fosfoinositol-3 quinasa (PI3-K), possiblement

mitjançant l'augment en l'expressió de la proteïna G K-ras (Rogerson *et al.*, 2004). A més, en el còlon distal, s'ha descrit que el factor inductor de l'hormona corticosteroide (CHIF) està ràpidament induïda per un mecanisme de transcripció (Fuller i Young, 2005). El CHIF incrementa l'afinitat de l'ATPasa Na^+/K^+ pel Na^+ (Beguin *et al.*, 2001), que podria explicar en part l'increment d'activitat de l'ATPasa que s'observa en resposta a l'aldosterona.

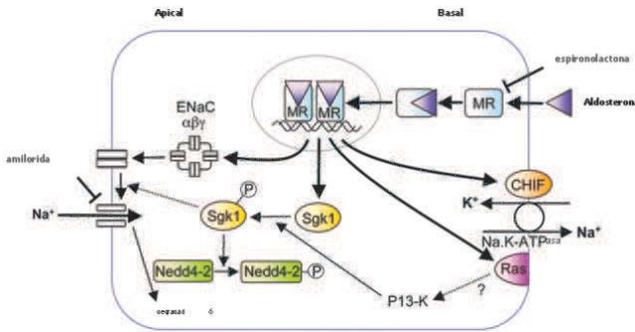


Figura 11-I. Representació d'una cèl·lula epitelial que respon a aldosterona (modificat de Fuller i Young, 2005).

A més de la regulació de la reabsorció de sodi, l'aldosterona regula el flux d'altres ions. La reabsorció de Na^+ produeix la reabsorció d'ions Cl^- i HCO_3^- i la retenció d'aigua. Al mateix temps, l'aldosterona augmenta l'excreció de K^+ en orina. A més, també afavoreix l'excreció de H^+ per l'orina, evitant l'acidosi sanguínia. En part, aquestes accions es poden deure a una resposta electroneutra al flux de sodi, però també s'han descrit efectes directes de l'aldosterona en el transport d'aquests ions (Fuller i Young, 2005).

En els últims anys, però, s'han anat discernint els efectes no epitelials de l'aldosterona i s'ha vist la seva implicació en problemes cardíacs i renals. Brilla i Weber (1992) van demostrar que l'administració d'aldosterona conjuntament amb una dieta amb alt contingut en sodi produïa hipertensió, hipertròfia cardíaca i fibrosi. Més endavant, els resultats de dos assaigs clínics, el RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*), on es van avaluar els efectes de l'espironolactona en pacients amb problemes cardiovasculars (Zannad *et al.*, 2000), i l'EPHESUS (*Eplererone neuroHormonal Efficacy and SURvival Study*), on es va avaluar l'eplerenona per bloquejar els MR (Pitt *et al.*, 2001), van demostrar els efectes beneficiosos d'utilitzar els antagonistes dels

mineralcorticoids en la morbiditat i mortalitat en casos de fallada cardíaca. En concret, els resultats de l'estudi RALES van demostrar que el tractament amb espironolactona de pacients amb problemes cardiovasculars en millorava el pronòstic degut a que limitava la proliferació de la matriu extracel·lular, demostrant la implicació de l'aldosterona en la fibrosi cardiovascular. S'ha suggerit que l'aldosterona activa aquesta proliferació fibroblàstica en el cor promovent l'activació de cascades cel·lulars específiques com la k-Ras o la MAPK1/2 (Chun i Pratt, 2004). En el ronyó, s'ha descrit que l'hiperaldosteronisme té efectes proinflamatoris a mig i llarg plaç, que provoquen fibrosi perivascular i alliberació de citokines proinflamatòries com el $\text{TNF-}\alpha$ (Sun *et al.*, 2000), i és un dels factors que contribueixen al deteriorament de la funció renal (Brewster i Perazella, 2004). A més, recentment, s'ha demostrat en rata que l'aldosterona incrementa l'expressió de col·lagen en els miofibroblasts renals (Nagai *et al.*, 2005). En el ronyó també s'ha demostrat els beneficis de d'antagonitzar l'aldosterona en la disfunció renal (Sato *et al.*, 2003).

VASOPRESSINA

La vasopressina (AVP), també anomenada hormona antiürètica, és el principal regulador fisiològic del contingut d'aigua a l'organisme i de l'osmolalitat al plasma. L'AVP es sintetitza als nuclis supraòptic i paraventricular de les neurones de l'hipotàlem com a prohormona abans de ser transportada al llarg dels àxons fins a la neurohipòfisi, on s'emmagatzema en grànuls secretors. Un cop allà, és alliberada a la circulació mitjançant excitosi (Shrier *et al.*, 1979).

La secreció d'AVP està regulada per estímuls osmòtics i estímuls no osmòtics. L'osmolalitat del plasma està altament regulada en el rang de 280 a 292 mOsm/kg d'aigua (Robertson *et al.*, 1982). Un increment de l'osmolalitat del plasma per sobre del rang basal activa la secreció d'AVP, donant lloc a un increment en l'osmolalitat de l'orina i una disminució de l'osmolalitat al

plasma. Per contra, quan l'osmolalitat plasmàtica disminueix per sota del valor basal aproximat de 280 mOsm/kg, la secreció d'AVP és suprimida, resultant en l'excreció d'aigua, disminució de l'osmolalitat de l'orina i, en últim terme, a l'augment de l'osmolalitat plasmàtica. Aquest mecanisme osmoregulator és extremadament sensible, i canvis en l'osmolalitat al plasma tan petits com un 1% (2.9 mOsm/kg) afecten la concentració plasmàtica d'AVP. Els estímuls no osmòtics que influencien la secreció d'AVP inclouen alteracions en la pressió arterial i en el volum sanguini. L'efecte de la pressió arterial i del volum sanguini en l'AVP es sobreposa als mecanismes osmoregulators, és a dir, la resposta de l'AVP als estímuls osmòtics es manté però els valors basals d'osmolalitat es reajusten, augmentant per exemple en el cas d'hipertensió (Bhardwaj, 2006). L'alliberació no osmòtica d'AVP és deguda a l'acció de mecanoreceptors, que n'activen l'alliberació quan detecten una disminució de la pressió arterial, hipovolèmia, un augment de la resistència vascular perifèrica o un augment en la perfusió renal (Kalra *et al.*, 2001). Altres estímuls no osmòtics inclouen el dolor, l'estrès, la por o l'ansietat (Fraser i Arief, 1997).

La secreció d'AVP es pot veure influenciada per diferents factors. L'endotelina, pèptid sintetitzat a les cèl·lules endotelials involucrat en la regulació del sistema cardiovascular (Gardner *et al.*, 1991), s'ha vist que incrementa la secreció d'AVP tant *in vivo* (Yamamoto *et al.*, 1991) com *in vitro* (Rossi, 1993). En canvi, l'ANP i l'AM tenen una acció inhibidora en la secreció d'AVP. L'ANP té una acció de retroalimentació negativa contra l'AVP, tant al SNC com a nivell perifèric. En el SNC, l'alliberació d'AVP estimula l'alliberació d'ANP (Manning *et al.*, 1985), i aquest, al seu torn, inhibeix l'alliberació d'AVP. A nivell perifèric, l'ANP inhibeix l'efecte de l'AVP sobre la permeabilitat de l'aigua (Nonoguchi *et al.*, 1988) i en el transport d'ions (Rocha i Kudo, 1990). L'AM exerceix una acció directa a l'hipotàlem per disminuir la secreció d'AVP (Taylor i Samson, 2002).

► Receptors de vasopressina

Les accions de la vasopressina estan mediades per receptors de la membrana plasmàtica. S'han

clonat tres subtipus de receptors d'AVP: V_{1a} , V_{1b} i V_2 . Pertanyen a la família de receptors units a proteïna G caracteritzats per la presència de set hèlices transmembrana connectades per tres segments extracel·lulars i tres segments intracel·lulars (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

De **receptors V_1** n'hi ha dos subtipus, el V_{1a} i el V_{1b} . Els receptors V_{1a} s'han descrit en diferents teixits, entre els quals, al múscul llis, al fetge i en estructures del sistema límbic (Rabinstein, 2006). Estan implicats en el control de la pressió arterial, donant lloc a vasoconstricció, i són els principals receptors implicats en les accions centrals de l'AVP. Els receptors V_{1b} s'han descrit en la hipòfisi (Sugimoto *et al.*, 1994) i són els responsables de l'estimulació de la secreció d'ACTH per l'adenohipòfisi. La unió de l'AVP a aquests receptors activa la via fosfoinositoide promovent la mobilització de Ca^{2+} citosòlic (Carmichael i Kumar, 1994).

Els **receptors V_2** han estat descrits als ronyons, a les cèl·lules del conducte col·lector (Lolait *et al.*, 1992). Aquests receptors activen l'adenilat ciclase donant lloc a cAMP. Són els responsables de l'acció antiurètica de l'AVP. Aquesta acció s'aconsegueix principalment regulant l'AQP-2. L'AVP regula l'AQP2 mitjançant dues vies: un efecte agut que implica el control intracel·lular del *trafficking* d'AQP-2 entre les vesícules intracel·lulars i la membrana plasmàtica apical (Nielsen *et al.*, 1995) i un efecte crònic transcripcional que s'observa en rates deprivades d'aigua durant 24 hores (Saito *et al.*, 1997). En aquest cas, l'abundància relativa de mRNA i de proteïna estan augmentats.

Així doncs, la correcta regulació del *trafficking* és un factor important on hi intervenen diversos mediadors (Noda i Sasaki, 2006). L'activació dels receptors V_2 per part de l'AVP activa l'adenilat ciclase (AC) via la proteïna G (Gs), el que augmenta el cAMP i indueix la fosforilació de l'AQP-2 mitjançant la PKA. La fosforilació de l'AQP-2 activa la translocació de la proteïna des de les vesícules intracel·lulars fins a la membrana apical. En la fusió de les vesícules d'AQP-2 amb la membrana apical hi intervenen proteïnes de la família SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*). Alternativament, la fosforilació de l'AQP-2 també es

pot activar per l'estímul de dos factors, el factor natriurètic atrial (ANF) i el sodi nitroprusid (SNP), via la guanilat ciclasa (GC). Per altra banda, la prostaglandina E₂ (PGE₂) inhibeix el *trafficking* d'AQP-2 via la proteïna G (Gi) quan s'uneix al seu receptor (EP₃R). L'estimulació d'aquest receptor, a més, activa la proteïna Rho que promou la formació de F-actina en el citoesquelet, que actua de barrera al *trafficking*.

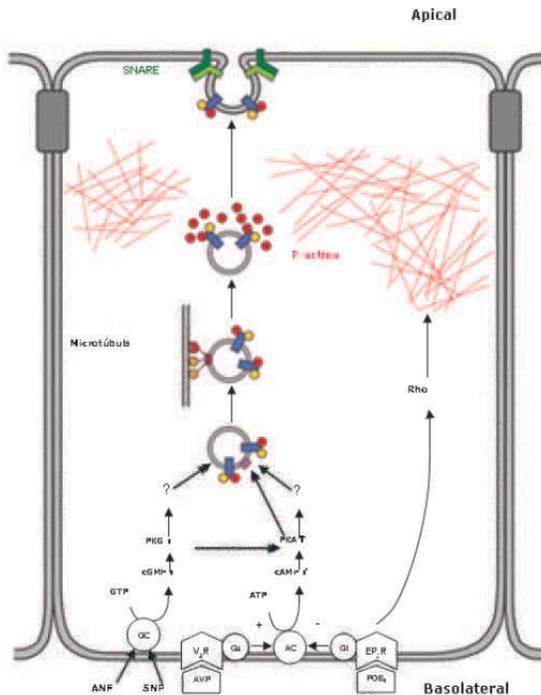


Figura 12-I. Representació del mecanisme de regulació del trafficking d'AQP-2 al túbul col·lector renal (modificat de Noda i Sasaki, 2005).

L'acció de la vasopressina es pot inhibir mitjançant antagonistes selectius per un dels receptors o mitjançant antagonistes no selectius. Dels antagonistes selectius per V₁, un dels més utilitzats és el Manning Peptide, Mca¹-Tyr-(Me)²-AVP, que es pot utilitzar tant en humans com en animals (Lászlo *et al.*, 1991). D'antagonistes del receptors V₂ n'hi ha de dos tipus, els peptídics i els no peptídics. Tot i que hi ha una gran varietat d'antagonistes peptídics molt potents (Manning i Sawyer, 1989), tenen poca biodisponibilitat oral, actuen diferent segons l'espècie i, sobretot, mostren efectes antiürètics (agonistes). A partir de la dècada dels 90 del segle passat, es van sintetitzar antagonistes no peptídics i, per tant, amb moltes més avantatges, un d'ells la possibilitat d'administrar-los oralment. Un dels més estudiat i utilitzat és l'OPC-41061, o Tolvaptan, 7-clor-5-hidroxi-1-[2-metil-4(2-metilbenzoilamina)benzoil]-

2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepina, que és un antagonista V₂ selectiu, molt potent i no peptídic (Yamamura *et al.*, 1998).

► **Accions de la vasopressina**

El seu efecte fisiològic més important és la retenció d'aigua al ronyó, ja que augmenta la permeabilitat dels conductes col·lectors renals provocant l'entrada d'aigua. Aquesta acció ve mediada per l'estimulació de la síntesi de mRNA d'AQP-2 i la regulació de la inserció de la proteïna a la membrana luminal mitjançant exocitosi (Fushimi *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1997). Així, l'orina es concentra i el seu volum disminueix. L'efecte global, doncs, és una major retenció d'aigua que de soluts, donant lloc a una disminució de la pressió osmòtica dels líquids corporals. En el ronyó, l'AVP estimula la reabsorció de Na⁺ en el túbul col·lector (Schafer i Hawk, 1992) augmentant l'expressió del canal ENaC (Machida *et al.*, 2003). La infusió de dDAVP, un anàleg de la vasopressina, i la restricció d'aigua en rates durant 7 dies van demostrar un augment en l'expressió de les subunitats β i γ-ENaC en el ronyó (Ecelbarger *et al.*, 2000).

L'AVP també pot afectar els mecanismes d'homeòstasi electrolítica i hídrica en el còlon. Així, en el còlon distal de rata, s'ha demostrat que l'AVP estimula l'absorció d'aigua, possiblement també regulant l'expressió d'AQP-2 que s'ha trobat expressada tant en la membrana apical dels colonòcits del còlon distal en humans (Mobasheri *et al.*, 2005) i en rates (Gallardo *et al.*, 2001). S'ha descrit que l'AVP potencia algunes de les accions mitjançades per l'aldosterona, com la producció de prostasina (Fukushima *et al.*, 2004) i la producció de 11β-HSD2 (Fukushima *et al.*, 2005).

L'AVP també està implicada en situacions patològiques en el cor. Els estats de fallada cardíaca estan associats a hiponatremia i s'ha vist que els pacients tenen concentracions plasmàtiques altes d'AVP en comparació amb els grups control (Goldsmith i Gheorghiadu, 2005). S'ha suggerit que l'AVP podria estar involucrada en la proliferació glomerular i de la

matriu extracel·lular, ja que en rates es va demostrar que estimula l'hipertròfia cel·lular miocàrdica (Tahara *et al.*, 1998). Actualment, s'estan portant a terme diferents assaigs clínics amb antagonistes dels receptors d'AVP per determinar els seus beneficis en la prevenció de la fallada cardíaca (Sanghi *et al.*, 2005).

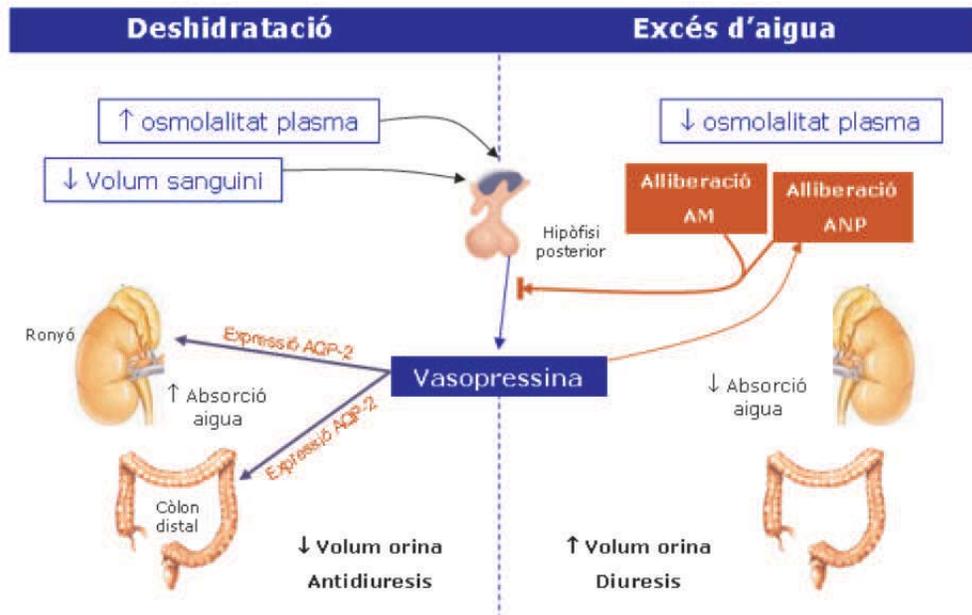


Figura 13-I. Efectes de la deshidratació i l'excés d'aigua sobre l'alliberació de vasopressina i la seva acció en el ronyó i en el còlon distal.

EFFECTE DEL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA EN EL CÒLON

La sal, o clorur de sodi (NaCl), constitueix un nutrient essencial, l'organisme necessita tant el sodi com el clorur i no els pot fabricar per si mateix. El sodi representa un constituent important del compartiment extracel·lular; de fet, les sals de sodi representen el 90-95% de tots els soluts del líquid extracel·lular. Aquest catió és el major determinant de l'osmolalitat del plasma així com del volum extracel·lular, sent l'únic capaç d'exercir una pressió osmòtica significativa. L'osmolalitat del plasma està altament regulada en el rang de 280 a 292 mOsm/kg d'aigua i, malgrat el gran marge d'ingesta de sodi i aigua, la concentració sèrica de Na^+ es manté entre el rang de 135 a 144 mEq/L. Així doncs, la regulació precisa del volum i de l'osmolalitat dels fluids de l'organisme és fonamental per a sobreviure. La regulació de la ingesta, així com de l'excreció urinària, d'aigua i d'electròlits implica un gran nombre de mecanismes homeostàtics a l'organisme.

Com s'ha descrit en els apartats anteriors, el còlon, juntament amb el ronyó, participa en el manteniment de l'homeòstasi hídrica i electrolítica de l'organisme. L'epiteli del còlon és el típic epiteli transportador d'electròlits, capaç de moure soluts i aigua tant des de la llum intestinal als vasos sanguinis com a l'inrevés. El còlon humà absorbeix entre 1,5 i 2 litres diaris de Na^+ , Cl^- i aigua, i secreta K^+ i HCO_3^- . Els canals iònics, transportadors i bombes localitzades a les cèl·lules epitelials polaritzades, tant a la membrana apical com a la basolateral, donen lloc a un transport d'aigua i soluts d'alta eficàcia. Aquests sistemes de transport estan regulats per diferents mecanismes endocrins, neurocrins i paracrins. Entre aquests mecanismes reguladors, destaquen el sistema renina-angiotensina-aldosterona i la vasopressina.

Una dieta amb baix contingut en sodi dona lloc a l'activació del RAAS per, en últim terme, augmentar l'absorció d'aquest ió i evitar-ne la seva excreció. A més, s'ha descrit que una restricció de sodi actua sobre la síntesi d'aldosterona, augmentant l'activitat de l'enzim aldosterona sintasa, que catalitza el pas de corticosterona a aldosterona (Williams, 2005).

Aquest augment de l'activitat enzimàtica afecta tant l'eficiència de l'enzim com l'expressió del seu gen (Menachery *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, 1991). Hi ha diversos estudis que han caracteritzat l'efecte d'una dieta baixa en sodi en la fisiologia i funció del còlon.

L'efecte de la restricció de sodi en la dieta augmentant la reabsorció de sodi al còlon es coneix des de fa temps (Sandle *et al.*, 1984; Turnamian i Binder, 1988). Aquest efecte difereix en les dues zones del còlon, la proximal i la distal, degut a la presència de diferents transportadors de sodi a les dues zones (Dolman i Edmonds, 1975). S'ha demostrat que la inducció de les diferents unitats del canal ENaC és diferent a ambdues zones del còlon. Mitjançant western blot s'ha determinat que la subunitat α -ENaC està present tant al còlon distal com al proximal, però una dieta LS tan sols activa l'expressió de les unitats β i γ -ENaC en el còlon distal; per tant, l'estimulació electrogènica de Na^+ tan sols és considerable al còlon distal (Greig *et al.*, 2002). La inducció d'ENaC al còlon distal s'ha vist que és simultània a la inducció de prostasina, una serin transferasa que es creu que té una important funció en el transport de Na^+ , en aquesta zona del còlon (Fukushima *et al.*, 2004).

Mitjançant l'observació de l'acumulació de FITC dextrà amb microcòpia confocal (Pedley i Naftalin, 1993; Naftalin i Pedley, 1995), es va establir que el còlon distal té la capacitat d'absorbir fluids en contra de grans gradients osmòtics, mentre que el còlon proximal no (Naftalin *et al.*, 1999). Aquests estudis, a més, van demostrar que aquesta capacitat absortiva del còlon distal augmenta amb una dieta amb baix contingut en sodi i disminueix amb una dieta amb alt contingut en sodi, mentre que el còlon proximal no respon a les variacions del sodi de la dieta. L'augment en la capacitat absortiva del còlon distal es va relacionar amb el descobriment que una dieta amb baix contingut de sodi estimula el creixement de la beina de miofibroblasts que envolta les criptes del còlon distal (Naftalin i Pedley, 1999), en el que s'anomena zona pericriptal. Aquest creixement miofibroblàstic es va evidenciar per l'augment en la quantitat de F-actina, α -SMA, β -catenina i E-caderina en la zona pericriptal. Aquesta beina pericriptal forma

una barrera a la difusió que afavoreix la retenció de Na^+ en el LEC (Naftalin i Pedley, 1990), facilitant la seva absorció per difusió i evitant el seu retorn cap al lumen disminuint la permeabilitat de l'epiteli. Aquest fet es pot interpretar com un mecanisme fisiològic adaptatiu de l'organisme a nivell intestinal per incrementar al màxim l'absorció de Na^+ en una situació de manca d'aquest ió. Per altra banda, s'ha vist que el dany a aquesta beina pericriptal, provocat per exemple per radiació ionitzant, incrementa la permeabilitat epitelial i en redueix la capacitat de deshidratar les femtes (Thiagarajah *et al.*, 2000), evidenciant la importància d'aquesta capa en la funció del còlon distal. El resultat de tots aquests estudis han evidenciat que l'absorció al còlon no depèn tan sols de les cèl·lules epitelials sinó que també depèn de la capa de miofibroblasts que envolta les criptes.

Més endavant, els estudis de Thiagarajah i col·laboradors (2002) en rates alimentades amb una dieta baixa en sodi durant deu dies van evidenciar que els efectes tròfics a la zona pericriptal del còlon distal presentaven característiques similars als estats de fibrosi provocats per l'activació del RAAS en teixits com el cor o el ronyó (Weber i Brilla, 1991; Weber *et al.*, 1997; Remuzzi *et al.*, 2005). Els resultats inclouen un augment en la quantitat de col·lagen i α -SMA en aquesta zona, a més d'un augment de l'expressió de receptors AT1 i TGF- β i de la densitat d'ECA. Finalment, a nivell de les unions estretes, es produeix un augment de la quantitat de proteïnes d'adhesió, com pot ser la OB-caderina. Tots aquests efectes es veuen inhibits amb l'administració de captopril. Aquest fet indica que els efectes observats poden estar mitjançats tant per l'angiotensina II com per l'aldosterona, ja que l'inhibició de l'ECA suprimeix la síntesi d'ambdues hormones.