

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

M^a Lluïsa Miró Martí



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals

Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia

Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

Programa de doctorat: Biotecnologia

Directors:

Dr. Miquel Moretó Pedragosa,

Catedràtic de Fisiologia

Dra. Anna Pérez Bosque,

Professora Associada de Fisiologia

Coordinadora del programa de doctorat:

Josefa Badia Palacin

M^a Lluïsa Miró Martí

Barcelona, 2012



Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals

Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia

Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

Programa de doctorat: Biotecnologia

**Memòria presentada per M^a Lluïsa Miró Martí per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona**

Signatura dels Directors:

Signatura de la doctoranda:

Dr. Miquel Moretó Pedragosa

Dra. Anna Pérez Bosque

M^a Lluïsa Miró Martí

**M^a Lluïsa Miró Martí
Barcelona, 2012**

MIQUEL MORETÓ PEDRAGOSA, Catedràtic de Fisiologia, i ANNA PÉREZ BOSQUE, Professora associada de Fisiologia, ambdós del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN:

Que la memòria titulada “Mecanismes d’acció de l’aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon” presentada per M^a LLUÏSA MIRÓ MARTÍ per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la nostra direcció al Departament de Fisiologia i, considerant-la conclosa, autoritzen la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per què així consti, signem la present a Barcelona, el dia 19 de Desembre del 2011.

Dr. Miquel Moretó Pedragosa

Dra. Anna Pérez Bosque

Aquesta tesi ha estat subvencionada pel projecte "*Mecanismos de acción de la aldosterona y la vasopresina en la regulación de las funciones del colon*" del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2006-08410). Durant la realització, l'autora ha gaudit d'una beca del "*Programa predoctoral de Formación de Personal Investigador*" (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2007-16221, període 2007-2011) i una beca de Col·laboració en projectes d'investigació de la Universitat de Barcelona associada a projectes de recerca. El grup de Fisiologia i Nutrició Experimental també rep finançament del Programa de projectes per potenciar grups de recerca consolidats, Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, Generalitat de Catalunya (Referència 2009SGR471). El Grup de Fisiologia i Nutrició Experimental pertany a la Red Española de Investigación sobre Proteínas Transportadoras de Membrana y sus implicaciones Fisiológicas, Patológicas y Farmacológicas (REIT) (BFU2005-24983-E/BFI i BFU2007-30688-E/BFI), el qual ha subvencionat a l'autora l'assistència a cursos especialitzats en transportadors. L'assistència a congressos ha estat subvencionada amb borses de viatge concedides per la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Aquesta tesi s'ha realitzat en el Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia.

*Als meus pares,
a la meva germana i
als meus avis.*

En primer lloc, voldria agrair tot l'esforç dels meus directors, el Dr. Miquel Moretó i la Dra. Anna Pérez, que, sense la vostra ajuda, aquesta tesi doctoral no hagués estat possible. Tots dos em van permetre conèixer aquest món tan fascinant quan encara no havia acabat la carrera de Farmàcia. Gràcies per haver contribuït en la meua formació com a científica al llarg de tots aquests anys i per transmetre'm, en tot moment, la il·lusió del saber cada dia més, en no desistir mai i seguir sempre endavant! M'agradaria agrair al Dr. Miquel Moretó la confiança dipositada en mi, així com el fet d'oferir-me l'oportunitat de treballar en el seu grup d'investigació. A la Dra. Anna Pérez, per haver-me ensenyat com s'ha de treballar en un laboratori i sempre aportar tècniques noves per agilitzar les tasques. Gràcies per no haver exhaurit tota la paciència, per guiar-me en els moments d'ofuscament, per compartir les rialles i esbarjos a l'hora de dinar.

A la Dra. Joana M. Planas, per sempre dur aquest somriure i oferir-me el seu suport incondicional; els seus consells i les seves paraules m'han acompanyat des del primer a l'últim dia. Moltes gràcies.

A la Dra. Conxita Amat per sempre estar disposada a oferir la seva ajuda en tot moment i haver compartit conjuntament estones al laboratori.

A la Dra. Emília Juan, per estar oberta a tot i per ajudar-me a enfocar les pràctiques de forma dinàmica als alumnes. Per les estones que hem compartit en els petits viatges que hem fet. Moltes gràcies per tots els teus ànims en l'etapa final de la tesi.

Thank you very much Richard Naftalin for your contribution in my thesis, specially, for your help to understand the results... It has been a pleasure work with you.

No em puc oblidar de les meves companyes de laboratori i grans amigues al llarg d'aquests anys: Irene Alfaras i Mònica Maijó. Moltes gràcies per ajudar-me a l'estabulari amb els animalets d'experimentació que tant m'estimen, sense vosaltres no ho hagués pogut fer. Per trobar hores d'esbarjo per anar al cine, per compartir activitats de country i balls de saló. Mònica, per aportar sempre alegria dins del grup, pel teu dialecte que tant ens costa d'entendre. I tu Irenita, per compartir les vivències dels teus nebots que són l'alegria de la casa. Gràcies a les dues per totes les hores que hem disfrutat juntes!

La Glòria Lozano i la Marta Sanchez, esteu al principi i encara us queda un llarg camí per fer. No us desanimeu quan les coses no surtin, amb paciència i temps tot s'aconsegueix. Ànims i tireu endavant.

Dra. Duarte, gracias por compartir tu simpatía y alegría y por acordarte de mi desde Brasil. Patricia Martínez-Moya, gracias por tu tranquilidad, tan necesaria en el desarrollo de cualquier tesis.

To Daniel for your kindness and all the hours we shared in the culture room.

A tos els membres del departament que m'heu acollit i heu participat en la meva formació. Gràcies per la vostra ajuda.

Manel Bosch, dels Serveis de Microscopia confocal, gràcies per haver-me aconsellat a adquirir les imatges tal com toquen i per tota l'ajuda donada sempre que m'ha fet falta.

A la Tere Rodrigo i a tot l'equip de l'estabulari de Farmàcia per estar sempre a punt per facilitar el maneig dels animals.

Als alumnes que han passat pel laboratori i han contribuït en part dels experiments: Aleida Domingo, Marta Cuenca, Mireia Colomer, Cristina Branyes, Ismael Izquierdo, Tomeu Fernández i Marina Kurylenko. Gràcies per tota la vostra dedicació i ajuda. Anna Mensa, no puc oblidar-me de tu, per haver col·laborat en la darrera fase experimental, et desitjo un bon futur com a Resident!

Ariadna Hernandez, estic ben orgullosa de ser amiga teva, de compartir juntes moments alegres, d'estrés i les pròpies vivències. Tot i que últimament estem més distanciades, sempre tenim el xat per explicar-nos les nostres preocupacions. Gràcies per tot el suport que ens hem donat mútuament i, per ser molts cops la meva correctora.

Núria Berga, gràcies per escoltar-me, trobar moments d'entreteniment i fer que algunes tardes passin de forma més lleugera. Moltíssimes gràcies per tots els teus ànims en l'etapa final.

No em puc oblidar de totes les que formeu l'equip de Farmacèutiques: Imma Gumà, Cristina de Almagro, Marta Torres i les vostres respectives parelles. Gràcies per haver-m'he donat suport i per passar juntes moments inoblidables.

Violeta Esteban, Maria Roca i Amparo Balaguer, juntes vam començar la carrera i cada una ha seguit un camí ben diferent ja sigui pel treball en l'hospital, en la indústria o com a farmacèutica comunitària. Gràcies a les tres per la vostra amistat!

Com no, el grup de Farmacèutiques de la Residència: Laia Pose, Maria Dalmau, Roser Bosch, Sònia Arenas, Alba Rebollo i Mercè Oriol! Tot i que poc a poc ens hem anat

dispersant mai no hem perdut el contacte. Hem anat trobant temps per fer dinars i trobades amb molts moments de diversió i rialles. I, alhora, hem anat fent créixer el grup amb les vostres parelles. Futurs doctors: Edgar i Alba, d'aquí pocs mesos ja ho tindreu a dins del sac i ben lligat. Gràcies pel vostre suport!

A tots els que esteu lluny i realitzant el doctorat, un cop esteu en aquesta fase les coses es veuen diferents: Gemma Comellas, ànims en la recta final. Andrea Cardona, com ja has demostrat en algunes divulgacions en mitjans de comunicació, ja veuràs com acabaràs sent una gran científica.

Als amics d'escola que, tot i que els darrers mesos hem estat més distanciats, sempre us he tingut a prop per animar-me. Moltíssimes gràcies Eugènia Crivillé i Carles Giralt.

I, finalment, a qui no em puc oblidar d'esmentar i dedicar les últimes paraules és a la meva família: als meus pares, per permetre que realitzés la tesi doctoral i per tot el que m'han donat, per tenir-los sempre al meu costat i per tota la seva confiança. Als meus avis, malgrat que no és el que més us agradi enteneu que la investigació científica és necessària. Tiets i tietes, per preguntar sempre com van les tasques que he anat fent al laboratori. I, com no, agrair el suport que sempre m'ha donat la meva germana, Sílvia, i les meves cosines: Pili, Eva i Paula i en Guillermo Roca. Tampoc no em puc deixar els més petits de la casa: Maiol i Pau, més endavant entendreu millor tot el que he fet.

ÍNDEX



ÍNDIX

Índex de figures.....	VI
Índex de taules	XI
Abreviatures.....	XIII
Resum de la tesi	XIX
I.INTRODUCCIÓ	1
1. APARELL DIGESTIU	3
1.1 EPITELI INTESTINAL	3
1.2 MIOFIBROBLASTS INTESTINALS	6
1.3 ABSORCIÓ D'AIGUA I IONS	8
1.4 FUNCIO DE BARRERA.....	8
2. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA	12
3. ALDOSTERONA	14
3.1 RECEPTORS DE L'ALDOSTERONA	15
3.2 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A RONYÓ	16
3.3 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A COR	19
3.4 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A CÒLON.....	21
3.5 RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGFR)	23
4. VASOPRESSINA	25
4.1 RECEPTORS DE LA VASOPRESSINA.....	25
4.2 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A RONYÓ	27
3.3 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A COR.....	27
3.4 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A CÒLON	28
4.5 RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT DERIVAT DE PLAQUETES (PDGFR)	28

II.OBJECTIUS I PLANTEJAMENTS	31
III.MATERIALS I MÈTODES	35
1. MANTENIMENT DE LES LÍNIES CEL·LULARS	37
1.1 CULTIUS CEL·LULARS	37
1.2 CONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS	37
1.3 DESCONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS.....	38
1.4 TRIPSINITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS	38
1.5 RECOMPTE I SEMBRA CEL·LULAR	39
1.6 DISSENY EXPERIMENTAL.....	41
1.6.1 ACCIÓ DIRECTE DE LES HORMONES	41
1.6.2 ACCIÓ MEDI CONDICIONAT (CM).....	44
1.6.2.1 MODEL D'HIPERALDOSTERONISME.....	45
1.6.2.2 MODEL DE DESHIDRATACIÓ	46
2. EXPERIMENTS <i>IN VIVO</i>	48
2.1 ANIMALS	48
2.2 DIETES	48
2.3 DISSENY EXPERIMENTAL.....	49
2.3.1 MODEL D'HIPERALDOSTERONISME SECUNDARI	49
2.3.2 MODEL DE DESHIDRATACIÓ	50
2.4 OBTENCIÓ DE LES MOSTRES	50
3. TÈCNiques EMPRADES	52
3.1 ELECTROFISIOLOGIA	52
3.2 DETERMINACIÓ DE L'EGF AL MEDI DE CULTIU	53
3.3 HOMOGENEÏTZACIÓ DE LES MOSTRES.....	54
3.3.1. HOMOGENEÏTZACIÓ MOSTRES CEL·LULARS	54

3.3.2. HOMOGENEÏTZACIÓ DE LA MUCOSA DE CÒLON	55
3.4 DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES	56
3.5 IMMUNOLOCALITZACIÓ	57
3.5.1 MARCATGE DE PROTEÏNES ESPECÍFIQUES	57
3.5.2 MARCATGE DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	58
3.5.3 VISUALITZACIÓ DE LES IMATGES	59
3.5.4 QUANTIFICACIÓ DE LES IMATGES	59
3.6 WESTERN BLOT	61
3.6.1 PREPARACIÓ DE LES MOSTRES	61
3.6.2 ELECTROFORESI	62
3.6.3 TRASFERÈNCIA	63
3.6.4 BLOCATGE I IMMUNODETECCIÓ	64
3.6.5 CAPTACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LES IMATGES	65
3.7 EXPRESSIÓ GÈNICA	65
3.7.1 OBTENCIÓ DE L'RNA	65
3.7.2 RETROTRASNCRIPCIÓ	66
3.7.3. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA O PCR	67
3.7.3.1 PCR SEMIQUANTITATIVA	68
3.7.3.2 PCR A TEMPS REAL	69
3.8 ANÀLISI ESTADÍSTIC	69
IV. RESULTATS	71
SECCIÓ 1. CARACTERITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS T84 I CCD-18Co	75
1. CARACTERITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS	77
1.1 CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES T84	77
1.2 CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES CCD-18Co	79

SECCIÓ 2. EFECTES DE L'ALDOSTERONA SOBRE LES CÈL·LULES T84 I CCD-18Co.....	83
2. EFECTES DE L'ALDOSTERONA.....	85
2.1 ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES T84.....	85
2.2 ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES CCD-18Co	88
2.2.1 PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	88
2.2.2 EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES D'ADHESIÓ.....	89
2.2.3 EXPRESSIÓ GÈNICA DE L'EGF, EL VEGFa I EL TGFβ1	89
2.2.4 DETERMINACIÓ DE L'EGF AL MEDI DE CULTIU	91
2.2.5 ADDICIÓ DE L'EGF DE FORMA EXÒGENA	91
2.2.6 VIES D'ACCIÓ DE L'ALDOSTERONA.....	92
2.3 EFECTES DEL MEDI CONDICIONAT SOBRE LES CÈL·LULES T84.....	93
2.3.1 PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES T84 TRACTADES AMB EL MEDI CONDICIONAT	93
2.3.2 EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES DEL COMPLEX D'UNIÓ.....	95
2.4 ACCIÓ <i>IN VIVO</i> DE L'ALDOSTERONA	96
2.4.1 EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL	96
2.4.2 EXPRESSIÓ DE L'EGF EN MUCOSA DE CÒLON.....	97
2.4.3 EXPRESSIÓ DE L'EGFR EN MUCOSA DE CÒLON	98
SECCIÓ 3. EFECTES DE LA VASOPRESSINA SOBRE LES CÈL·LULES T84 I CCD-18Co	101
3. EFECTES DE LA VASOPRESSINA	103
3.1 ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES T84.....	103
3.2 ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES CCD-18Co	105
3.2.1 PROLIFERACIÓ CEL·LULAR	105
3.2.2 EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES D'ADHESIÓ.....	106
3.2.3 EXPRESSIÓ GÈNICA DEL PDGFA, EL PDGFB I L'EGF.....	106

3.2.4 ADDICIÓ DEL PDGFA DE FORMA EXÒGENA.....	107
2.2.5 VIES D'ACCIÓ DE LA VASOPRESSINA	108
3.3 EFECTES DEL MEDI CONDICIONAT SOBRE LES CÈL·LULES T84.....	109
3.3.1 PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES T84 TRACTADES AMB EL MEDI CONDICIONAT	109
3.3.2 EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES DEL COMPLEX D'UNIÓ.....	111
3.4 ACCIÓ <i>IN VIVO</i> DE LA VASOPRESSINA	112
3.4.1 EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL	112
3.4.2 EXPRESSIÓ GÈNICA DEL PDGFA EN MUCOSA DE CÒLON	113
V. DISCUSSIÓ.....	115
VI. CONCLUSIONS	129
VII. BIBLIOGRAFIA.....	133
VIII. ANNEX.....	163

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1. Esquema de l'epiteli del còlon, les criptes de LieberKühn i les cèl·lules que podem trobar al llarg de la cripta..	5
Figura 1.2. Representació de la ubicació dels miofibroblasts en les criptes de Lieberkühn.....	6
Figura 1.3. Dibuix representatiu dels marcatges dels miofibroblasts	7
Figura 1.4. Unió intercel·lular epitelial. Representació esquemàtica dels colonòcits.....	9
Figura 1.5. Representació de les proteïnes que constitueixen les unions estretes entre dues membranes lipídiques.	10
Figura 1.6. Representació esquemàtica de l'activació del RAAS.....	13
Figura 1.7. Representació gràfica de com una cèl·lula epitelial respon a l'aldosterona.....	17
Figura 1.8. Mecanismes de l'aldosterona al ronyó.	19
Figura 1.9. Adaptacions del còlon a una dieta baixa en NaCl	22
Figura 1.10. Vies implicades en l'acció de l'EGF.	24
Figura 3.1. Esquema representatiu dels diferents recipients emprats en cultius cel·lulars.	40
Figura 3.2. Esquema representatiu del disseny experimental utilitzat pels miofibroblasts (A) i pels colonòcits (B).....	42
Figura 3.3. Esquema representatiu del disseny experimental sobre els miofibroblasts i obtenció del medi condicionat i aplicació sobre els colonòcits.....	45
Figura 3.4. Disseny experimental de l'obtenció del medi condicionat dels miofibroblasts i aplicació sobre els colonòcits.....	47

Figura 3.5. Disseny experimental del model d'hiperaldosteronisme secundari.	49
Figura 3.6. Disseny experimental del model de deshidratació.	51
Figura 3.7. Imatge gràfica d'una cambra <i>Ussing</i>	52
Figura 3.8. Histograma de distribució d'una població de microsfères en el canal FL2 d'una mostra representativa.	54
Figura 3.9. Imatges representatives de la proliferació dels miofibroblasts (CCD-18Co) després d'afegir el tractament hormonal durant 24 h	60
Figura 3.10. Imatges representatives de la proliferació de les cèl·lules T84 després de 24 h de tractament hormonal.	61
Figura 4.1. Imatges representatives de la immunolocalització de claudina IV i ZO-1 en les cèl·lules T84..	77
Figura 4.2. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84.	78
Figura 4.3. Expressió del receptor mineralocorticoide i diferents marcadors específics de les cèl·lules T84..	78
Figura 4.4. Registre representatiu del corrent de curt circuit de cèl·lules T84.....	79
Figura 4.5. Imatges representatives de la immunolocalització de la vimentina, l'actina i l'actina de múscul llis a les cèl·lules CCD-18Co.....	80
Figura 4.6. Expressió de la cadherina 11, la vimentina i l'actina del múscul llis a cèl·lules CCD-18Co.	80
Figura 4.7. Expressió de diferents marcadors específics de les cèl·lules CCD-18Co.	81
Figura 4.8. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de proteïnes del complex d'unió de cèl·lules T84.	85

Figura 4.9. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de l'MR de les cèl·lules T84.....	86
Figura 4.10. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84.	86
Figura 4.11. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF i el TGF β 1 de les cèl·lules T84.	87
Figura 4.12. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió dels receptors de l'EGF i del TGF β 1 de les cèl·lules T84..	87
Figura 4.13. Efecte de l'aldosterona sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co.....	88
Figura 4.14. Quantificació de l'efecte de l'aldosterona sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co..	89
Figura 4.15. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de la cadherina 11 de les cèl·lules CCD-18Co.	89
Figura 4.16. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF, el VEGFa i el TGF β 1 de les cèl·lules CCD-18Co.	90
Figura 4.17. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'MR, l'EGFR i el TGF β R1 de les cèl·lules CCD-18Co.	90
Figura 4.18. Efecte de l'aldosterona sobre la concentració d'EGF al medi de cultiu de les cèl·lules CCD-18Co..	91
Figura 4.19. Efecte de l'EGF sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co.	91
Figura 4.20. Proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després de 24 h del tractament amb aldosterona i els inhibidors de les vies Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT.	92
Figura 4.21. Efectes del medi CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona i l'espironolactona sobre la proliferació de les cèl·lules T84..	93

Figura 4.22. Correlació entre la proliferació de les cèl·lules T84 i la concentració de l'EGF.....	94
Figura 4.23. Efecte de l'anticòs α -EGF i l'inhibidor de l'EGFR al CM sobre la proliferació de les cèl·lules T84.	94
Figura 4.24. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 24 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona	95
Figura 4.25. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 48 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona.	96
Figura 4.26. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF en la mucosa de còlon en el model d'hiperaldosteronisme secundari.....	97
Figura 4.27. Expressió de l'EGFR a la mucosa de còlon en un model d'hiperaldosteronisme secundari.	98
Figura 4.28. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de la fosforilació de l'EGFR A la mucosa de còlon en un model d'hiperaldosteronisme secundari	99
Figura 4.29. Efecte de diferents concentracions de vasopressina sobre l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84..	103
Figura 4.30. Efecte de diferents concentracions de vasopressina sobre l'expressió de proteïnes del complex d'unió de cèl·lules T84.	104
Figura 4.31. Efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules T84.....	104
Figura 4.32. Efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co.	105
Figura 4.33. Quantificació de l'efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co.	106
Figura 4.34. Efecte de la vasopressina sobre l'expressió de la cadherina 11 de les cèl·lules CCD-18Co.	106

Figura 4.35. Efecte de la vasopressina sobre l'expressió del PDGFA, el PDGFB i l'EGF de les cèl·lules CCD-18Co.	107
Figura 4.36. Efecte del PDGFA sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co.	108
Figura 4.37. Proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després de 24 h del tractament amb vasopressina i els inhibidors de les vies Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT.	108
Figura 4.38. Efectes del medi CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina i els inhibidors dels seus receptors sobre la proliferació de les cèl·lules T84.	109
Figura 4.39. Correlació entre la proliferació de les cèl·lules T84 i la concentració del PDGFA	110
Figura 4.40. Efecte de l'anticòs α -PDGFA i l'inhibidor del PDGFR al CM sobre la proliferació de les cèl·lules T84.....	110
Figura 4.41. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 24 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina.	111
Figura 4.42. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 48 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina.	112
Figura 4.43. Expressió del PDGFA a la mucosa de còlon de rates sotmeses a una deshidratació.....	113

ÍNDIX DE TAULES

Taula 3.1. Solució de Krebs	53
Taula 3.2. Tampó de lisi per cultius cel·lulars	55
Taula 3.3. Composició del tampó de lisi	56
Taula 3.4. Anticossos utilitzats en la immunolocalització	58
Taula 3.5. Composició del tampó 5X Laemmli	62
Taula 3.6. Composició del tampó d'electroforesi	63
Taula 3.7. Composició del tampó de transferència	64
Taula 3.8. Seqüències dels <i>primers</i> de rata utilitzats	67
Taula 3.9. Seqüències dels <i>primers</i> humans utilitzats	68
Taula 4.1. Evolució del pes corporal dels animals d'un model d'hiperaldosteronisme secundari	97
Taula 4.2. Evolució del pes corporal dels animals d'un model de deshidratació	113

ABREVIATURES

11 β -HSD	11 β -hidroxiesteroid deshidrogenasa
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> ; Enzim convertidor d'angiotensina
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> ; Hormona adrenocorticotròpica o corticotropina
AG1296	Inhibidor del PDGFR
AG1478	Inhibidor del EGFR
ALDO	Aldosterona
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i> ; Adenosina monofosfat cíclic
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i> ; Pèptid natriurètic atrial
AO	<i>Acridine Orange</i> ; Taronja d'acridina
APS	<i>Ammonium Persulfate</i> ; Persulfat amònic
AQP	Aquaporina
AVP	Vasopressina
AVPR1	Receptor tipus I de la Vasopressina
BrdU	<i>Bromodeoxyuridine</i> ; Bromodeoxiuridina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> ; Albúmina sèrica bovina
CAP	Captopril
CHIF	<i>Corticosteroid hormone induced factor</i> ; Factor inductor de l'hormona corticosteroide
CM	<i>Conditioned Medium</i> ; Medi condicionat
CTL	Control
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Àcid desoxiribonucleic

EBr	<i>Ethidium Bromide</i> ; Bromur d'etidi
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> ; Matriu extracel·lular
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> ; Àcid etilendiaminotetraacètic
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; Factor de creixement epidèrmic
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ; Receptor del factor de creixement epidèrmic
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> ; Àcid etilenglicoltetraacètic
ENaC	<i>Epithelial Na⁺ Channel</i> ; Canal epitelial de Na ⁺
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> ; Sèrum fetal boví
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ; Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
HS	<i>High sodium</i> ; Alt contingut en NaCl
ICC	<i>Interstitial Cells of Cajal</i> ; Cèl·lules intersticials de Cajal
IG	Immunoglobulina
ISEMF	<i>Intestinal Subepithelial Myofibroblast Cells</i> ; Miofibroblasts subepitelials intestinals
LEC	Líquid extracel·lular
LS	<i>Low Sodium</i> ; Baix contingut en NaCl
LY294002	Inhibidor del PI3K
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i> ; Receptor mineralocorticoide
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Tampó fosfat salí
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ; Reacció en cadena de la polimerasa
PD98059	Inhibidor de les MAPKK

PDGF	<i>Platelet Derivated Growth Factor</i> ; Factor de creixement derivat de plaquetes
PDGFR	<i>Platelet Derivated Growth Factor Receptor</i> ; Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes
PI3K	<i>Phosphoinositide Kinase-3</i> ; Fosfoinositol 3 quinasa
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> ; Fluorur de polivinil
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System</i> ; Sistema renina-angioteninsina-aldosterona
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Àcid ribonucleic
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espècies reactives d'oxigen
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Dodecil sulfat de sodi
Sgk1	<i>Serum- and glucocorticoid-regulated kinasa</i> ; Quinasa regulada per sèrum i glucocorticoides
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i> ; Actina associada a múscul llis
SPI	<i>Spirolactone</i> ; Espironolactona
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> ; N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina
TGFB	<i>Transforming Growth Factor-β</i> ; Factor de creixement transformant-β

RESUM DE LA TESI

Les hormones del sistema renina-angiotensina-aldosterona i la vasopressina són essencials pel manteniment de l'homeòstasi del Na^+ i del volum del líquid extracel·lular. En el còlon distal de rata, l'aldosterona regula l'expressió del canal apical de Na^+ (ENaC) i l'activitat de l'ATPasa depenent de Na^+ i K^+ , i també té efectes tròfics, estimulant la proliferació dels miofibroblasts de la beina pericriptal. Els objectius principals d'aquest treball són aprofundir en els mecanismes implicats en la funció del còlon en reabsorbir Na^+ i aigua, conèixer el paper de l'aldosterona i de la vasopressina i establir la funció reguladora d'aquestes hormones a nivell dels colonòcits i dels miofibroblasts. Els estudis s'han fet en un model *in vitro* emprant colonòcits humans de la línia T84 i miofibroblasts de la línia CCD-18Co. L'aldosterona estimula la proliferació cel·lular dels miofibroblasts, augmenta l'expressió de l'mRNA de l'EGF i la seva concentració al medi de cultiu al cap de 24 h. L'addició exògena de l'EGF estimula els miofibroblasts de forma similar al tractament amb l'hormona. A més, quan els CCD-18Co són pre-incubats amb l'anticòs anti-EGF o amb l'inhibidor del receptor de l'EGF i, posteriorment, tractats amb l'aldosterona s'inhibeix la proliferació cel·lular, fet que indica que els efectes de l'aldosterona sobre la proliferació són mediatos per l'EGF mitjançant les vies reguladores PI3K/AKT i Ras/Raf/MAPK. La incubació dels colonòcits amb medi provinent dels CCD-18Co tractats amb aldosterona (medi condicionat), incrementa la proliferació cel·lular i l'expressió de proteïnes de les unions estretes. Aquests efectes no s'han observat amb l'addició directe de l'aldosterona als colonòcits. Experiments realitzats *in vivo* suggereixen que l'EGF també hi té un paper mediador donat que s'observa un increment en la fosforilació del receptor d'EGF en els animals que presenten hiperaldosteronisme secundari. Pel que fa a la vasopressina, el tractament dels miofibroblasts amb aquesta hormona estimula la proliferació cel·lular i l'expressió de l'mRNA del PDGFA al cap de 24 h. El PDGFA afegit de forma exògena estimula les cèl·lules CCD-18Co de forma similar a l'observada amb la vasopressina. A més, quan les cèl·lules es pre-incuben amb l'anticòs anti-PDGFA o amb l'inhibidor del receptor del PDGFA i són tractats amb vasopressina, s'inhibeixen els efectes hormonals. La proliferació cel·lular dels CCD-18Co tractats amb vasopressina té lloc a través de l'activació de les vies PI3K/AKT i Ras/Raf/MAPK. Els colonòcits incubats amb el medi condicionat provinent dels CCD-18Co tractats amb vasopressina, incrementen la proliferació cel·lular i l'expressió de proteïnes del complex d'unió. Mentre que l'addició directa de la vasopressina sobre els colonòcits no ha modificat cap variable. L'addició del PDGFA modifica la proliferació dels colonòcits. Aquest estudi indica que l'aldosterona i la vasopressina cooperen en la regulació de l'estructura i funció de les criptes del còlon en resposta a canvis en la ingestió de Na^+ i d'aigua, com part del mecanisme de regulació general de l'osmolalitat del líquid extracel·lular.

Las hormonas del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la vasopresina son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del Na^+ y del volumen del líquido extracelular. En el colon distal de la rata, la aldosterona regula la expresión del canal apical de Na^+ (ENaC) y la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , y también tiene efectos tróficos, estimulando la proliferación de los miofibroblastos de la vaina pericriptal. Los objetivos principales de este trabajo son profundizar en los mecanismos implicados en la función del colon de reabsorber Na^+ y agua, conocer el papel de la aldosterona y la vasopresina y establecer la función reguladora de estas hormonas a nivel de los colonocitos y los miofibroblastos. Se realizaron experimentos *in vitro*, utilizando colonocitos humanos de la línea T84 y miofibroblastos de la línea CCD-18Co. La aldosterona estimula la proliferación celular de los miofibroblastos, aumenta la expresión del RNAm del EGF y su concentración en el medio de cultivo a las 24 h. La adición exógena del EGF estimula los miofibroblastos de forma similar al tratamiento con la aldosterona. Además, cuando los CCD-18Co son pre-incubados con el anticuerpo anti-EGF o con el inhibidor del receptor del EGF y posteriormente tratados con la aldosterona, la proliferación celular queda inhibida, hecho que indica que los efectos de la aldosterona sobre los miofibroblastos son mediados por el EGF a través de las vías reguladoras PI3K/AKT y Ras/Raf/MAPK. La incubación de los colonocitos con medio procedente de los CCD-18Co tratados con aldosterona (medio condicionado) incrementa la proliferación celular y la expresión de las proteínas de las uniones estrechas. Estos efectos no se han observado con la adición directa de la aldosterona sobre los colonocitos. Los experimentos realizados *in vivo* sugieren que el EGF también tiene un papel mediador ya que se observa un incremento de la fosforilación del receptor del EGF en los animales que presentan hiperaldosteronismo secundario. Por otro lado, el tratamiento con la vasopresina sobre de los CCD-18Co estimula la proliferación celular y la expresión del RNAm del PDGFA a las 24 h. El PDGFA añadido exógenamente estimula las células CCD-18Co de forma similar a la observada con la vasopresina. Además, cuando las células se pre-incuban con el anticuerpo anti-PDGF o con el inhibidor del receptor del PDGFA y son tratados con vasopresina se inhiben los efectos hormonales. La proliferación celular de los CCD-18Co tratados con la vasopresina tiene lugar a través de la activación de las vías PI3K/AKT y Ras/Raf/MAPK. Si los colonocitos se incuban con el medio condicionado procedente de los CCD-18Co tratados con vasopresina, la proliferación y la expresión de las proteínas del complejo de unión incrementan, mientras que la incubación directa con la hormona no modifica estas variables. La adición del PDGFA modifica la proliferación celular. Este estudio indica que la aldosterona y la vasopresina cooperan en la regulación de la estructura y las funciones de las criptas del colon en respuesta a cambios en la ingestión de Na^+ y agua, como parte del mecanismo de regulación general de la osmolalidad del líquido extracelular.

The hormones of the renin-angiotensin-aldosterone system and vasopressin are essential for maintaining Na^+ homeostasis and extracellular fluid volume. In the rat distal colon, aldosterone regulates the expression of apical Na^+ channel (ENaC), and the activity of the ATPase-dependent Na^+ and K^+ , and also has trophic effects by stimulating the proliferation of myofibroblasts of the pericryptal sheath. The main objectives of this study are to deepen the understanding of the mechanisms involved in the function of the colon to reabsorb Na^+ and water, as well as the role of aldosterone and vasopressin and establish the regulatory effects of these hormones at the colonocytes and myofibroblasts. Experiments were conducted *in vitro*, using human colonocytes T84 and myofibroblasts CCD-18Co cell lines. The results indicate that aldosterone stimulates the proliferation of CCD-18Co, increases the expression of EGF mRNA and EGF concentration in the culture medium at 24 h. The exogenous addition of EGF stimulates the myofibroblasts in a similar way to the hormone. Moreover, when the CCD-18Co cells were preincubated with anti-EGF or the EGF receptor inhibitor and subsequently treated with aldosterone, cell proliferation is inhibited, showing that the effects of aldosterone on the myofibroblasts are mediated by the EGF through regulatory PI3K/AKT and Ras/Raf/MAPK pathways. The colonocytes incubation with media previously treated with CCD-18Co cells and aldosterone (*conditioned medium*) increases cellular proliferation and expression of tight junction proteins. These effects were not observed by the direct addition of aldosterone. The results of *in vivo* experiments suggest that EGF also plays a role as mediator because the rats with secondary hyperaldosteronism have an increase in the phosphorylation of EGF receptor. On the other hand, the treatment of myofibroblasts with vasopressin for 24 h augmented the cellular proliferation and PDGFA expression. When PDGFA is added exogenously, it stimulates the CCD-18Co cells similarly to vasopressin. In addition, when myofibroblasts were treated with vasopressin and pre-incubated with the anti-PDGF antibody or anti-PDGF receptor inhibitor, hormonal effects were inhibited. These results indicate that cellular proliferation of CCD-18Co treated with vasopressin occurs through the activation of the PI3K/AKT and Ras/Raf/MAPK pathways. When colonocytes were treated with conditioned medium in the presence of vasopressin increased cellular proliferation and protein expression of tight junction proteins was detected while the direct incubation with the hormone does not modify these variables. The addition of PDGFA modifies cell proliferation. This study suggests that aldosterone and vasopressin cooperate in regulating the structure and functions of the crypts of the colon in response to changes in intake of Na^+ and water as part of the mechanism of regulation general osmolality of extracellular fluid.

I. INTRODUCCIÓ

1. APARELL DIGESTIU

L'intestí és la part del tracte gastrointestinal compresa entre el final de l'estómac i l'anús. Les principals funcions de l'aparell digestiu són la digestió dels aliments i l'absorció de nutrients cap al torrent sanguini. A l'intestí prim hi podem distingir tres parts: el duodè, el jejú i l'ili. Dues de les accions bàsiques de l'intestí prim són la secreció i l'absorció. La secreció intestinal té diferents finalitats: facilitar el trànsit intestinal, finalitzar la digestió, defensar l'organisme de l'exterior i participar en l'homeòstasi. L'intestí prim és on s'absorbeixen els nutrients resultants de la digestió d'hidrats de carboni, proteïnes i lípids. L'intestí gros es pot dividir en quatre segments: còlon ascendent, còlon transvers, còlon descendent i còlon sigmoide. Les funcions del còlon són absorbir l'aigua i ions, produir vitamines, formar les femtes i expulsar-les de l'organisme. Els processos de putrefacció i fermentació que tenen lloc en l'intestí gros, no són deguts a la secreció d'enzims digestius sinó a l'activitat de la flora intestinal.

1.1 EPITELI INTESTINAL

L'estructura de la paret del tracte gastrointestinal varia molt d'una regió a l'altra, tot i que existeixen característiques comunes en la seva organització general. Histològicament, les capes que formen l'intestí des de la llum intestinal a la capa més externa són: la **mucosa**, formada per una monocapa d'epiteli, *lamina propria* i *muscularis mucosae*; la **submucosa**, la més innervada, formada per teixit connectiu dens; la **muscular**, formada per una capa interna de múscul circular i una d'externa prima longitudinal que regula la peristalsi; i la **serosa**, formada per teixit connectiu i teixit epitelial en la que hi arriben els vasos sanguinis procedents de l'aorta.

La gran superfície epitelial és necessària pel procés d'absorció i la mucosa es disposa formant plecs anomenats vellositats. La mucosa del còlon forma unes depressions anomenades criptes de Lieberkühn i, a diferència de la mucosa de l'intestí prim, no presenta vellositats (Rubin, 1999). L'epiteli intestinal té una taxa mitòtica i una taxa metabòlica elevades. En el fons de les criptes hi ha les cèl·lules indiferenciades, que són cèl·lules pluripotents amb capacitat de divisió. Aquestes cèl·lules van des del fons de les criptes fins a la superfície. Durant aquesta migració evolucionen i sintetitzen enzims i sistemes específics per a l'absorció, que els

converteix en colonòcits absorbents. Aquestes cèl·lules són substituïdes per unes de noves cada 3-6 dies (Potten i Loeffler, 1990).

Les cèl·lules amb funció absorbent a l'intestí prim són els **enteròcits** i en el l'intestí gros es coneixen com a **colonòcits**. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per estar polaritzades distingint una membrana apical que està en contacte amb la llum intestinal i una membrana basolateral orientada cap a l'espai intersticial. De manera que, a cada membrana s'hi poden trobar proteïnes transportadores, diferents canals, a més de les unions estretes que permeten la unió de les cèl·lules entre elles.

Les cèl·lules polaritzades són les responsables de l'alliberació de mucus i es coneixem com **cèl·lules calciformes** o **cèl·lules goblet**. L'element més abundant del mucus són les mucines, proteïnes glicosilades que participen en la funció de barrera epitelial (Khan i Collins, 2004). Els mecanismes que duen a terme consisteixen en fixar els bacteris i així, evitar la colonització epitelial i n'accelera la seva eliminació i endarrerix la difusió de molècules potencialment perilloses pels enteròcits.

Un altre tipus cel·lular són les **cèl·lules endocrines**, les quals són cèl·lules columnars amb la capacitat de produir una gran varietat d'hormones i transmissors. Flemström i Sjöblom (2005) van caracteritzar-les com sensors luminals que detecten el contingut luminal de nutrients, així com canvis en l'osmolalitat (Figura 1.1).

Al voltant dels anys 1980 es van establir diferents línies cel·lulars humanes com a models per l'estudi de la diferenciació cel·lular intestinal *in vitro* i així, estudiar i caracteritzar que expressen fenotips altament diferenciats, així doncs, hi ha les cèl·lules HT-29, les cèl·lules Caco-2 i les cèl·lules T84. La línia cel·lular **HT-29** que es va establir l'any 1975, deriva de cèl·lules d'adenocarcinoma de còlon humà (Fogh, 1975). S'ha vist que aquesta línia en cultiu presenta subpoblacions amb diversa capacitat de diferenciar-se. El 90-95% de les cèl·lules són morfològicament indiferenciades mentre que el 5-10% restant presenta característiques diferenciades que expressen diferents tipus d'enzims, l'antigen carcinoembrionari, la glicoproteïna de membrana MUC1 i altres mucines (Lesuffleur *et al.*, 1990). A nivell genètic, les cèl·lules HT29 presenten alteracions típiques de tumors còlon rectals (Corzo *et al.*, 2003).

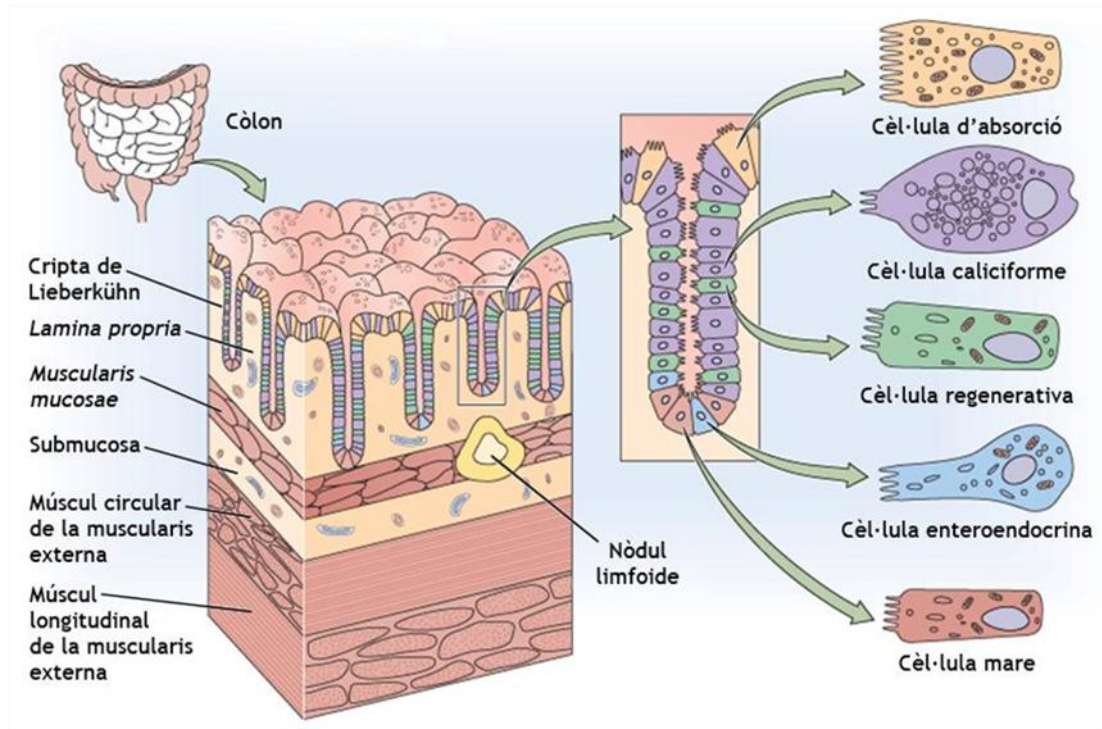


Figura 1.1. Esquema de l'epiteli del còlon, les criptes de LieberKühn i les cèl·lules que podem trobar al llarg de la cripta. A la base de la cripta hi trobem les cèl·lules mare i les cèl·lules endocrines, després hi ha distribuïdes les cèl·lules de goblet, les regeneratives i les d'absorció. Modificat de www.studentconsult.com

L'any 1975 Fogh i Trempe van establir la línia cel·lular **Caco-2**, la qual també deriva d'un carcinoma de còlon humà. Aquesta línia presenta a nivell morfològic unes característiques de diferenciació *in vitro* espontànies durant el desenvolupament del cultiu i assoleixen unes característiques morfològiques, bioquímiques i funcionals comparables a les dels enteròcits madurs de l'intestí prim (Pinto *et al.*, 1983; Hidalgo *et al.*, 1989). Les cèl·lules Caco-2 formen monocapes polaritzades amb presència de microvil·lis i una alta expressió d'hidrolases intestinals. S'ha vist també que formen els complexos d'unió intercel·lulars i presenten sistemes de transport característics dels enteròcits. La línia cel·lular **T84**, és una línia establerta procedent d'un adenocarcinoma de còlon humà i s'ha utilitzat com a model en estudis de transport electrolític perquè està regulat per diferents hormones i neurotransmissors (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984; Madara *et al.*, 1987). Aquesta línia cel·lular creix formant monocapes que formen les unions estretes. També s'ha descrit que aquesta línia cel·lular secreta clorurs a través dels canals apicals, i produeix i allibera mucines (Brady *et al.*, 1984).

1.2 MIOFIBROBLASTS INTESTINALS

En els darrers anys s'ha descrit que els miofibroblasts participen en la regulació de processos biològics fonamentals com la proliferació, la diferenciació, la motilitat, la morfogènesi, apoptosi, reparació i inflamació cel·lular. En el tracte gastrointestinal s'hi poden distingir dos tipus de miofibroblasts: les cèl·lules de Cajal (ICC, *Interstitial Cells of Cajal*) i els miofibroblasts subepitelials intestinals (ISEMF, *Intestinal Subepithelial Myofibroblast Cells*). Les ICC es van descobrir fa més de 100 anys i no va ser fins a finals del segle passat que se'ls va identificar com fibroblast i no com a neurona (Sanders, 1996). Es troben localitzats a la submucosa i la *muscularis propria* juntament amb el múscul llis de l'intestí, on faciliten la propagació elèctrica, modulen els neurotransmissors i regulen la motilitat intestinal del múscul llis (Sanders *et al.*, 2006) (Figura 1.2). Sanders *et al.*, (2002) van veure que aquests miofibroblasts actuen com a moduladors de la proliferació, la fibrosi i en la reparació. Pascal *et al.*, (1968) van descriure que els ISEMF es troben a la *lamina propria* per sota de les cèl·lules epitelials de les criptes amb major proporció que en la superfície del còlon. Els ISEMF participen en el creixement i desenvolupament mucosal, la contracció intestinal, reparació intestinal, fibrosi, neoplàsia, transport d'aigua i ions, a més de participar en processos immunològics i en la inflamació (Powell *et al.*, 2005). Els ISEMF es caracteritzen per expressar proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM, *Extracellular Matrix*), com el col·lagen, la laminina i la fibronectina, a més, poden alliberar enzims com les metal·loproteïnases que s'encarregaran de la remodelació de l'ECM o bé, els seus inhibidors. Andoh *et al.*, (2005) va descriure que els ISEMF responen a diferents factors com el factor de creixement epidèrmic (EGF, *Epidermal Growth Factor*), factors de creixement d'insulina I i II (IGF-I i IGF-II, *Insulin-like Growth Factor*), l'interleucina-1B (IL-1B) i el factor de necrosi tumoral (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor*). Els miofibroblasts del còlon formen una xarxa que envolta les criptes, que es coneix amb el nom de beina pericriptal. Aquesta beina participa en el transport d'ions i aigua i incrementa el seu gruix davant de concentracions altes d'angiotensina II i d'aldosterona (Naftalin i Pedley, 1999).

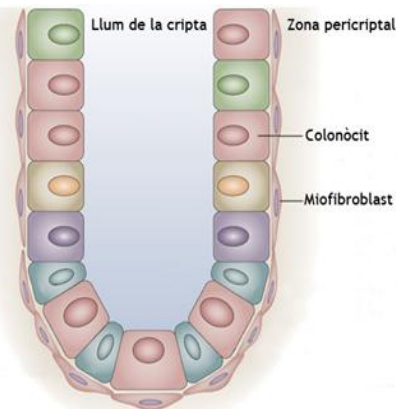


Figura 1.2. Representació de la ubicació dels miofibroblasts en les criptes de Lieberkühn. Els miofibroblasts formen una capa sota els colonòcits. (Adaptat de Quante i Wang, 2009).

Els miofibroblasts s'uneixen entre ells per les unions adherents, constituïdes principalment per la cadherina-11, que s'uneix al citoesquelet d'actina a través de la β -catenina (Danjo i Gipson, 1998). Però, el més important és que estan units a la matriu circumdant a través d'un fibronexus i no a la làmina basal (Mifflin *et al.*, 2011). L'actina associada a múscul llis (SMA, *Smooth Muscle Actin*) és molt característica dels miofibroblast i la presenten tant els ISEMF com els ICC (Powell *et al.*, 1999) (Figura 1.3). Eyden (2008) defineix els miofibroblasts amb molt de detall i amb uns criteris molt concrets, concretament han de presentar morfologia estrellada o en forma de fus, han de ser positius per α -SMA, fibronectina i vimentina, negatius per miosina de múscul llis negatiu.

Els miofibroblasts expressen i secreten un gran nombre de citoquines, factors de creixement, neurotransmissors, hormones, mediadors de la inflamació i proteïnes d'adhesió, així com també expressen receptors pels seus lligands (Powell *et al.*, 2005; 2011). Les cèl·lules CCD-18Co, és una línia cel·lular establerta que presenta morfologia de miofibroblast subepitelial i és de procedència humana. Les seves propietats de creixement són adherents i els investigadors Simon *et al.*, (2002, 1999) i Mahida *et al.*, (1997) van descriure que els miofibroblasts subepitelials (CCD-18Co) expressaven els marcadors específics d'aquestes cèl·lules: α -SMA, vimentina i cadherina.

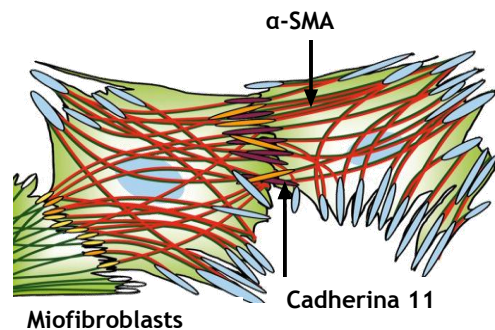


Figura 1.3. Dibuix representatiu dels marcatges dels miofibroblasts. En filaments vermells representats els filaments d'actina i en taronja la cadherina 11 que forma les unions adherents.

El cocultiu de fibroblasts o miofibroblasts amb cèl·lules epitelials dona lloc a proliferació i diferenciació de les cèl·lules epitelials (Del Buono *et al.*, 1998; Halttunen *et al.*, 1996). Del Buono *et al.*, (1998) van observar que el cultiu primari dels ISEMF era capaç d'estimular la diferenciació de les cèl·lules humanes derivades de càncer de còlon com les cèl·lules HT-29 o les cèl·lules T84. En altres estudis van demostrar que factors de creixement com el factor de creixement hepàtic (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*) estimulen la proliferació i no la diferenciació de les cèl·lules T84 mentre que el factor de creixement transformant- β (TGF β , *Transforming Growth Factor- β*) té l'efecte oposat (Halttunen *et al.*, 1996).

1.3 ABSORCIÓ D'AIGUA I IONS

L'organisme humà absorbeix gairebé el 99% de l'aigua i dels ions que arriben al tracte gastrointestinal. Els processos d'absorció i de secreció d'aquests elements es realitza principalment al còlon, que és molt eficient per realitzar aquesta funció, ja que és capaç d'absorbir aigua en contra de gradients osmòtics. L'absorció està protagonitzada pel Na^+ , que pot ser absorbit per un mecanisme electroneutre o bé per un mecanisme electrogènic, mentre que la secreció està conduïda pel Cl^- .

El moviment d'ions pot realitzar-se per difusió, procés que no requereix energia perquè es realitza a favor de gradient de concentració, o bé per transport mitjançant unes proteïnes de membrana que transporten soluts en contra de gradient electroquímico i per tant es necessita un aport d'energia. Pel que fa als mecanismes d'absorció, la part més distal de l'intestí gros hi predomina l'absorció electrogènica de Na^+ , que es realitza a través del canal epitelial de Na^+ (ENaC; *Epithelial Na⁺ Channel*) situat a la membrana apical dels colonòcits. La presència d'aquest depèn de diversos factors, entre els quals hi ha la regulació hormonal per aldosterona. L'aigua es pot moure per diferents vies: la paracel·lular i la transcel·lular a través dels canals d'aigua, anomenats aquaporines (AQP), que es troben localitzats a la membrana apical i la basolateral (Wang *et al.*, 2000). A més, el moviment d'aigua també es pot produir a través dels transportadors de nutrients (Meinild *et al.*, 1998).

1.4 FUNCIO DE BARRERA

L'epiteli intestinal constitueix la major superfície mucosa de l'organisme humà i funciona com una barrera selectiva que permet el pas de nutrients, ions i aigua des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica, alhora que restringeix el pas de substàncies potencialment nocives (Farhadi *et al.*, 2003). És per això, que el sistema gastrointestinal presenta diferents nivells de defensa enfront de toxines, antigens i patògens. Així, hi ha mecanismes protectors no específics a la llum intestinal; el propi epitelí intestinal actua com a sistema de barrera; i les respostes immunològiques a microorganismes i antigens formen un nivell de defensa més específic.

L'epiteli constitueix una barrera que està exposada a constants agressions, donades les característiques del medi extern que sol ser força agressiu. Aquesta funció de barrera s'assoleix gràcies a la presència de les unions estretes, que mantenen la seva integritat i regulen la seva permeabilitat tant en condicions fisiològiques com patològiques (Fasano i Shea-Donohue, 2005). Des de l'epiteli, alguns tipus cel·lulars afavoreixen la síntesi i l'alliberació de substàncies defensores, com el mucus produït per les cèl·lules de *goblet* o la α -defensina produïda per les cèl·lules de Paneth (Moal i Servin, 2006).

Els desmosomes, les unions adherents i les unions estretes formen el complex d'unió epitelial que permet mantenir les cèl·lules epitelials unides entre elles (Farquhar i Palade, 1963) (Figura 1.4). Les unions estretes generalment encerclen les cèl·lules en l'extrem apical de la part lateral de la membrana, que forma una barrera a la difusió paracel·lular que regula la permeabilitat epitelial. A més, també restringeixen la difusió de components de membrana entre la zona apical i la zona basolateral. Les unions adherents i els desmosomes són unions adhesives que estan unides al citoesquelet d'actina i als filaments intermedis, respectivament.

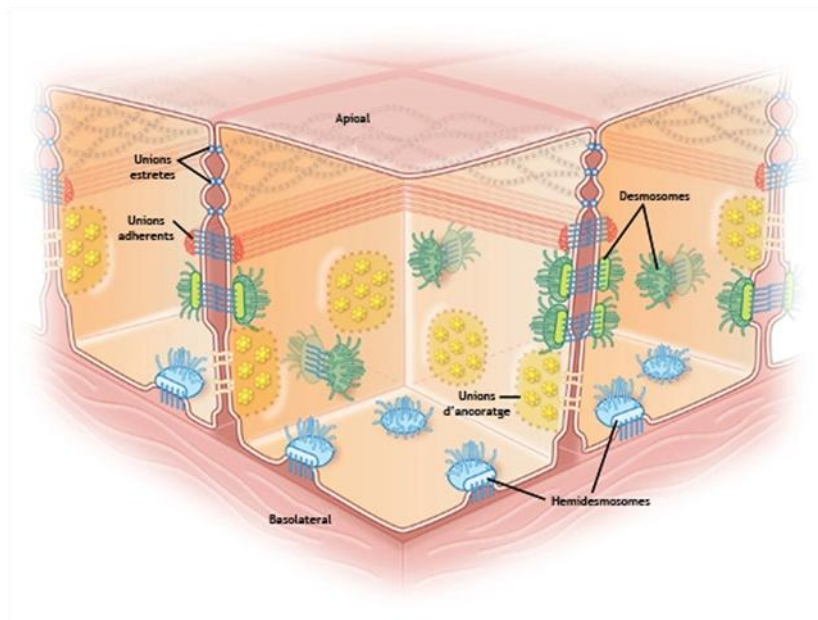


Figura 1.4. Unió intercel·lular epitelial. Representació esquemàtica dels colonòcits. Les unions estretes i les unions adherents estan unides al citoesquelet d'actina mentre que els desmosomes ho estan als filaments intermedis (Adaptat de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-adhesion-and-cell-communication-14050486>).

A l'epiteli intestinal, els components de les unions adherents estan concentrats prop de les unions estretes i colocalitzen amb un prominent cinturó d'actina, mentre que en altres tipus d'epitelis estan distribuïts al llarg de tota la membrana lateral. D'altra banda, els desmosomes es distribueixen al llarg de la membrana basolateral (Matter i Balda, 2003).

La unió estreta està formada per una placa citoplasmàtica i tres tipus de proteïnes transmembrana que són l'occludina, les claudines i les JAMs (*Junctional Adhesion Molecule*), que són unes proteïnes d'adhesió pertanyents a la superfamília de les immunoglobulines (Figura 1.5). Les unions estretes són estructures membranoses presents en diferents tipus cel·lulars com les cèl·lules epitelials, les endotelials i les mesotelials (Krause *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 1988). Les unions estretes formen unes barreres entre les cèl·lules disposades en capes que regulen la difusió de les molècules i els ions a través de l'espai intercel·lular (Sawada *et al.*, 2003). A més, també participen en la formació d'una barrera polaritzada amb una permeabilitat selectiva a l'aigua, soluts i molècules més grans que és essencial pel manteniment homeostàtic dins dels sistemes fisiològics dels vertebrats. La barrera formada per les unions estretes evita l'entrada d'agents patògens a través de l'epiteli, i per tant actua com a un component de la immunitat innata (Landau, 2006). Ara bé, també es pot produir una desregulació de les unions estretes que és una característica fisiopatològica de moltes malalties com per exemple, càncer, vessament cerebral, retinopatia diabètica, malaltia inflamatòria dels pulmons i malaltia inflamatòria intestinal (IBD, *Inflammatory bowel disease*) (Förster, 2008). Al llarg dels anys, s'han anat atribuït funcions addicionals a les unions estretes; com la diferenciació cel·lular, la proliferació, la migració i les senyals de transducció (Balda i Matter, 2009; Matter *et al.*, 2005; Steed *et al.*, 2010).

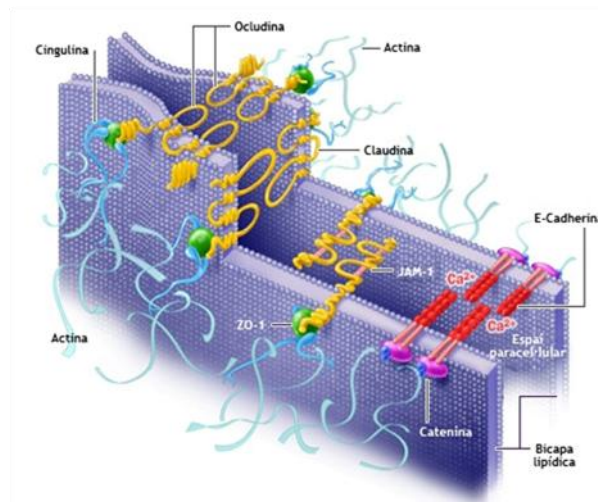


Figura 1.5. Representació de les proteïnes que constitueixen les unions estretes entre dues membranes lipídiques. (Adaptat de www.nastech.com).

La placa citoplasmàtica de les unions estretes està formada per diferents tipus de proteïnes, que inclouen adaptadors com ara les proteïnes ZO-1, ZO-2 i ZO-3 (*Zonula Occludens-1, -2 i -3*) i altres proteïnes reguladores i de senyalització. Les proteïnes adaptadores es creu que estan vinculades a les proteïnes transmembrana i recluten altres components citosòlics, com proteïnes quinases, GTPases i factors de transcripció (Tsukita *et al.*, 2002).

Les claudines i l'occludina són els elements més importants de les unions estretes, que s'associen en heteropolímers i formen les bandes intramembranoses. S'ha proposat que en aquestes bandes hi ha canals fluctuants que permeten la difusió selectiva d'ions i de petites molècules hidrofíliques. Així doncs, la quantitat i els tipus de claudines i occludines expressades determinen la mida i la càrrega de les substàncies que poden difondre a través de la via paracel·lular (Matter i Balda, 2003).

La unió adherent és un tipus d'unió intercel·lular membrana-citoesquelet que crea una xarxa a través de les cèl·lules, fonamental per a la coordinació del comportament d'una població cel·lular (Gottardi *et al.*, 2002). Les cadherines són proteïnes de la membrana plasmàtica associades a les unions adherents, que presenten importants contribucions en la funció de barrera, l'embriogènesi i l'homeòstasi (Gumbiner, 2005; Halbleib i Nelson, 2006; Nishimura i Takeichi, 2009). El component principal de la unió adherent és l'E-cadherina, que presenta un domini extracel·lular responsable de les unions homofíliques dependents de Ca^{2+} amb molècules d'E-cadherina de la cèl·lula adjacent, i un domini citoplasmàtic que mitjançant altres proteïnes s'uneix al citoesquelet d'actina. Aquestes proteïnes intermèdies són les catenines. La que s'uneix directament a l'E-cadherina és la β -catenina, que s'uneix també a l' α -catenina (Imamura *et al.*, 1999). Aquesta última s'ha vist que es pot unir tant a l'actina com a proteïnes associades a l'actina, com la vinculina o l' α -actinina (Watabe-Uchida *et al.*, 1998; Nieset *et al.*, 1997). L'associació α -catenina-vinculina està implicada en la formació i el manteniment tant de la unió adherent com de la unió estreta (Watabe-Uchida *et al.*, 1998).

Els desmosomes no només són estructures especialitzades necessàries per a l'establiment i manteniment de l'adhesió en teixits d'origen epitelial sinó que també faciliten la comunicació cel·lular a través de senyals de transmissió. Aquestes unions es troben a la superfície lateral entre cèl·lules adjacents. Els desmosomes s'han observat en diferents tipus de teixits com ara la mucosa intestinal, la vesícula biliar, el fetge, el pàncrees, l'estómac, les glàndules salivals i la glàndula tiroide i també en les cèl·lules epitelials de la nefrona, tot i que són més abundants

a la pell i al miocardi (Holthöfer *et al.*, 2007). Un dels elements importants dels desmosomes són les proteïnes transmembrana, desmogleïna i desmocolina, que pertanyen a la superfamília de les cadherines i que formen una estructura semblant a una cremallera a l'espai intercel·lular (Banon *et al.*, 2002). En el fragment citosòlic d'aquestes proteïnes s'hi uneix la placoglobina, que és un mediador tant per a l'associació d'aquests complexos com per a la segregació dels seus components. La placoglobina juntament amb un altre membre de la mateixa família, la placofilina, formen la placa densa externa. Aquestes proteïnes s'uneixen als filaments intermedis mitjançant la desmoplaquina, que és el principal component de la placa densa interna (Huber, 2003).

2. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

Un dels mecanismes reguladors de l'homeòstasi hídrica i electrolítica és el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS; *Renin-angiotensin-aldosterone system*). Aquest sistema inclou un conjunt de reaccions químiques en forma de cascada enzimàtica, que es desencadenen per l'alliberació de la proteasa renina, per les cèl·lules juxtaglomerulars del ronyó. La renina transforma l'angiotensinogen, una proteïna plasmàtica sintetitzada al fetge, en angiotensina I. A mesura que la sang flueix a través dels capil·lars, l'enzim convertidor d'angiotensina (ACE, *Angiotensin Converting Enzyme*) transforma l'angiotensina I a angiotensina II (**Figura 1.6**). Aquesta hormona s'uneix als seus receptors situats a les glàndules suprarenals, que activaran a missatgers secundaris que incrementaran la concentració de Ca^{2+} intracel·lular que provoca la producció d'aldosterona (Williams, 2005; White, 1994; Timmermans *et al.*, 1993). L'alliberació de renina al ronyó, està regulada per diferents factors, entre els quals es troba la disminució de la pressió de perfusió al ronyó, la disminució de la concentració plasmàtica de Na^+ i l'estimulació β -adrenèrgica. Els factors que inhibeixen la síntesi d'angiotensina II són el K^+ , el pèptid natriurètic atrial (ANP, *Atrial Natriuretic Peptide*), la dopamina i/o l'estimulació α -adrenèrgica.

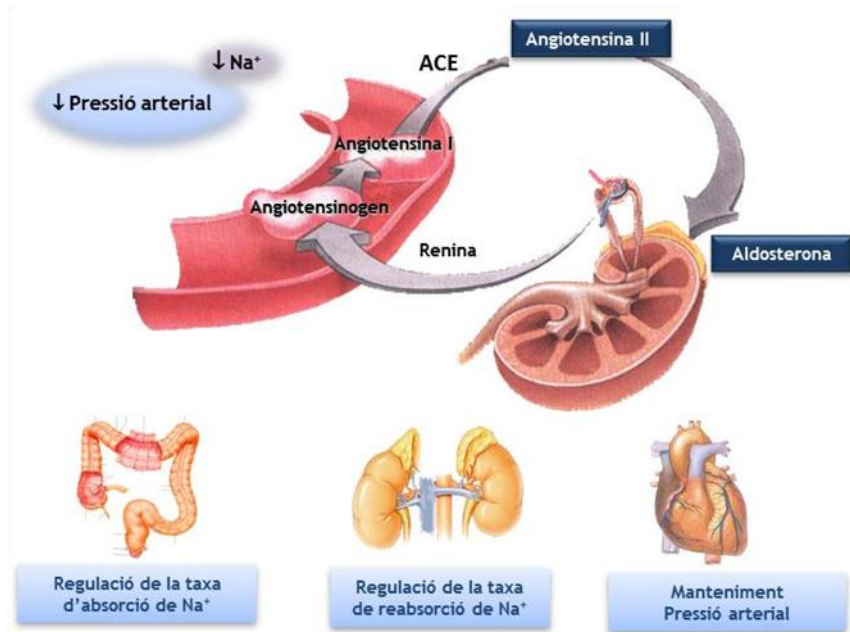


Figura 1.6. Representació esquemàtica de l'activació del RAAS. Una davallada de la concentració de Na^+ o de la pressió arterial activa la producció de renina que transforma l'angiotensinogen a angiotensina I. L'enzim convertidor d'angiotensina (ACE) transforma l'angiotensina I en angotensina II i aquesta estimula la secreció d'aldosterona en el còrtex suprarenal. L'aldosterona augmenta la reabsorció i l'absorció de Na^+ i regula la pressió arterial. (Adaptada de www.health-on-topic.net.)

Els factors estimuladors de l'alliberació de renina incrementen el 3'5' adenosina monofosfat cíclic (AMPc, *Adenosine Monophosphate*) mentre que els que l'inhibeixen, incrementen el GMPc o activen la fosfolipasa C (Bader i Ganten, 2000). Tot i que la síntesi majoritària de renina es produeix als ronyons, també s'atribueix a altres teixits com el cervell, el cor, el teixit adipós, les gònades, el pàncrees i la placenta (Persson, 2003). Al còlon també s'ha detectat la presència de renina i altres components, fet que suggereix la presència d'un RAAS local (Hirasawa *et al.*, 2002). Majoritàriament, els nivells de renina circulants provenen dels ronyons, malgrat que en humans i en animals que se'ls ha realitzat una nefrectomia bilateral els nivells de renina circulant gairebé són indetectables. Williams (2005) considera que els RAAS locals actuen de forma autocrina i paracrina.

3. ALDOSTERONA

L'any 1934 els investigadors Zwemer i Sullivan van proposar que hi havia d'haver alguna substància alliberada pel còrtex adrenal amb capacitat d'influir en el metabolisme dels sucres i de l'aigua. Vint anys més tard, el grup de Simpson *et al.*, (1954) van identificar una substància amb aquestes propietats, que es trobava en l'orina, la sang i a extractes adrenals, que van anomenar en un principi electrocortina. Posteriorment van saber que era d'origen adrenal i que presentava estructura esteroidal i la van anomenar aldosterona.

La síntesi majoritària d'aldosterona té lloc a les glàndules adrenals tot i que s'ha descobert síntesi extra-adrenal. Lockett i Retallack (1970) van descriure la presència de compostos amb estructura esteroidal al múscul cardíac i al cor de gats. Fins anys més tard no es va identificar l'mRNA de l'aldosterona sintasa al teixit vascular de rosegadors (Takeda *et al.*, 1995). Posteriorment, també es va identificar l'aldosterona sintasa a teixit cardiovascular humà, musculatura llisa vascular i cèl·lules endotelials (Hatakeyama *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1996). Davies i Mackenzie (2003) van identificar la síntesi *de novo* extra-adrenal de l'aldosterona al sistema cardiovascular i al sistema nerviós central (SNC).

L'aldosterona és una hormona mineralocorticoide i actua a ronyons, còlon i glàndules salivals i sudorípares (Webber, 2003). S'ha vist que el receptor mineralocorticoide (MR; *mineralocorticoid receptor*) s'expressa en cèl·lules epitelials com els queratinòcits epidèrmics, i en cèl·lules no epitelials, com els miòcits cardíacs, les neurones del SNC, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules musculars llises del sistema vascular (Farman i Rafestin-Oblin, 2001).

Els mecanismes que intervenen en la secreció de l'aldosterona actuen de forma simultània i són:

- **Sistema renina-angiotensina.** Quan es produeix una davallada del volum sanguini ja sigui causat per deshidratació, dèficit de Na^+ o hemorràgia s'estimula la secreció de la renina que afavoreix la síntesi d'aldosterona. A nivell renal, l'aldosterona incrementa la reabsorció d'aigua, que incrementa el líquid extracel·lular (LEC) i la recuperació de la pressió arterial. A més, l'angiotensina II amb la seva acció vasoconstrictora afavoreix l'increment de la pressió arterial.

- **Concentració plasmàtica de potassi.** Un increment d'aquest catió en el LEC activa la secreció d'aldosterona al còrtex suprarenal que indueix l'eliminació del K^+ per part dels ronyons. Els ions K^+ activen els canals de Ca^{2+} dependents de voltatge, per tant incrementa la concentració de Ca^{2+} intracel·lular que estimula la secreció d'aldosterona (Boon *et al.*, 1997).
- **L'hormona adrenocorticotròpica o corticotropina (ACTH, Adrenocorticotropic hormone).** Aquesta hormona és secretada per la hipòfisi i la seva funció principal és estimular el creixement de la zona fasciculada i de la zona reticular del còrtex adrenal. L'hormona ACTH s'uneix als receptors que es troben a la membrana de les cèl·lules suprarenocorticals. Aquesta unió activa l'adenililciclasa i l'augment resultant de l'AMPc intracel·lular activa a la proteinquinasa A, donant lloc a la formació de pregnenolona i dels seus derivats entre els quals hi ha l'aldosterona.

3.1 RECEPTORS DE L'ALDOSTERONA

Les hormones corticosteroides es poden unir a dos tipus de receptors: l'MR i el glucocorticoide. Aquests receptors pertanyen a la família de receptors nuclears que inclouen els receptors de les hormones esteroides, tiroïdals, vitamina D₃ i àcid retinoic (Farman i Rafestin-Oblin, 2001). A l'MR s'hi poden unir els glucocorticoides i l'aldosterona amb una gran afinitat. La presència de l'enzim 11 β -hidoxiesteroid deshidrogenasa (11 β -HSD) juga un paper important en la prevenció de l'ocupació permanent de l'MR pels glucocorticoides.

De forma majoritària, els efectes de les hormones esteroides són genòmics, és a dir, inclou la transcripció de gens. S'ha descrit que l'aldosterona a més de les accions genòmiques també en presenta de no genòmiques (Lösel *et al.*, 2004). L'aldosterona és de naturalesa lipofílica i entra a la cèl·lula per difusió a través de la bicapa lipídica (Boldyreff i Wehling, 2004). Un cop al citoplasma, s'uneix a l'MR intracel·lular i tot el complex transloca cap al nucli, on s'uneix a seqüències específiques del DNA i actua com a factor de transcripció (Pippal i Fuller, 2008). Els efectes derivats del mecanisme genòmic es poden observar als 30 min de l'alliberació o de l'administració de l'hormona. Moltes accions de l'aldosterona no es poden descriure per aquest model clàssic, perquè el temps de resposta és massa ràpid. Les respostes no genòmiques poden

produir-se en pocs minuts, perquè no intervé la transcripció. En aquest cas, estan involucrats canvis en la concentració o en l'activitat de missatgers secundaris (Boldyreff i Wehling, 2003).

S'ha vist que les rates sotmeses a una dieta amb baix contingut de Na^+ incrementen l'expressió de 11 β -HSD2 al còlon (Nørregaard *et al.*, 2003). Aquest enzim també s'expressa en teixit cardíac humà (Slight *et al.*, 1996). Així doncs, la coexpressió de l'MR i l'11 β -HSD2 impedeix l'ocupació permanent de l'MR per glucocorticoides, i permet la unió d'aldosterona dependent de la seva concentració (Seckl i Chapman, 1997; Funder *et al.*, 1988). Un dels inhibidors selectius de l'MR és l'espironolactona, fàrmac que s'utilitza en moltes malalties com antagonista de l'aldosterona.

L'espironolactona i l'eplerenona presenten una estructura similar i són els inhibidors selectius de l'MR. L'eplerenona és un derivat de l'espironolactona que té més selectivitat pel receptor de l'aldosterona que pels altres receptors esteroides (Brown, 2003). Els estudis realitzats *in vitro* han demostrat una gran afinitat de l'espironolactona pels receptors de l'aldosterona mentre que l'eplerenona els seus efectes són més evidents *in vivo* a una dosi més baixa (Struthers *et al.*, 2008).

3.2 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A RONYÓ

L'aldosterona regula l'excreció de Na^+ a través de l'MR i dels seus efectes genòmics a la nefrona distal del ronyó (Bhargava *et al.*, 2001). L'aldosterona a part de la reabsorció de Na^+ també regula els fluxos d'altres ions. La reabsorció de Na^+ està acompanyada per la reabsorció d'ions com el Cl^- i HCO_3^- i afavoreix la retenció d'aigua. Alhora es produeix un increment de K^+ en l'orina, i per evitar l'acidesa sanguínia hi ha una excreció de H^+ cap a l'orina. Williams (2005) va veure un increment de l'activitat del canal ENaC al còlon distal i al ronyó. L'aldosterona activa aquest canal en dues fases; la fase aguda i la fase crònica. La fase aguda està caracteritzada per un increment de 2 a 3 cops de la reabsorció de Na^+ i es produeix al cap de 0,5 i 3 h. Durant aquesta fase no es modifica l'expressió de l'mRNA de cap de les tres subunitats del canal de Na^+ . A partir de les 3 h es desencadena la fase crònica, que és progressiva i hi ha un increment de l'absorció de Na^+ que a les 24 h és 20 cops la taxa inicial. Aquesta reabsorció de Na^+ s'aconsegueix bé per un increment del nombre de canals ENaC a la membrana o bé per un increment de l'activitat. Aquesta activitat està controlada per la

proteïna Nedd4-2, que en situacions de pseudoaldosteronisme participa en l'eliminació dels canals de la membrana, que alhora és inhibida per la quinasa regulada per sèrum i glucocorticoides (Sgk1; *serum- and glucocorticoid-regulated kinase*) (Snyder *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2004). L'aldosterona incrementa l'expressió de l'Sgk1 tant al ronyó com al còlon (Chen *et al.*, 1999; Náray-Fejes-Toth *et al.*, 1999; Shigaev *et al.*, 2000). A més, l'Sgk1 pot fosforilar part del carboni terminal de la subunitat α de l'ENaC, que altera la seva activitat (Diakov i Korbmacher, 2004) i regular l'expressió gènica d'altres subunitats de diferents canals (Boyd i Náray-Fejes-Toth, 2005). El factor inductor de l'hormona corticosteroide (CHIF; *Corticosteroid Hormone Induced Factor*) present al còlon incrementa l'afinitat de l'ATPasa Na^+/K^+ pel Na^+ de manera que podria explicar en part l'increment de l'activitat de l'ATPasa que s'observa en resposta a l'aldosterona (Béguin *et al.*, 2001) (Figura 1.7).

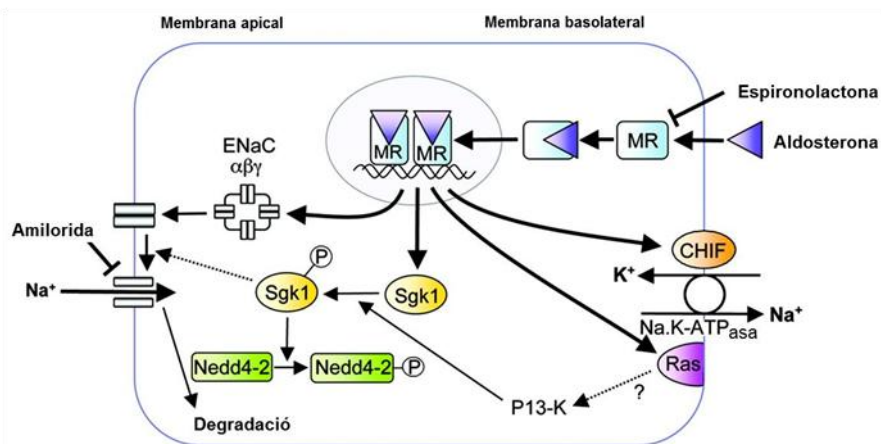


Figura 1.7. Representació gràfica de com una cèl·lula epitelial respon a l'aldosterona. L'aldosterona s'uneix al receptor mineralocorticoide (MR) i transloquen a nucli, on es desencadenen diferents respostes com ara l'increment de l'expressió de l'ENaC (Canal epitelial de Na^+) per regular l'absorció de Na^+ , de l'Sgk (Quinasa regulada per sèrum i glucocorticoides) necessària per fosforilar la proteïna Nedd4-2, i del CHIF (Factor inductor de l'hormona corticosteroide) que augmenta l'activitat de l'ATPasa. Imatge adaptada de Fuller i Young, 2005.

S'ha descrit que l'aldosterona està involucrada en la lesió renal incloent-hi la inflamació, l'estrès oxidatiu, la fibrosi, la proliferació mesangial i el dany dels podòcits en diferents models animals (Shibata *et al.*, 2007; Briet i Schiffrin, 2010; Nishiyama *et al.*, 2004).

A nivell renal, l'acció de l'aldosterona és profibròtica i mediada pel TGF β . De fet, l'aldosterona *in vitro* incrementa l'expressió del TGF β i de la fibronectina (Lai *et al.*, 2006). En estudis realitzats en rates Dahl sensibles a la sal i amb insuficiència cardíaca (DSHF, *Dahl salt-sensitive rat with heart failure*), l'administració d'aldosterona incrementa l'expressió del TGF β i aquest efecte també s'ha observat tant en rates adrenalectomitzades bilateralment (Chun *et al.*, 2008) com en rates normals (Juknevičius *et al.*, 2004). El TGF β incrementa la síntesi de col·lagen, redueix l'expressió de les metal·loproteïnases de la matriu i promou la proliferació dels fibroblasts (Sun *et al.*, 2000).

En els efectes profibròtics de l'aldosterona al ronyó també s'hi veuen involucrats altres factors com el factor de creixement de teixit connectiu (CTGF, *Connective Tissue Growth Factor*) que pot actuar per via dependent o independent del TGF β (Han *et al.*, 2006). L'aldosterona incrementa l'expressió de PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor*) a les cèl·lules mesangials i aquests efectes són atenuats pel tractament amb antagonistes de l'MR (Brown *et al.*, 2000). Aquest increment de PAI-1 comporta una degradació de l'ECM (Huang *et al.*, 2008) i participa en els efectes nocius de l'aldosterona al glomèrul (Ma *et al.*, 2006).

L'aldosterona incrementa la síntesi de col·lagen als fibroblasts renals, a través de la seva unió a l'MR i l'activació de la via ERK1/2 (Nagai *et al.*, 2005). A més, el tractament amb aldosterona induïx un canvi morfològic de les cèl·lules del túbul renal que passen a tenir una aparença mesenquimal (Zhang *et al.*, 2007). Aquest efecte és dependent de l'MR i de l'activació de la via ERK1/2 a través de les espècies reactives d'oxigen (ROS; *Reactive Oxygen Species*). L'aldosterona també estimula la proliferació de les cèl·lules mesangials a través de l'activació de la via Ras/Raf/MAPK (Otani *et al.*, 2007; Terada *et al.*, 2005). El receptor de l'EGF (EGFR) també està implicat en l'efecte de l'aldosterona sobre les cèl·lules mesangials (**Figura 1.8**). Huang *et al.*, (2009) han mostrat que l'aldosterona incrementa la fosforilació de l'EGFR i que aquest efecte és bloquejat per antagonistes de l'MR. Això indica que l'aldosterona induïx la fosforilació de l'EGFR via no genòmica.

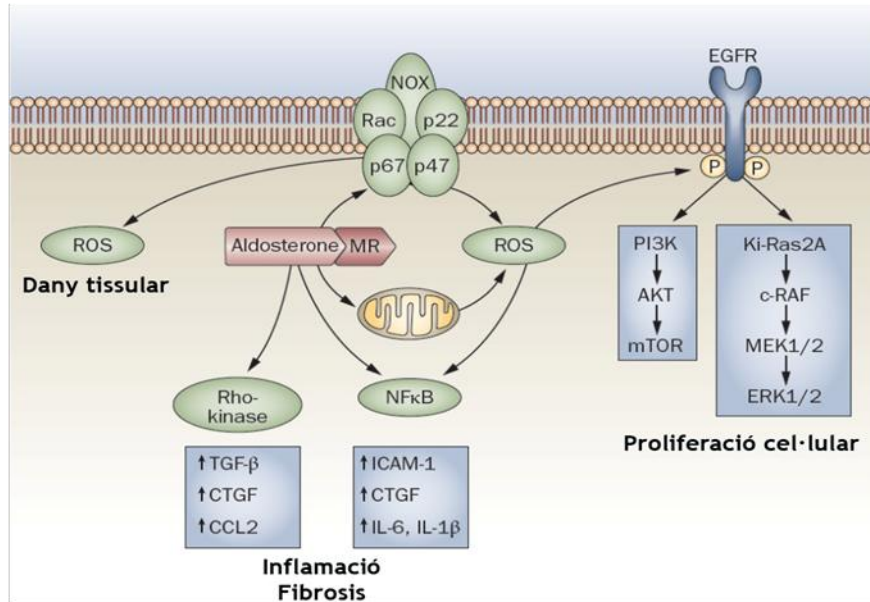


Figura 1.8. Mecanismes de l'aldosterona al ronyó. L'aldosterona a través del receptor mineralocorticoide (MR) induïx la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). L'aldosterona en els podòcits induïx dany tissular, inflamació, fibrosi i proliferació cel·lular. A més, el ROS pot fosforilar l'EGFR i estimular la proliferació de les cèl·lules mesangials a través de l'activació de la via Ras/Raf/MAPK o PI3K/AKT. Abreviatures: MR: receptor mineralocorticoide, ROS: espècies reactives d'oxigen, P: fosforilació. Imatge modificada de Briet *et al.*, 2010.

3.3 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A COR

L'increment dels nivells d'aldosterona a nivell plasmàtic afecta al sistema cardiovascular, on altera l'expressió de gens i influeix directament en el to cardiovascular i la contractilitat. Un excés de mineralocorticoïdes juntament amb una concentració inadequada de Na^+ actuen com a intermediaris de la fibrosi del miocardi, de la hipertensió i de la hipertròfia ventricular esquerra (Brilla i Weber, 1992; Young *et al.*, 1994). Tant els cardiomiòcits com els fibroblasts cardíacs expressen l'MR amb una alta afinitat per l'aldosterona (Lombès *et al.*, 1995). Rocha *et al.*, (2002) van demostrar que la fibrosi del miocardi induïda per l'aldosterona estava precedida per canvis pro-inflamatoris al teixit perivascular i que, tant la inflamació com la fibrosi eren previnguts amb l'adrenalactomia o bé, per l'administració d'antagonistes de l'MR (Martínez *et al.*, 2002). S'ha demostrat que nivells elevats d'aldosterona desencadenen fibrosi aòrtica (Neves *et al.*, 2005) i hipertròfia (Lacolley *et al.*, 2002) en diferents models de rates

hipertenses i l'administració de l'eplerenona atenua els efectes de la remodelació vascular i fibrosi desencadenats per l'aldosterona, que indica que el mecanisme d'acció és a través de l'MR (Cachofeiro *et al.*, 2008).

Diversos estudis han demostrat que pacients amb problemes cardíacs tenen la concentració d'aldosterona incrementada respecte els pacients normals (Laragh, 1960; 1962; O'Neil i Hayhurst *et al.*, 1985). Una alliberació d'aldosterona constant incrementa la pressió arterial i desencadena una hipertròfia del ventricle esquerre que promou la fibrosi cardíaca (Brilla i Weber, 1992; Brilla *et al.*, 1993; Robert *et al.*, 1995). Per entendre la fibrosi cardíaca hi ha diverses hipòtesis, la més destacada és la que suggereix que l'increment de l'angiotensina té un paper central. Harada *et al.* (2001) van demostrar que l'aldosterona incrementa l'expressió de l'mRNA de l'ACE, que comporta un increment de l'angiotensina II, que alhora incrementa l'aldosterona circulant (Carey, 2010). Alguns investigadors han estudiat el sinergisme existent entre les dues hormones (aldosterona i angiotensina) i la interacció de l'MR i els receptors de tipus I de l'angiotensina (Min *et al.*, 2005; 2007).

L'aldosterona produeix estrès oxidatiu a les cèl·lules endotelials (Iwashima *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2002), cèl·lules VSMC (Callera *et al.*, 2005), i cardiomiòcits (Hayashi *et al.*, 2008). La generació de ROS i l'activitat NADPH estan incrementades en els rosegadors amb hipertensió, incloent-hi les rates transgèniques *Ren2*, les quals tenen incrementades l'expressió de la renina (Stas *et al.*, 2007). L'increment de l'activitat NADPH induït per l'aldosterona pot donar-se per diferents vies entre les quals hi trobem l'MR que actua a través del C-Src i Rac1 (Iwashima *et al.*, 2008) o a través de la quinasa 1 reguladora de l'apoptosi (ASK1; *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) (Nakamura *et al.*, 2009). L'estrès oxidatiu té un paper central en la producció de la fibrosi i de la remodelació i està regulat per l'activitat oxidasa de Nox2-NADPH. En els models d'hipertensió, s'ha vist que l'aldosterona promou la infiltració vascular de monòcits, macròfags i limfòcits (Sun *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2002). Aquesta inflamació vascular precedeix el desenvolupament de la fibrosi tant al cor com al sistema vascular (Sun *et al.*, 2002). A més, l'aldosterona és capaç de promoure la proliferació de les cèl·lules VSMC de forma independent de la inflamació vascular (Min *et al.*, 2005).

3.4 EFECTES DE L'ALDOSTERONA A CÒLON

L'organisme necessita tant el Na^+ com el Cl^- ja que són elements que l'organisme no pot sintetitzar per si mateix i s'adquireixen per la ingestió de sal o clorur de sodi (NaCl). El Na^+ ocupa un lloc central en el balanç hídric i en el d'ions ja que és el catió més abundant del LEC i l'únic capaç d'exercir una pressió osmòtica significativa. Així doncs, tant la regulació de la ingesta de Na^+ com l'excreció d'aquest ió, d'aigua i d'altres ions hi participen un gran nombre de mecanismes homeostàtics de l'organisme. En aquest manteniment de l'homeòstasi hídrica i iònica hi tenen un paper important tant el còlon com el ronyó.

A l'epiteli del còlon hi ha un gran nombre de transportadors que són capaços de moure els soluts i l'aigua des de la llum intestinal cap als vasos sanguinis i viceversa amb una alta eficàcia. Aquests transportadors estan regulats per mecanismes endocrins, neurocrins i paracrins, en els quals hi juga un paper important el RAAS i la vasopressina. Per augmentar la reabsorció de Na^+ i evitar-ne la seva excreció per l'orina en una dieta amb baix contingut en Na^+ es requereix l'activació del RAAS (Sandle *et al.*, 1984; Turnamian i Blinder, 1988).

En diversos estudis duts a terme per Naftalin *et al.*, (1999) van veure que el còlon distal tenia una capacitat més elevada d'absorbir fluids en contra de gradient comparat amb el còlon proximal. Aquesta capacitat absorptiva del còlon distal era major quan els animals eren sotmesos a una dieta amb baix contingut de Na^+ i en canvi, no està modificada quan els animals consumien una dieta amb alt contingut en Na^+ . Aquest increment de l'absorció de Na^+ va acompanyat d'un engruïment de la beina pericriptal de miofibroblasts (Naftalin i Pedley, 1999). Aquesta beina delimita la zona pericriptal i genera un gradient osmòtic que afavoreix l'absorció d'aigua i la conseqüent deshidratació de les femtes (Naftalin *et al.*, 1999). L'activació del RAAS provoca l'alliberació d'aldosterona que estimula en primer lloc l'absorció de Na^+ al còlon distal i la reabsorció en el túbul distal del ronyó, mitjançant l'augment de l'expressió del canal ENaC a la membrana apical i l'increment en l'activitat ATPasa Na^+/K^+ a la membrana basolateral. En segon lloc, s'ha demostrat que l'aldosterona disminueix la permeabilitat paracel·lular del Na^+ ja que augmenta l'expressió de les unions estretes, concretament la claudina IV, i per tant, incrementa la resistència epitelial i la dificultat al moviment d'ions a través de les unions intercel·lulars (Cristià *et al.*, 2005). A més, aquesta hormona estimula la proliferació de la beina miofibroblàstica pericriptal (augmenta l'expressió de α -SMA i β -catenina) i, com a conseqüència es forma una barrera als soluts i a la difusió de

Na⁺ cap la circulació sanguínia. Aquest fenomen es pot interpretar com un mecanisme fisiològic adaptatiu per absorbir el màxim de Na⁺ davant una situació de deficiència. La importància d'aquesta beina s'ha evidenciat en un estudi on s'han eliminat els fibroblasts del cec mitjançant una radiació ionitzant, el qual presenta un increment de la permeabilitat epitelial i una reducció de la seva capacitat de deshidratació (Thiagarajah *et al.*, 2000).

L'aldosterona és la responsable directa de tots aquests efectes i reproduceix tots els fenòmens derivats d'una dieta amb baixa concentració de Na⁺. Així, s'exclou la participació directa de l'angiotensina II en la regulació de l'adaptació del còlon distal al contingut en Na⁺ de la dieta (Cristià *et al.*, 2005; Moretó *et al.*, 2005) (Figura 1.9).

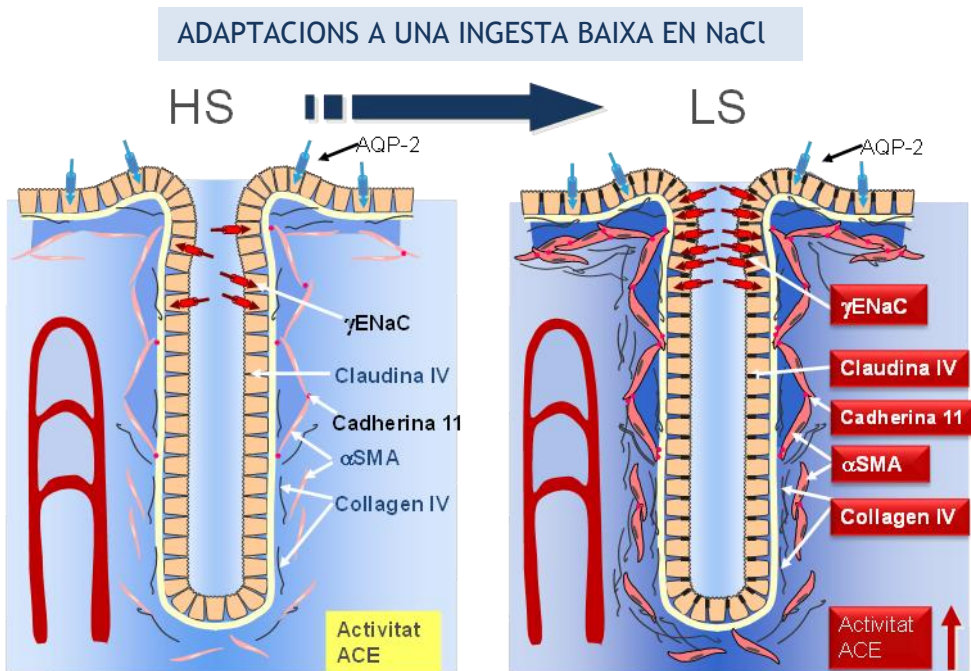


Figura 1.9. Adaptacions del còlon a una dieta baixa en NaCl. El canvi d'una dieta d'alt contingut de Na⁺ (HS) a una dieta amb baix contingut de Na⁺ (LS) incrementa l'expressió de l'ENaC, l'α-SMA, la claudina IV, la cadherina 11 i hi ha un acúmulo de col·lagen a la matriu extracel·lular. També s'ha vist que l'activitat de l'ACE (enzim convertidor d'angiotensina) està incrementada.

3.5 RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGFR)

Les cèl·lules dels organismes responen davant estímuls dels seu entorn a través de receptors de membrana els quals transmeten la senyal a l'interior de la cèl·lula. Aquests receptors de membrana es classifiquen segons els lligands que reconeixen, les respostes que generen i la seva estructura primària. La família més abundant és la que té activitat tirosina quinasa intrínseca, que catalitza la transferència d'un fosfat de l'ATP a grups tirosina de les proteïnes diana (Hunter, 1998). Aquesta família de receptors presenten un domini intracel·lular i seqüències reguladores que poden autofosforilar-se o bé ser fosforilats per proteïnes quinasas heteròlogues (Schlessinger, 2000).

L'EGFR és una proteïna de 170 kDa formada per una cadena polipeptídica de 130 kDa unida per l'extrem N-terminal a oligosacàrids. L'EGFR també es coneix com ErbB1 o HER1 i va ser descrit per primera vegada per Downward *et al.*, 1984. Posteriorment, es van caracteritzar altres membres de la família de l'EGFR o ErbB, com són: ErbE2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4). L'EGFR presenten un domini extracel·lular d'unió al lligand i un domini intracel·lular que té activitat tirosina quinasa. Aquests receptors poden ser activats per metal·loproteïnases de l'ECM i un cop activats s'acoblen a proteïnes G (Prenzel *et al.*, 1999; Asakura *et al.*, 2002).

L'EGFR té un paper important en el desenvolupament embrionari i post-natal, ja que els ratolins EGFR^{-/-} (no expressen l'EGFR) majoritàriament moren durant les etapes embrionàries i els que aconsegueixen sobreviure tenen greus alteracions a les estructures epitelials com la pell, fol·licles pilosos, els ulls, intestins i pulmons, fet que indica que l'EGFR participa en la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules epitelials (Sibilia i Wagner, 1995). A més, també s'ha observat que l'EGFR té un paper important en el desenvolupament hepàtic en ratolins EGFR^{-/-} presenten alteracions de la regeneració hepàtica tot i presentar una funcionalitat normal (Natarajan *et al.*, 2007).

La unió de l'EGF al seu receptor produeix l'autofosforilació dels residus tirosina i desencadena l'activació de diferents cascades de senyalització com són la via la PI3K/AKT, la via Ras/Raf/MAPK o la via JAK/STAT. La via de senyalització PI3K/AKT està implicada en la proliferació, la diferenciació i és necessària per la supervivència de les cèl·lules (Xu *et al.*, 2003, Goncharova *et al.*, 2002). La via Ras/Raf/MAPK inclou un gran nombre de proteïnes cel·lulars que tenen un paper important en la proliferació cel·lular, la regulació del cicle cel·lular, la reparació tissular i la migració (Stacey, 2003). La darrera via JAK/STAT estimula la

proliferació cel·lular, la diferenciació, la migració cel·lular i l'apoptosi. L'activació de la via Ras/Raf/MAPK s'inicia amb l'activació de RAS i consecutivament es fosforilen Raf, MEK1/2 i finalment ERK1/2 que activa factors de transcriptors implicats en la proliferació (Wong i Guillaund, 2004). L'activació de PI3K indueix l'activació de l'AKT/PKB que activa diferents factors de transcripció. El tractament amb EGF també estimula la via de senyalització JAK/STAT, en la qual JAK fosforila STAT i activa la seva activitat transcripcional (Lin *et al.*, 2001) (Figura 1.10).

La unió de l'aldosterona a l'MR indueix diferents condicions patològiques com són la remodelació tissular, la inflamació, la fibrosi i la hipertròfia (Huang *et al.*, 2009; Briet i Schiffrin, 2010). Alguns d'aquests efectes podrien ser mediatos per l'activació de l'EGFR. Molècules com l'angiotensina II, a través d'aquest receptor, poden induir la síntesi proteica (Voisin *et al.*, 2002), hipertròfia i remodelació del teixit cardíac (Paradis *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002). Quan s'ha inhibït l'EGFR s'han atenuat aquests efectes fisiopatològics.

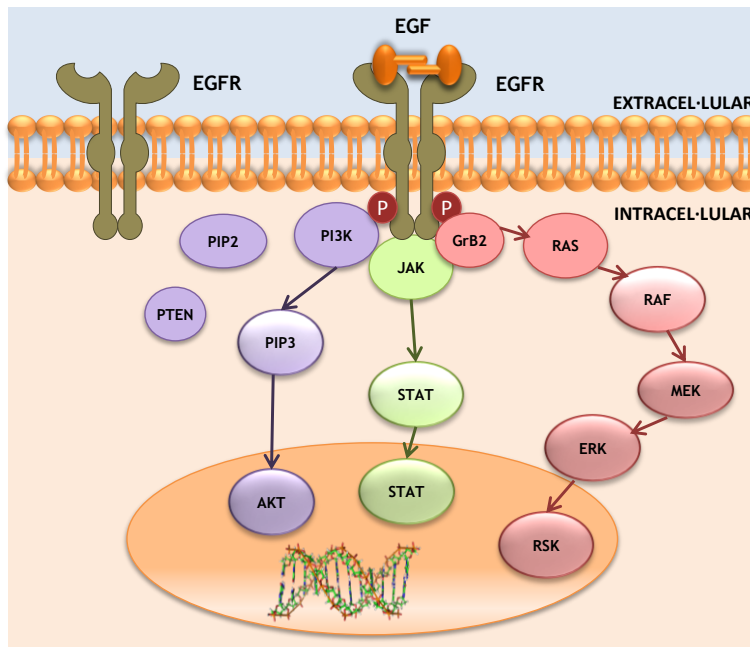


Figura 1.10. Vies implicades en l'acció de l'EGF. La unió de l'EGF amb el seu receptor (EGFR) fa que es fosforili i es desencadeni l'activació de tres vies de senyalització: la PI3K/AKT, la JAK/STAT i la Ras/Raf/MAPK, que participen en la proliferació cel·lular.

Els efectes del complex aldosterona-MR sobre la transactivació del EGFR pot ser mediat per un mecanisme genòmic o bé també a través d'un mecanisme no genòmic. L'aldosterona indueix la fosforilació de l'ERK mitjançant la transactivació de l'EGFR (Huang *et al.*, 2009). S'ha demostrat que els inhibidors de l'EGFR són capaços d'eliminar ràpidament els efectes de l'aldosterona com la fosforilació de l'ERK1/2, la síntesi d'ADN, o l'expressió gènica de l'ACE en diferents tipus cel·lulars (Gekle *et al.*, 2001; McEaney *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2005).

4. VASOPRESSINA

La vasopressina, coneguda també com a hormona antidiürètica, és un nanopèptid que es sintetitza als nuclis neuronals supraòptic i paraventricular de l'hipotàlem, s'emmagatzema a la glàndula pituïtària, i posteriorment, és alliberada a la circulació per exocitosi. La producció de vasopressina s'activa quan hi ha una davallada del volum sanguini, un increment de l'osmolaritat plasmàtica i/o de Na^+ i una disminució de la perfusió renal (Kam *et al.*, 2004). La seva funció principal és regular el contingut d'aigua i l'osmolaritat plasmàtica.

Els estímuls osmòtics com canvis en l'osmolaritat plasmàtica regulen la secreció de la vasopressina a través d'osmoreceptors. D'altra banda, els estímuls no osmòtics com alteracions de la pressió arterial i del volum sanguini es detecten a través de mecanoreceptors i indueixen la secreció de la vasopressina (Kalra *et al.*, 2001).

Un increment de la concentració de la vasopressina estimula els seus receptors que indueixen la reabsorció d'aigua i provoquen vasoconstricció. La secreció de la vasopressina pot ser estimulada per substàncies com és el cas de l'angiotensina II i la norepinefrina (Yamamoto *et al.*, 1991; Rossi, 1993).

4.1 RECEPTORS DE LA VASOPRESSINA

La vasopressina actua sobre les cèl·lules diana a través dels receptors de superfície. Existeixen dos tipus de receptors de la vasopressina: el de tipus 1 (V_1), que es subdivideix en V_{1a} i V_{1b} ; i els tipus 2 (V_2). Aquests receptors s'uneixen a la proteïna G i es caracteritzen per tenir tres segments extracel·lulars i tres segments intracel·lulars (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

L'any 2006, Rabinstein va descriure que els receptors de tipus V_{1a} es troben a diferents teixits: al fetge, al múscul llis i a estructures del sistema límbic. Aquests receptors estan implicats en les accions centrals, a més, del control de la pressió arterial que dona lloc a la vasoconstricció. D'altra banda, els receptors de tipus V_{1b} són responsables de l'estimulació de l'hormona adrenocorticotròpica (Sugimoto *et al.*, 1994). L'estimulació d'aquests receptors produeix una activació de la via PI3K/AKT que disminueix el Ca^{2+} citosòlic (Carmichael i Kumar, 1994). En el sistema cardíac, els receptors tipus V_{1b} estan implicats en la secreció del glucagó i promouen la proliferació cel·lular (Folny *et al.*, 2003).

L'altre grup de receptors, els V_2 , es troben a les cèl·lules endotelials, als ronyons i a la nansa de Henle (Nielsen *et al.*, 1999; Sands *et al.*, 1987 i Bernat *et al.*, 1997). La unió de la vasopressina als receptors V_2 de la membrana basolateral dels tubs renals col·lectors produeix un increment intracel·lular de l'AMPc que estimula l'activitat de l'adenilat ciclase a través de les proteïnes G. Aquests receptors són els responsables de l'acció antidiürètica de la vasopressina i ho aconsegueixen mitjançant la modulació de les AQP2. La regulació de l'AQP2 es pot produir per un control intracel·lular del *trafficking* d'AQP2 entre vesícules intracel·lulars i la membrana plasmàtica apical (Nielsen *et al.*, 1995), o bé, per un efecte transcripcional tal com s'ha observat en rates a les quals se les ha restringit l'aigua durant 24 h (Saito *et al.*, 1997) on l'abundància de l'expressió de l'mRNA d'AQP2 i proteïna es veuen incrementades.

Els efectes de la vasopressina poden ser inhibits per l'administració d'antagonistes selectius per un dels receptors o mitjançant antagonistes no selectius. El *manning compound* ($(d(CH_2)_5, Tyr(Me)^2, Arg^8)$ -Vasopressina) és un antagonista selectiu del receptor tipus V_1 (László *et al.*, 1991). En el cas dels antagonistes dels receptors V_2 , es poden diferenciar dos grans grups, els que tenen estructura peptídica i els d'estructura no peptídica. Els antagonistes peptídics es caracteritzen pels seus efectes antidiürètics, amb efectes molt variables segons l'espècie. Els antagonistes no peptídics es van sintetitzar a partir dels anys 1990, amb un avantatge clau, que molts d'ells poden ser administrats per via oral. Un dels primers que es va començar a estudiar i a utilitzar va ser el tolvaptan, també conegut com l'OPC-41061, que és un antagonista selectiu molt potent dels receptors V_2 (Yamamura *et al.*, 1998).

4.2 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A RONYÓ

L'acció més important de la vasopressina és el seu efecte antidiurètic al ronyó, on incrementa la permeabilitat dels conductes col·lectors i facilita l'entrada d'aigua. Aquest moviment d'aigua és independent de la captació de soluts que desencadena un increment de l'osmolalitat urinària i una disminució de l'osmolalitat plasmàtica. L'orina que es forma té un menor volum i és més concentrada. Aquest increment en la permeabilitat és mediat per l'estimulació de la síntesi de l'mRNA de les AQP-2 i la regulació de la inserció de la proteïna a la membrana luminal mitjançant l'exocitosi (Fushimi *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1997).

Al ronyó, la vasopressina estimula la reabsorció de Na^+ al tub col·lector (Schafer i Hawk, 1992), on també té efectes sinèrgics amb l'aldosterona (Hawk *et al.*, 1996). És interessant destacar que al ronyó la vasopressina és capaç, per si sola, d'incrementar l'expressió apical de l'ENaC (Machida *et al.*, 2003) que és una funció típica de l'aldosterona. En rates congènitament deficientes en vasopressina, s'ha observat que l'aldosterona disminueix l'expressió apical de AQP2 al tub col·lector del ronyó (Nielsen *et al.*, 2006). Aquestes observacions indiquen que ambdues hormones poden actuar de forma sinèrgica, ja que comparteixen certes funcions en teixits diana comuns. Rates amb una concentració elevada de vasopressina presenten un increment de la proliferació de les cèl·lules tubulars del ronyó les quals expressen els receptors V_2 (Alonso *et al.*, 2009). Tahara *et al.*, (2008b), van veure que l'administració de la vasopressina *in vitro* sobre cèl·lules mesangials de ronyó incrementava la producció de col·lagen IV a través de la inducció de la síntesi de TGF β . Aquests efectes van ser revertits per l'administració d'un antagonista selectiu del receptor V_{1a} . La vasopressina té un paper important en la progressió de la glomerulosclerosi en la nefropatia diabètica on l'administració d'antagonistes selectius del receptor V_{1a} pot ser beneficiós per prevenir el desenvolupament i induir una regressió de l'expansió mesangial en la nefropatia diabètica.

4.3 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A COR

La hipertròfia cardíaca és un procés en el que intervenen variables hemodinàmiques i estímuls neuronals. La vasopressina està implicada en la fisiopatologia de la hipertròfia cardíaca o la fallada cardíaca, en les que els pacients que ho pateixen tenen la concentració de vasopressina incrementada (Kawano *et al.*, 1997) i sovint està associat a una hiponatrèmia (Goldsmith i

Gheorghiadu, 2005). Es considera que l'acció de la vasopressina en el desenvolupament de la hipertrofia és similar a un factor de creixement (Tahara *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000). En estudis posteriors realitzats *in vitro*, s'ha vist que la vasopressina estimula la proliferació cel·lular de fibroblasts cardíacs de rates neonatals (Zhao *et al.*, 2003), joves (Yang *et al.*, 2003) i adults (He *et al.*, 2008a, 2008b; Yan-Ping *et al.*, 2008). Aquest efecte sobre la proliferació de fibroblasts cardíacs és atenuat quan s'administra els antagonistes del receptor V₁ però no amb els antagonistes dels receptors V₂.

4.4 EFECTES DE LA VASOPRESSINA A CÒLON

Al còlon es produeix el pas d'aigua a través de l'epiteli per les vies paracel·lular i transcel·lular. S'ha vist que la vasopressina també regula els mecanismes d'homeòstasi electrolítica i hídrica al còlon. A la membrana apical de colonòcits humans (Mobasher *et al.*, 2005) com de colonòcits de rata (Gallardo *et al.*, 2001) s'ha vist que la vasopressina incrementa l'expressió AQP2 i estimula l'absorció H₂O. És important destacar que, tot i que l'aldosterona i la vasopressina estan relacionades en alguns aspectes, no es coneix amb precisió el grau i el tipus d'interaccions que es produeixen al còlon. Així, les rates amb hiperaldosteronisme, ja sigui induït per una dieta LS o bé per infusió d'aldosterona, tenen incrementada la concentració plasmàtica de vasopressina (Fukushima *et al.*, 2005). A més, la vasopressina potencia algunes accions mediatas per l'aldosterona, com la producció de prostasina, una serin-transferasa que es creu que té un paper crucial en el transport de Na⁺ (Fukushima *et al.*, 2004), i de l'11- β -HSD2, que és l'enzim que transforma els glucocorticoids en metabòlits amb molt poca afinitat pels receptors de mineralcorticoids (Fukushima *et al.*, 2005). Cristià *et al.*, (2007) van veure que la vasopressina formava una acumulació de Na⁺ al voltant de la cripta i observaven que hi havia una davallada de la permeabilitat capil·lar al còlon. A més, van observar un engruiximent dels miofibroblasts associat amb un increment de l'expressió de l' α -SMA. Aquests efectes van ser revertits per l'administració dels corresponents inhibidors.

4.5 RECEPTOR DEL FACTOR DE CREIXEMENT DERIVAT DE PLAQUETES (PDGFR)

El PDGF és una glicoproteïna dimèrica d'uns 30 kDa, que està formada per dues cadenes polipeptídiques que s'uneixen entre elles per ponts disulfur, en diferents combinacions: poden ser dues cadenes A (PDGFA), dues cadenes B (PDGFB) o bé una de cada (PDGF-AB). En els darrers anys s'han descrit altres tipus de PDGF en que les dues cadenes són C (PDGF-CC) o les

dues cadenes són D (PDGF-DD). El PDGF és expressat per diferents tipus cel·lulars com les plaquetes, els macròfags, les cèl·lules de múscul llis vascular, les cèl·lules endotelials o fibroblasts. Les diferents isoformes del PDGF produeixen l'activació de dos receptors de tipus tirosina quinasa, el PDGFR- α i el PDGFR- β . El PDGFR- α reconeix les cadenes A, B i C amb alta afinitat mentre que el PDGFR- β tant sols les cadenes B i D (Fura i Uramoto, 2003). Ambdós receptors participen en vies de senyalització cel·lular, i poden activar la via Ras/Raf/MAPK i/o la via PI3K/AKT (Tung *et al.*, 2010; Descorbeth i Anand-Srivastava, 2010). Es generen respostes cel·lulars diferents en funció de la via que s'activi, i inclouen la proliferació cel·lular, la migració i supervivència, la quimiotaxi i la prevenció de l'apoptosi (Alvarez *et al.*, 2006; Andrae *et al.*, 2008). El PDGF està altament regulat per mecanismes de control negatiu, com per exemple la unió del PDGFR i el seu lligand indueix l'endocitosis del receptor, la internalització i finalitza amb la degradació lisosomal dels receptors. L'increment de l'activitat del receptor del PDGFR està relacionada amb diferents condicions patològiques com el càncer, malalties vasculares (Raines, 2003) i diferents estat fibròtics (Bonner, 2004).

Els PDGFs i els seus receptors participen en diferents tipus de càncers com el de pulmó, el renal, leucèmies i glioblastomes (Oseini i Roberts, 2009). També hi ha evidència del paper del PDGF en els desordres vasculares com l'aterosclerosi i la hipertensió pulmonar (Hansson, 2005). En aquestes patologies, la senyalització paracrina del PDGF és a través del PDGFR β . En el cas de l'aterosclerosi s'ha vist que es produeix una resposta inflamatòria a les artèries que fa que es produeixi una acumulació de cèl·lules i de la matriu extracel·lular a l'espai intimal. A nivell pulmonar, el PDGF desencadena la proliferació cel·lular que està relacionat amb l'increment de la pressió arterial que pot desencadenar amb l'atròfia del ventricle dret i la mort. En estats fibròtics de ronyó, pell, fetge, intestí, cor, pell i teixit adipós s'han vist involucrats els PDGF que produeixen un increment de la proliferació cel·lular, de col·lagen i altres proteïnes de la matriu que fan que es produeixi una pèrdua de la funcionalitat dels òrgans. En aquest cas de fibrosis estan implicats els dos tipus de receptors.

II. PLANTEJAMENTS I OBJECTIUS

L'adaptació a una dieta amb baix contingut en Na^+ dóna lloc a canvis estructurals i funcionals a les criptes del còlon distal. Aquesta resposta comporta una reducció de la permeabilitat de la mucosa degut a canvis en les propietats de les unions entre les cèl·lules epitelials del còlon i de la beina pericriptal formada per miofibroblasts. L'objectiu d'aquesta tesi és *aprofundir en els mecanismes implicats en la regulació de les funcions de les criptes del còlon durant l'adaptació a una dieta amb baix contingut en Na^+ . Per poder dur-ho a terme s'ha caracteritzat dues línies cel·lulars representatives dels tipus cel·lulars implicats en els efectes que anteriorment s'havien observat in vivo (Cristià et al., 2005; Moretó et al., 2005).*

El còlon distal, juntament amb el ronyó, participa en el manteniment de l'homeòstasi hídrica i electrolítica de l'organisme. Entre els principals mecanismes reguladors d'aquesta condició, destaquen el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) i la vasopressina. L'aldosterona ha estat considerada com l'hormona clau que regula l'homeòstasi de Na^+ i, per tant, del principal ió determinant de l'osmolalitat del plasma i del volum extracel·lular. Diversos estudis realitzats *in vivo*, demostren que l'absorció de Na^+ al còlon distal depèn de la permeabilitat epitelial, del seu transport i del desenvolupament de la beina de miofibroblasts de la zona pericriptal (Naftalin i Pedley, 1999). En estudis posteriors s'ha comprovat que l'aldosterona, independentment del contingut de Na^+ a la dieta i de la concentració d'angiotensina II, és la principal hormona estimuladora del creixement dels miofibroblasts. A més, aquesta hormona augmenta l'expressió de les proteïnes del complex d'unió i, per tant, disminueix la permeabilitat paracel·lular de l'epiteli i impedeix el retorn dels ions Na^+ altra vegada cap a la llum intestinal (Moretó et al., 2005; Cristià et al., 2005). Com a resultat, s'afavoreix tant l'absorció d'aigua com d'ions en contra de grans gradients osmòtics. Per tant, ens hem proposat *estudiar els efectes de l'aldosterona sobre colonòcits de la línia T84 i miofibroblasts de la línia CCD-18Co i aprofundir en la comunicació entre les dues línies cel·lulars*. Es pretén veure quins són els efectes de l'aldosterona en cada una de les línies cel·lulars i, posteriorment, veure els canvis que comporta la incubació del medi que ha estat amb contacte amb els miofibroblasts en els colonòcits.

Al còlon té lloc el pas d'aigua a través de l'epiteli per les vies paracel·lular i transcel·lular. En estudis que s'han realitzat amb colonòcits de rata com en humans s'ha vist que la vasopressina estimula l'absorció d'aigua regulant l'expressió AQP-2. Cristià et al., (2007) van veure que rates amb elevada concentració sanguínia de vasopressina presentaven una acumulació de Na^+

al voltant de la cripta i un engruiximent de la beina de miofibroblasts. Alhora, també van veure que hi havia una davallada de la permeabilitat capil·lar. El darrer objectiu d'aquesta tesi és ***analitzar els efectes de la vasopressina sobre les cèl·lules T84 i les cèl·lules CCD-18Co i profunditzar en la comunicació entre T84 i CCD-18Co***. De manera que, s'estudiarà el paper de la vasopressina sobre cadascuna de les línies cel·lulars i s'analitzaran els mecanismes reguladors implicats.

El coneixement dels mecanismes reguladors d'aldosterona i vasopressina en el còlon tenen interès fisiològic i fisiopatològic. En el primer cas, perquè formen part dels mecanismes homeostàtics generals, i des del punt de vista fisiopatològic, perquè aquests mecanismes poden ser similars als que provoquen fibrosis en algunes patologies cardíques i renals.