

## IV. SEX HORMONE-BINDING GLOBULIN (SHBG) / ANDROGEN-BINDING PROTEIN (ABP)

### IV.1. Introducció Històrica

Durant molts anys s'havia especulat sobre l'existència de proteïnes circulants que unien esteroids sexuals, finalment, cap a la dècada dels 60, es van descriure unes proteïnes de la fracció  $\beta$ -globulina del plasma humà que unien específicament andrògens i estrògens (Mercier, C. et al. 1966; Rosner, W. et al. 1966; Pearlman, W.H. and Crepy, O. 1967; Rosner, W. and Deakins, S.M. 1968; Kato, T. and Horton, R. 1968; Vermuelen, A. and Verdonck, L. 1968). En estudis posteriors es va poder veure que les dues activitats eren característiques de la mateixa proteïna, i que unia DHT, T i E amb alta afinitat (Murphy, B.E.P. 1968; Stenoo, O. et al. 1968). Per comparació amb la CBG, que havia estat descrita prèviament, es va deduir que aquesta nova proteïna regulava la disponibilitat d'esteroids sexuals lliures per part de les cèl.lules. Es va evidenciar que els nivells d'andrògens units a la citada proteïna variaven durant el cicle menstrual de la dona, i que incrementaven de manera dramàtica durant l'embaràs (Pearlman, W.H. et al. 1967). En aquesta època, aquesta proteïna que uneix esteroids sexuals era anomenada *steroid-binding  $\beta$ -globulin* (SB G), o bé, *sex steroid-binding protein* (SBP), o bé, *sex hormone-binding globulin* (SHBG). Posteriorment es va veure que aquesta proteïna era produïda i secretada per hepatòcits transformats en cultiu (Khan, M.S. et al. 1981). La prova de que era realment produïda pel fetge no va venir fins més tard amb els avenços de les tècniques de la biologia molecular, que van detectar la presència del seu mRNA en hepatòcits (Gershagen, S. et al. 1987; Gershagen, S. et al. 1989; Que, B.G. and Petra, P.H. 1987; Hammond, G.L. et al. 1987; Hammond, G.L. et al. 1989).

Per una altra banda, durant la dècada dels 70, endocrinòlegs de diferents laboratoris que estudiaven el receptor d'andrògens, van detectar nivells alts d'una activitat semblant a la del receptor d'andrògens al testicle i a l'epidídim de la rata (Ritzén, E.M. et al. 1971; Blanquier, J.A. 1971; Hanson, V. 1972; Vernon, R.G. et al. 1972; Vernon, R.G. et al. 1974; Danzo, B.J. et al. 1973; Hanson, V. et al. 1973). En un primer moment, es va creure que era el mateix receptor d'andrògens, però quan es van estudiar les propietats de la proteïna per unir els esteroids, ràpidament es va veure que eren proteïnes diferents, ja que a més a més tenien tamanys diferents. Es va descobrir que la proteïna era sintetitzada al testicle, secretada i transportada cap a l'epidídim (French, F.S. and Ritzén, E.M. 1973; Danzo, B.J.

et al. 1974; Danzo, B.J. et al. 1977). Aquesta proteïna es va anomenar *androgen-binding protein* (ABP) i es va demostrar que tenia la funció d'incrementar els nivells d'andrògens, tant en el túbul seminífer com, a l'epidídim (Tindall, D.J. et al. 1974; Hanson, V. et al. 1975.a; Hanson, V. et al. 1975.b; Hanson, V. et al. 1976). Més tard es va evidenciar que l'ABP era un producte de secreció de les cèl.lules de Sertoli de l'epiteli del túbul seminífer (Tindall, D.J. et al. 1974; Fritz, I.B. et al. 1974; Fritz, I.B. et al. 1976; Steinberger, A. et al. 1975; Hagenäs, L. et al. 1975; Kierszenbaum, A.L. et al. 1980).

A mitjans de la dècada dels 70 nombrosos estudis van posar de manifest que les dues proteïnes estaven molt relacionades. La metodologia desenvolupada durant aquests anys va permetre observar que les dues proteïnes tenien característiques físico-químiques molt semblants (Musto, N. et al. 1980; Feldman, L. et al. 1981; Taylor, C.A. et al. 1980). Estudis immunoquímics i estructurals amb la SHBG i l'ABP humana i de conill, van determinar que les dues proteïnes eren indiferenciables des del punt de vista químic (Cheng, S.L. et al. 1984; Cheng, C.Y. et al. 1984; Cheng, C.Y. et al. 1985; Kotite, N.J. et al. 1986). La comparació de les seqüències de la SHBG/ABP de rata i la SHBG/ABP humana va aportar més evidències de que les dues proteïnes eren la mateixa (Petra, P.H. et al. 1986). Les dues proteïnes tenien una estructura primària similar, amb un 68% d'homologia en els 373 residus. Finalment, l'última prova de l'identitat entre les dues proteïnes, va ser aportada pel clonatge dels gens de la rata i de l'humà, així com dels cDNA de SHBG de fetge fetal de rata, i dels cDNA de SHBG/ABP humana (Joseph, D.R. et al. 1988; Hammond, G.L. et al. 1987; Hammond, G.L. et al. 1989; Gershagen, S. et al. 1987; Gershagen, S. et al. 1989; Sullivan, P.M. et al. 1991). Per tant, la SHBG/ABP i la SHBG són codificades pel mateix gen i tenen la mateixa seqüència aminoacídica i es considera que tenen les mateixes propietats funcionals.

## **IV.2. Distribució a les espècies**

La SHBG/ABP ha estat trobada al plasma de moltes espècies, incloent humans, primats, i d'altres mamífers. En un primer moment es va observar que algunes espècies de mamífers, incloent rates, ratolins i porcs no tenien SHBG/ABP plasmàtica (Corvol, P. and Bardin, C.W. 1973; Wenn, R.V. et al. 1977; Stupnicki, R. and Bartke, A. 1976), tot i que les rates en època fetal tenien nivells circulants de SHBG/ABP (Carreau, S. 1986; Gunsalus, G.L. et al. 1984; Becker, R.R. and Iles, D.J. 1985). Es pensa que l'absència en algunes espècies pot ser un problema de procediment i degut a que tenen nivells circulants molts baixos.

Pel que fa a la SHBG/ABP a testicle i a epidídim, ha esta trobada a moltes de les espècies examinades, tot i que les més caracteritzades han estat la de rata, la de conill i la humana (Westphal, U. 1986). Es va pensar que el ratolí i el porc no expressaven la SHBG/ABP, ja que no es va detectar activitat d'unir esteroids als seus epidídims (Mather, J.P. et al. 1983; Bardin, C.W. et al. 1988). Es va detectar posteriorment al ratolí per tècniques immunològiques i es va aconseguir seqüenciar el cDNA de la SHBG/ABP murina (Wang, Y.M. et al. 1989). La localització immunohistoquímica de la SHBG/ABP, tant en el testicle, com a l'epidídim és exactament igual a la de la rata. L'absència de la SHBG/ABP en el porc es creu que pot ser deguda a que s'estudiaven porcs immadurs, i l'expressió de la SHBG/ABP podria ser més tardana, o bé que els seus nivells són inferiors als del ratolí.

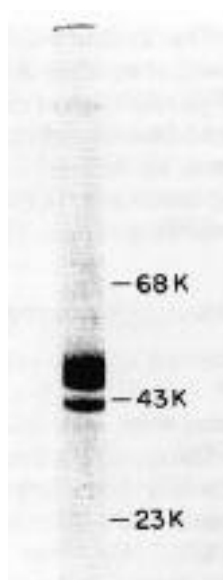
L'activitat de *binding* a plasma i testicle han estat descrites en espècies tant allunyades, com els peixos teleostis i els taurons (Mak, P. and Callard, G.V. 1987; Foucher, J.L. and Le Gac, F. 1989; Foucher, J.L. et al. 1991). Les propietats d'aquestes proteïnes són molt semblants a les de la SHBG/ABP dels mamífers, i les propietats fisicoquímiques semblen estar relacionades. La seqüència aminoacídica de les proteïnes dels peixos i dels taurons no han estat identificades, per tant, no es pot saber si aquestes proteïnes estan estructuralment relacionades amb la SHBG/ABP dels mamífers. La SHBG/ABP de la carpa ha estat purificada del plasma (Chang, C.F. and Lee, Y.H. 1992), i el seu pes molecular ha estat estimat en 194 KDa, tamany molt diferent de la SHBG/ABP dels mamífers.

### **IV.3. La purificació i l'estructura**

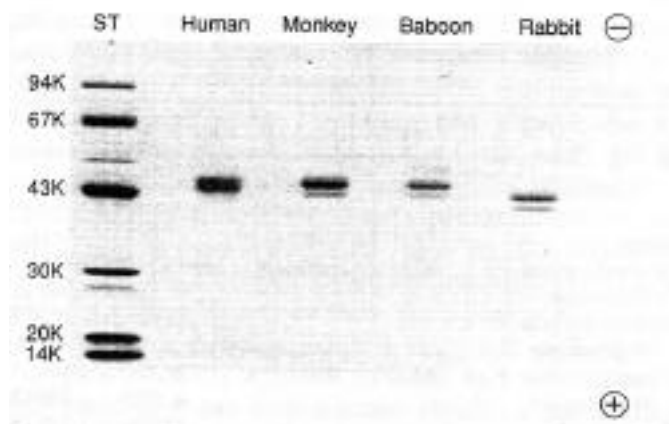
El desenvolupament de les columnes d'afinitat per esteroids va permetre la purificació de la SHBG/ABP de diferents espècies (Westphal, U. 1986). Així, es va purificar la SHBG/ABP del testicle humà (Cheng, C.Y. et al. 1985), de rata (Musto, N. et al. 1980; Feldman, L. et al. 1981; Kovaks, W.J. et al. 1988) i de conill (Cheng, C.Y. et al. 1985). També es va purificar a partir del plasma humà i de conill (Mickelson, K.E. and Petra, P.H. 1978; Mercier-Bodard, C. et al. 1989; Petra, P.H. and Lewis, J. 1980; Fernlund, P. and Laurell, C.B. 1981; Cheng, S.L. et al. 1984; Suzuki, Y. and Sinohara, H. 1984; Khan, M.S. et al. 1985; Hammond, G.L. et al. 1986; Griffin, P.R. et al. 1989). S'ha purificat en d'altres espècies com el mono, el gos, la vaca, etc.

Els estudis posteriors van permetre veure que la SHBG/ABP era heterogènia en condicions de desnaturalització i contenia components pesats i lleugers. La proporció entre

els components pesats i lleugers oscil·la entre 3:1 i 10:1 (Figura 16 i Figura 17). Aquesta heterogeneïtat ha estat discutida durant molt de temps i es creu que podria ser deguda a petites diferències en l'estructura primària o bé a diferències en el contingut de glúcids (Larrea, P. et al. 1981.a; Larrea, P. et al. 1981.b). Posteriorment, es va veure que les diferències entre la SHBG/ABP de rata i la humana eren degudes a la glicosilació (Danzo, B.J. and Bell, B.W. 1988; Danzo, B.J. et al. 1989.a; Danzo, B.J. et al. 1989.b), ja que si es desglicosaven donaven lloc a un únic pes molecular. Els dos components de 43 i 48 KDa de la rata es transformaven en una única banda de 40 KDa després de desglicosilar, mentre que a l'humà, els protòmers de 48 i 52 KDa donaven lloc a una única banda de 42 KDa. La desglicosilació no sembla afectar a l'afinitat per la DHT. La diferència de tamany entre la SHBG/ABP de l'humà i de la rata és possiblement deguda a la presència d'una O-glicosilació en el residu 7, que està absent en la rata.



**Figura 16.** Proteïna SHBG/ABP purificada i tenyida amb comassseau. (Joseph, D.R. 1994)



**Figura 17.** Determinació de la heterogeneïtat i del pes molecular de les subunitats de diferents espècies de proteïna SHBG/ABP. (Joseph, D.R. 1994)

Els estudis de purificació també han servit per a determinar el tamany de la SHBG/ABP nativa, que és de 85 a 100 KDa (Petra, P.H. et al. 1983; Petra, P.H. et al. 1986.c; Suzuki, Y. and Sinohara, H. 1984). En un principi es creia que la proteïna en estat monomèric podia unir esteroides, però posteriorment es va demostrar que en presència de clorur de guanidina els monòmers no tenien afinitat pels esteroides, tot i que no es descartava que els monòmers nadius poguessin unir-ne. En l'actualitat és acceptat que la

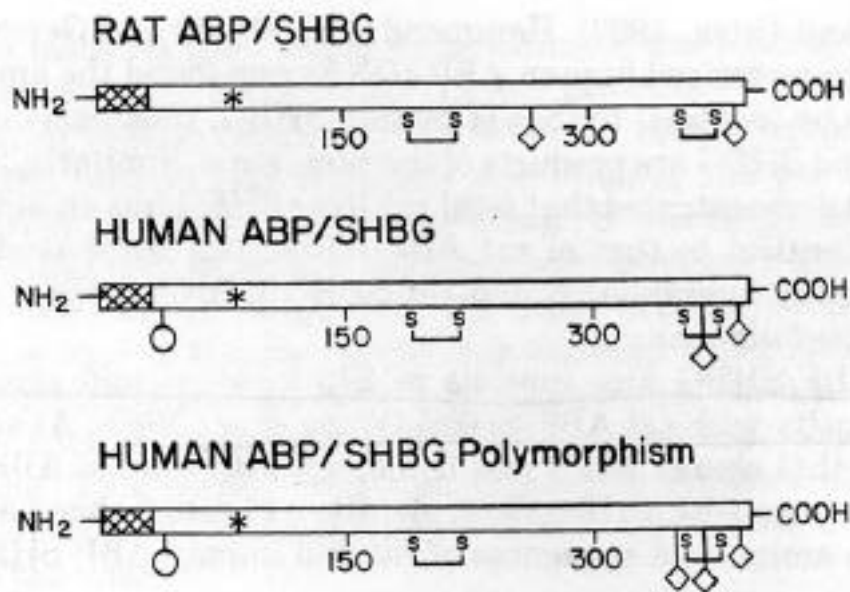
SHBG/ABP forma dímers, i que un mol de monòmer de SHBG/ABP és capaç d'unir un mol d'esteroids.

#### IV.4. El clonatge dels cDNA

El cDNA de la SHBG/ABP de l'humà, de la rata, del conill i del ratolí va ser aïllats i seqüenciats a finals de la dècada dels 80 (Joseph, D.R. et al. 1985; Joseph, D.R. et al. 1987; Gershagen, S. et al. 1987.b; Hammond, G.L. et al. 1987; Hammond, G.L. et al. 1989; Que, B.G. and Petra, P.H. 1987; Reventós, J. et al. 1988; Wang, Y.M. et al. 1989). Aquests estudis van revelar que la SHBG/ABP de rata és sintetitzada a partir d'un mRNA de 1.7 Kb, donant lloc a un precursor de 403 residus aminoacídics (44.5 KDa), que després d'eliminar el pèptid senyal donarà lloc a una subunitat de 373 residus aminoacídics (Joseph, D.R. et al. 1987; Reventós, J. et al. 1988). A partir d'un cDNA parcial humà es va poder obtenir tota la seqüència de residus aminoacídics de la proteïna madura, és a dir, 373 residus que originen una subunitat de 40.5 KDa (Hammond, G.L. et al. 1987). Posteriorment, i a partir de la seqüència gènica, es va poder obtenir la seqüència protèica corresponent al pèptid senyal (Hammond, G.L. et al. 1989). Aquest pèptid senyal humà és lleugerament més petit que el de la rata. Els tres cDNA humans obtinguts revelen l'existència d'una regió 3' no traduïda i molt curta, que conté una senyal de poliadenilació poc comuna (ATTAAG), que sembla ser part del codó de terminació traduccional (TAA). Un dels tres cDNAs va ser aïllat, a partir d'una llibreria de fetge fetal suggerint que, a l'igual que la SHBG/ABP de rata, la SHBG/ABP humana també s'expressa al fetge fetal (Que, B.G. and Petra, P.H. 1987).

La SHBG/ABP de ratolí també consisteix en 373 residus i té un 89% d'identitat amb la SHBG/ABP de rata (Wang, Y.M. et al. 1989). Per altra banda, la SHBG/ABP de rata té un 68% d'homologia amb la SHBG/ABP humana (Figura 18). Hi ha diferents regions molt conservades entre les proteïnes de rata i humanes, especialment entre els residus 33-128, regió que correspondria a la d'unió a un hipotètic receptor. També estan conservats els 4 residus Cys (residus 164, 188, 333 i 361) que formen dos ponts disulfur (Walsh, K.A. et al. 1986). Un lloc potencial de N-glicosilació al residu 367 és a les dues proteïnes (Figura 19). A més a més, cadascuna d'elles conté un lloc únic de N-glicosilació, la SHBG/ABP humana en el residu 351 i la de rata al residu 244. La SHBG/ABP humana també té un lloc de O-glicosilació al residu 7 que no es troba a la seqüència de rata (Figura 19). Una de les regions més diferents és la que està entre els residus 132-138 i, que és a prop del lloc d'unió als esteroids. Totes les propietats que presenta la SHBG/ABP de rata estan

conservades a la SHBG/ABP de ratolí. La SHBG/ABP de conill té una seqüència més semblant a la humana que a la de rata o ratolí (Griffin, P.R. et al. 1989). El conill té uns nivells de SHBG/ABP circulants semblants als de l'humà, i ambdues proteïnes podrien tenir un paper fisiològic semblant. L'anàlisi de la proteïna de SHBG/ABP de conill desnaturalitzada revela que té un tamany més petit que la proteïna dels primats (Figura 17). D'acord amb això, s'ha vist que la seqüència aminoacídica de la SHBG/ABP de conills no té els 6 residus aminoacídics al N terminal que estan presents al ratolí, a la rata i a l'humà (Griffin, P.R. et al. 1989). La SHBG/ABP de conill té els mateixos llocs potencials de N-glicosilació que la SHBG/ABP humana (Wang, Y.M. et al. 1989; Griffin, P.R. et al. 1989), però, a l'igual que la de rata, li falta el lloc de O-glicosilació del residu 7 (Griffin, P.R. et al. 1989).



**Figura 18.** Aliniament de les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes SHBG/ABP de rata i humana. Els residus idèntics estan marcats per un asterisc. (Joseph, D.R. 1994)

```

Rat-  LRRIDPIQSAQDGPAYKLSNGPQGEPTVLTIDLTKISKPSSSEFPHIWD- 50
    * * * * * A * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- LRPVLPYQSAHDPPAVHLSNGPQGEPIAVWTFDITKIKTKSSSEFVHIWD- 50

Rat-  PEGVIFYGDTNTEGDFNGLGRDQQLLEIQLEMLWRLTVGFGPRLNDGRW-100
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- PEGVIFYGDTNPKDQDFNGLGRDGRFKIQLENNWAQLTVGACPRLDDGRW-100

Rat-  HPVELEKMGDELLIATEGKFKMLCLRQVBSASLADHPQLSMRIALGGLLPT-150
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- HQVEVKMEGDSVLLLEVGEFVLRRLRQVSGPLTSEKHPIMRIALGGLLPPA-150

Rat-  SKLRFFLVFALDGCIEEDIMLGHQAQLSTSAKTSLEGNCDVDLQPLFFPP-200
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- SNLRFLPLVFALDGCIEEDSWLDKQAEISASAPTSLRSCDVESNFCIFLPP-200

Rat-  GTHAEFSLQDIEPQPHIDPWTFSLELGFMLVDGAGRLITLGTGTSSWLT-250
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- GTCAEFNLRDIPQPHAEFWAPSLDLGLNQAAGSGHLLALGTFENFPMLEL-250

Rat-  NLQDQTVVLSSEAEPEKIALPLAVGLPLQLKLDVFEVALSQGPKMEVLS-300
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- NLQDQKVVLSGGSGPGLDPLVVLGLPLQLKLSMSRVVLSQGSKMEALALP-300

Rat-  LLRLASLWRLNSHPQGHLSLGLALPGEDESSAFCLESDENVQQRLDIDNAL-350
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- PLGLAPLLNLWAKPQGRFLGALPGEDESTSFCLNGENWAQQRLDVDQAL-350

Rat-  SRSQDIWTHSCPQSPSNDHTSH-373
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Human- NRSHEIWTHSCPQSPGNGIDASH-373

```

**Figura 19.** Diagrama dels precursors per a la SHBG/ABP de rata i humana; on s'observa la localització del pèptid senyal, dels dos ponts disulfur i dels llocs de glicosilació. (Joseph, D.R. 1994)

#### IV.5. La glicosilació i les propietats químiques

Els experiments de mutagènesi demostren que els dos llocs potencials de N-glicosilació són glicosilats a la SHBG/ABP de rata (Joseph, D.R. et al. 1992). Es van fer proteïnes mutants de SHBG/ABP de rata que eliminaven un o els dos llocs potencials d'asparragina (Asn) lligats a glicosilació. Així, una substitució del residu Asn lligat a glicosilació per un residu isoleucina (Ile) ocasionava un canvi de la mobilitat de la SHBG/ABP, consistent en la pèrdua dels oligosacàrids. L'eliminació dels dos llocs de glicosilació en Asn, dona lloc a una proteïna d'un tamany de 39 KDa. Aquests resultats confirmen que la heterogeneïtat de pes molecular de la SHBG/ABP és deguda a la diferent glicosilació, de manera que les dues bandes que s'observen en els gels de SDS-PAGE representen els dos monòmers de SHBG/ABP que contindrien una o dues glicosilacions en N. Tant la SHBG/ABP normal com els tres possibles mutants per llocs de glicosilació tenen la mateixa afinitat per la DHT. Quan es van fer servir tècniques de mutagènesi, en les que es varen canviar les Asn per glutamina (Gln), es va demostrar que els dos llocs

potencials de N-glicosilació a la proteïna humana estan glicosilats (Bocchinfuso, W.P. et al. 1992.b). També es va confirmar que el residu treonina (Thr) número 7 estava glicosilat en O. Els anàlisi de *Western Blot* amb les proteïnes recombinants van demostrar que l'heterogeneïtat de les subunitats era deguda a la diferent N-glicosilació dels dos llocs potencials, i que, en canvi, no eren deguts a l'eliminació del lloc de O-glicosilació. A l'igual que els mutants de rata, els mutants de la proteïna humana uneixen esteroids amb la mateixa afinitat. No hi ha evidències de que existeixin més modificacions posttraduccionals a part de la dels oligosacàrids.

Totes les seqüències de SHBG/ABP que han estat caracteritzades contenen els 4 residus Cys a les posicions 164, 188, 333 i 361. S'ha comprovat per la SHBG/ABP humana que aquests residus Cys formen ponts disulfur a la proteïna madura. La localització dels dos ponts disulfur va ser establerta per anàlisi pèptidics de SHBG/ABP reduïts (Walsh, K.A. et al. 1986). Els experiments de mutagènesi han demostrat la importància funcional d'aquests residus. La conversió de les Cys 188 o 333 en Ser a la SHBG/ABP de rata elimina la capacitat d'unir DHT i de ser secretada per cèl.lules COS. Cal destacar que els homòlegs de la SHBG/ABP, com poden ser la laminina o la proteïna S, conserven aquests residus Cys.

Una altra troballa interessant és la inusual composició aminoacídica. Per exemple, la SHBG/ABP de rata és molt hidrofòbica i està formada per un 20% de residus Leu (Feldman, M. et al. 1981). El significat d'aquesta hidrofobicitat es desconeix.

#### **IV.6. Els dominis funcionals**

La SHBG/ABP té tres dominis funcionals, un domini d'unió d'alta afinitat als esteroids, un domini que interactua amb un potencial receptor de membrana, i el domini involucrat en l'interacció de les dues subunitats.

Una propietat comuna de les proteïnes SHBG/ABP de totes les espècies és la seva capacitat per unir esteroids sexuals amb alta afinitat. Tot i que hi ha una variació considerable de l'especificitat entre les espècies, la majoria uneixen DHT, T i estradiol (E) amb gran afinitat, en el següent ordre:  $DHT > T > E$ . La unió d'altres esteroids biològicament actius té lloc amb una afinitat molt baixa, i és provable que no tingui una importància biològica. L'afinitat d'unió varia entre les espècies i la  $K_a$  per la DHT està entre  $10^9$  i  $10^{10}$  M. La T i l'E normalment s'uneixen amb menys afinitat, generalment un ordre de magnitud per sota respecte l'afinitat de la DHT. Una excepció és la SHBG/ABP de conill que uneix E amb una extremada baixa afinitat (Rosner, W. and Darmstadt, R.A.



1973; Danzo, B.J. and Eller, B.C. 1975). La diferència més gran entre la SHBG/ABP de rata i l'humana és la vida mitja del complex de DHT, que a la rata és de 5-6 minuts (Schmidt, W.N. et al. 1981) i de 30-60 minuts a l'humana (Hsu, A.F. and Troen, P. 1978; Namkung, P.C. et al. 1989) a 0° C. L'afinitat de la SHBG/ABP per la DHT i T és idèntica o lleugerament inferior a la que té l'hormona pel receptor d'andrògens (AR). La diferència està en que el complex AR-DHT és molt estable, i té una vida mitja de més de 24 hores. Una altra de les diferències és que la SHBG/ABP és incapaç d'unir alguns dels agonistes o antagonistes que uneix l'AR (Danzo, B.J. and Eller, B.C. 1975).

Mitjançant experiments d'afinitat amb marcatge radioactiu, diferents laboratoris han determinat que la regió important per la unió dels esteroids estava entre els residus 134 i 150. Concretament la metionina (Met) 139 de la SHBG/ABP humana era el lloc de fotoafinitat del marcatge per <sup>3</sup>H-T. Posteriorment van veure que era el mateix lloc en que interaccionava amb l'E (Grenot, C. et al. 1992). Han demostrat també que la lisina (Lys) 134 era important per aquesta interacció (Namkung, P.C. et al. 1990). De manera semblant s'ha identificat la regió entre els residus 141 i 150 de la SHBG/ABP de rata (Danzo, B.J. et al. 1991.a), així com altres regions que podrien estar implicades en la unió d'esteroids. Segons aquestes dades, part del domini de la unió a esteroids de la SHBG/ABP estaria localitzat en la butxaca hidrofòbica propera al C terminal (Hammond, G.L. et al. 1987; Petra, P.H. 1988).

Per estudis de mutagènesi s'han identificat altres residus importants per la unió a esteroids. S'ha comprovat que eliminant els primers 26 residus o més de l'extrem C terminal s'elimina la secreció de la proteïna i capacitat d'unir DHT. L'alteració de diferents aminoàcids entre els residus 54 i 333 provoca l'eliminació de la capacitat d'unir DHT en 9 dels 10 mutants fets, i en un d'ells, l'afinitat és molt baixa per la DHT. Tan sols un dels 10 mutants és secretat per les cèl.lules COS, tot i que no té la capacitat d'unir DHT.

Només un estudi ha estat convincent a l'hora d'identificar el domini de la unió a un hipotètic receptor de membrana de la SHBG/ABP. Mitjançant estudis de digestió amb tripsina de SHBG/ABP humana pura, s'han identificat 10 residus que competeixen amb SHBG/ABP marcada pel receptor de pròstata. Aquest pèptid de 10 aminoàcids correspon als residus 48-57 de la SHBG/ABP humana. S'han fet pèptids sintètics iguals a aquesta regió i s'ha vist que són capaços d'inhibir competitiu la unió de la SHBG/ABP al receptor. Aquests resultats demostren que aquesta seqüència representa com a mínim part del domini d'unió al receptor. Tenint en compte que la SHBG/ABP de rata comparteix un

68% de identitats amb la SHBG/ABP humana, aquest decàmer està altament conservat entre les dues espècies, destacant la seva importància funcional.

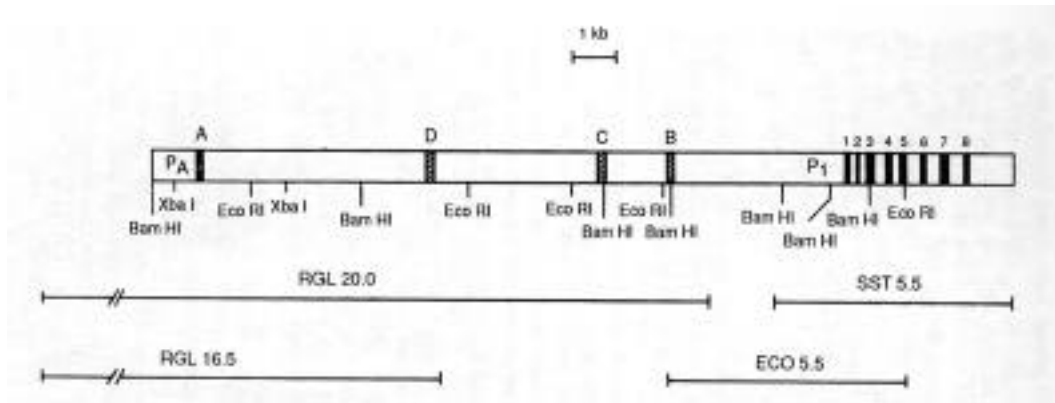
### IV.7. Les dades estructurals

El gen de la SHBG/ABP està localitzat en el cromosoma 17, en la regió p13-p12 del genoma humà (Berube, D. et al. 1990). Pel que fa a la rata es troba al cromosoma 10 i en el ratolí al 11, en regions cromosòmiques que guarden una homologia considerable amb la regió de la SHBG/ABP humana (Joseph, D.R. et al. 1991.a; Sullivan, P.M. et al. 1991).

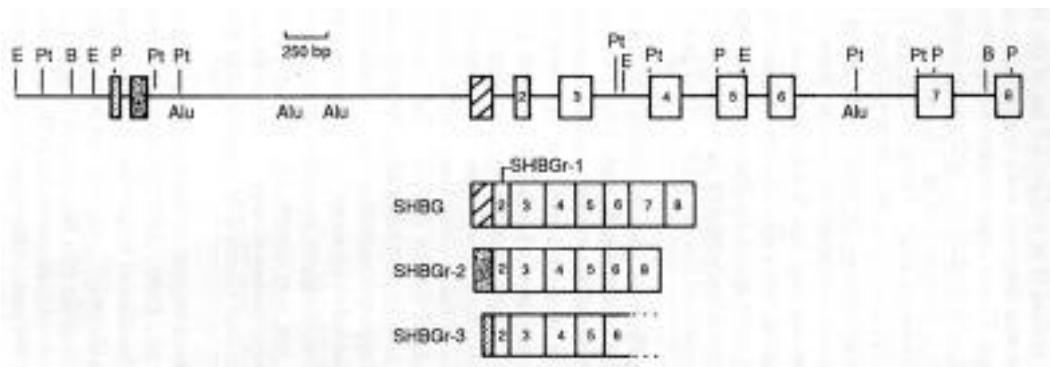
Tot i que s'han clonat i seqüenciat en diferents espècies el cDNA per SHBG/ABP, les bases de dades només contenen la seqüència genòmica completa de l'humà, la rata i el conill. L'organització estructural dels tres gens està altament conservada. La regió codificant de la SHBG/ABP humana té una extensió de 3.2 Kb, mentre que la de conill i la de rata té 3 Kb i 2.5 Kb respectivament. Aquesta regió codificant consta de 8 exons separats per petits introns. Als gens humà i de rata s'han trobat uns elements repetitius que no estan en el gen de conill. Específicament, dins del gen humà hi ha seqüències repetitives Alu, estan presents en la regió 5' flanquejant i a l'intró 6 (Hammond, G.L. et al. 1989; Ip, Y.C. 2000), regions que serien importants en les funcions de regulació (Joseph, D.R. 1994).

La regió 5' flanquejant de la SHBG/ABP humana, de conill o de rata no té una caixa TATA, ni una caixa CAAT o seqüència iniciadora (Ip, Y.C. 2000). Tot i així, la detecció de nivells alts d'expressió del mRNA de SHBG/ABP de rata al testicle del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, que només conté 1.5 Kb de la regió promotora, confirma l'existència d'un inici de transcripció en aquesta regió (Reventós, J. et al. 1993). Estudis recents en la línia cel.lular de Sertoli de ratolí MSC-1 han permès esbrinar l'existència d'un inici de transcripció majoritari a 36 parells de bases (bp) per sobre del primer residu Met, i un inici de transcripció minoritari a 179 bp de l'inici majoritari.

Els estudis sobre l'expressió gènica realitzats en aquesta última dècada han revelat una estructura gènica més complexa del gen SHBG/ABP. Tant en el genoma humà com de rata s'han identificat seqüències alternatives a l'exó 1. Aquestes seqüències estan localitzades 1.9 Kb més a munt del codó d'inici descrit abans en el cas del gen SHBG/ABP humà (Hammond, G.L. et al. 1989), i 15 Kb per sobre en el cas del gen SHBG/ABP de rata (Joseph, D.R. 1994) (Figura 20 i Figura 21). El corresponent promotor alternatiu va ser trobat adjacent al lloc dels exons alternatius.



**Figura 20.** Mapa estructural del gen SHBG/ABP de rata; on s'observa els exons de l'1 al 8 i els exons alternatius A, B, C i D. (Joseph, D.R. 1994)



**Figura 21.** Mapa de restricció parcial i organització del gen de la SHBG/ABP humana. Es poden trobar diferents *transcripts*. (Joseph, D.R. 1994)

La transcripció del gen SHBG/ABP dóna lloc a diferents RNA missatgers (mRNAs). A la rata, el primer *transcript* caracteritzat va ser de 1.7 Kb i contenia des de l'exó 1 fins a l'exó 8. Aquest *transcript* codifica per a 403 aminoàcids i dóna lloc a una proteïna precursora d'aproximadament 45 KDa. Aquesta proteïna és secretada i la trobem al plasma i al fluid seminal. La proteïna humana SHBG/ABP que es secretada està codificada per un *transcript* que conté els exons de l'1 al 8. Així mateix la longitud que medeix és de 1.6 Kb.

L'existència de mRNAs alternatius ha estat demostrada tant en teixits humans com de rata. Específicament, un dels tres cDNAs trobats al testicle és idèntic al cDNA trobat al fetge humà, però el seu extrem 5' és 116 pb més curt. Els altres dos *transcripts* trobats al testicle contenen a l'inici l'exó alternatiu i, mentre que un conté la resta d'exons, de l'exó 2

fins a l'exó 8, a l'altre li falta l'exó 7 (Hammond, G.L. et al. 1989). A la rata, s'han trobat diferents cDNAs que contenen l'exó alternatiu, i s'expressen a testicle, fetge i cervell (Joseph, D.R. 1994). S'han trobat dos cDNAs, un que conté l'exó alternatiu seguit de l'exó 2 fins a l'exó 8, i un altre que es la mateixa seqüència però que li falta l'exó 6 (Sullivan, P.M. et al. 1993). La seqüència resultant té l'extrem N-terminal modificat i no té el pèptid senyal. Quan aquest cDNA és expressat a cèl.lules COS, la proteïna no és secretada, i no està clar que uneixi esteroids. Tot i així, la regió que teòricament interaccionaria amb un hipotètic receptor de membrana és present a totes les formes. La funció de totes aquestes proteïnes alternatives testiculars és probablement diferent a la funció de la SHBG/ABP secretada, però el mecanisme d'interacció amb la membrana plasmàtica podria ser comú a totes les formes descrites (Sullivan, P.M. et al. 1993).

#### **IV.8. La SHBG/ABP transportadora d'esteroids sexuals**

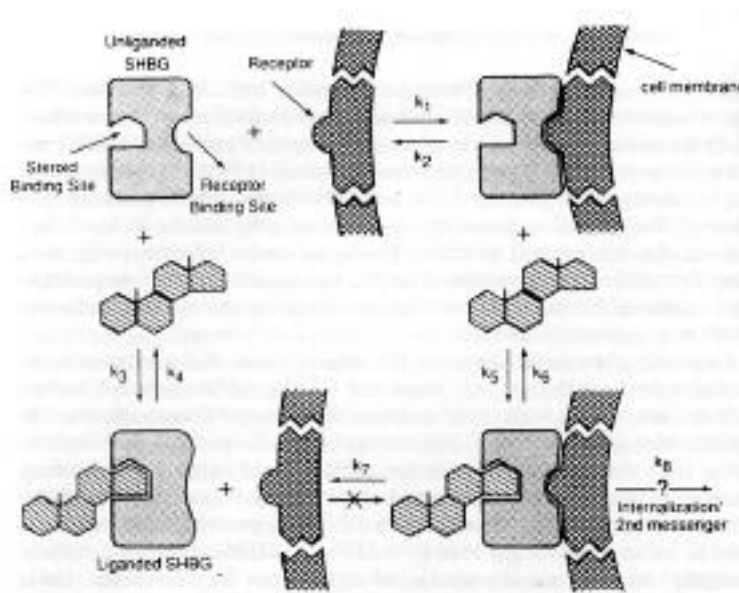
Els esteroids sexuals són units per varies proteïnes plasmàtiques, incloent l'albumina, que uneix andrògens i estrògens amb baixa afinitat, mentre que la SHBG/ABP els uneix amb alta afinitat (Siiteri, P.K. et al. 1982). De manera general, el paper fisiològic de la SHBG/ABP és poc conegut. La teoria més acceptada és la hipòtesi de l'hormona lliure (Mendel, C.M. et al. 1989; Mendel, C.M. 1992), que consisteix en que només els esteroids lliures (no units) són els que estan disponibles i poden ser incorporats per les cèl.lules diana des dels capil.lars, sent només biològicament activa la hormona lliure. Com a conseqüència d'aquesta hipòtesi és després que la SHBG/ABP actuaria com a reservori d'esteroids sexuals que per disociació podrien ser incorporats per les cèl.lules (Rosner, W. 1990). Hi ha diferents estudis que apoen aquesta hipòtesi, com per exemple que demostren que la SHBG/ABP és capaç d'inhibir l'entrada i la metabolització dels andrògens a la pròstata de rata, cultius de pròstata i línies cèl.lulars de pròstata (Lasnitski, I. and Franklin, H.R. 1972; Lasnitski, I. and Franklin, H.R. 1975; Mercier-Bodard, C. et al. 1976).

S'ha proposat, també, que la SHBG/ABP actuaria regulant el balanç d'andrògens/estrògens lliures. Aquest model està basat en el fet que la SHBG/ABP uneix amb molta més afinitat la T que l'E, mentre que l'albumina uneix més fortament l'E que la T (Anderson, D.C. 1974). Apoiant aquesta hipòtesi s'ha vist que canvis en la concentració de SHBG/ABP afecten de manera diferent a les concentracions de T i E, encara que es desconeix la importància fisiològica del *ratio* andrògens/estrògens.

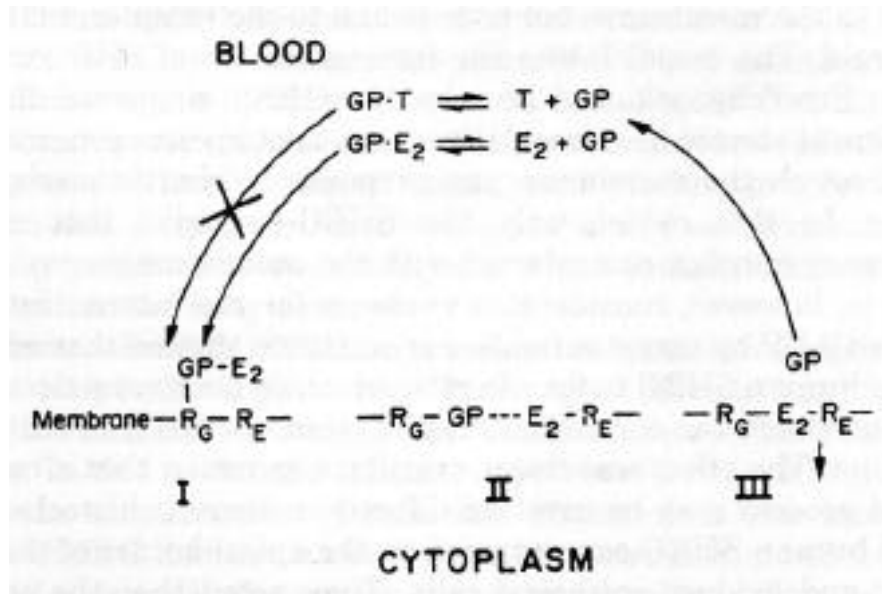
Altres models d'acció de la SHBG/ABP proposen que aquesta proteïna només deixa anar els esteroids sexuals en els teixts diana per aquestes hormones. Segons aquest model,

la SHBG/ABP aniria circulant pel plasma unint els esteroids, i el contacte amb la superfície dels vasos provocaria canvis conformacionals en la proteïna el que provocaria a la seva vegada l'alliberament de l'esteroid (Pardridge, W.M. 1988.a; Pardridge, W.M. 1988.b). Aquesta hipòtesi es basa en estudis realitzats en rates, on s'ha vist que la SHBG/ABP humana allibera selectivament T i E en teixits diana com el testicle i la pròstata.

Treballs posteriors han aportat evidències a favor de que aquestes proteïnes no actuen com a simples segrestadors d'hormones esteroidals, sinó que la SHBG/ABP interaccionaria directament amb les cèl.lules diana. S'ha suggerit que la SHBG/ABP utilitzaria els receptors de la superfície cel.lular per regular l'entrada d'esteroids al teixit diana (Lobl, T.J. 1981) (Figura 22). En aquest model, només la SHBG/ABP no unida a esteroids seria capaç d'unir-se a la membrana, i un cop unida al receptor seria capaç d'unir l'esteroid i internalitzar-se el complexe (Hryb, D.J. et al. 1985). Un altre model proposat no comportaria la internalització de la SHBG/ABP a través de la membrana, sinó que l'esteroid entraria per un mecanisme de *shuttle*, i només serviria pel complexe SHBG-E que interactuaria amb la membrana (Strel'chyonov, O.A. and Avvakumov, G.V. 1990) (Figura 23).



**Figura 22.** Model d'interacció entre els esteroids, la SHBG/ABP i el receptor per la SHBG/ABP. (Joseph, D.R. 1994)



**Figura 23.** Mecanisme hipotètic d'interacció per la SHBG/ABP unida a E amb la membrana cel·lular, on GP és la SHBG/ABP, i  $R_G$  i  $R_E$  són receptors de membrana per la SHBG/ABP. (Joseph, D.R. 1994)

Tot i així, hi ha evidències de la internalització de la SHBG/ABP a les cèl·lules diana. L'administració de SHBG/ABP humana a rates femelles, incrementa l'acumulació d'E, però no de DHT, en l'úter i l'oviducte (Noe, G. et al. 1992). L'efecte és teixit específic, així que comporta la participació d'un receptor.

#### IV.9. La SHBG/ABP en la reproducció

La proteïna SHBG/ABP testicular és el primer producte de secreció de les cèl·lules de Sertoli que va ser identificat, i és el primer marcador tant de funció com de desenvolupament de les cèl·lules de Sertoli. Durant els últims 25 anys s'ha acceptat que el paper de la SHBG/ABP a l'espermatoïgenesis és el de regular els nivells d'esteroides al testicle i l'epidídim (French, F.S. and Ritzen, E.M. 1973). La secreció de SHBG/ABP per part de les cèl·lules de Sertoli és bidireccional, el 80% va directament cap al lumen del túbul seminífer i el 20% entra a la sang (Gunsalus, G.L. et al. 1980). Les immunohistoquímiques per SHBG/ABP realitzades en seccions testiculars de rata suggereixen un patró de marcatge diferencial (apical o basal) en funció del nivell del cicle a l'epiteli seminífer (Pelliniemi, L.J. et al. 1981). Contrastant amb això i fent servir

anticossos de conill contra la SHBG/ABP, es pot veure marcatge a les cèl.lules de Sertoli en tots els estadiatges del cicle (Oke, B.O. and Suárez-Quian, C.A. 1993).

Després de la secreció al lumen del túbul seminífer, la SHBG/ABP és transportada cap a l'epidídim per a la correcta maduració de l'esperma. La SHBG/ABP ha estat identificada per immunohistoquímica a l'aparell de Golgi de les cèl.lules epitelials principals del cap de l'epidídim (Feldman, L. et al. 1981; Pelliniemi, L.J. et al. 1981). També ha estat trobada per autoradiografia a endosomes, cossos multivesiculars i a l'aparell de Golgi de les mateixes cèl.lules (Gerard, A. et al. 1988), així com a vesícules de secreció de les cèl.lules principals, fet que ha permès postular la possibilitat d'una forma de SHBG/ABP que es secretaria a nivell de l'epidídim (Hermo, L. et al. 1998). Altres resultats han evidenciat una endocitosi de SHBG/ABP per part de les cèl.lules germinals de mono (Gerard, A. et al. 1991) i rata (Gerard, A. et al. 1994), específicament a nivell d'espermatogònies, espermatòcits, i espermàtides rodones i allargades.

Tots els resultats estructurals juntament amb aquestes dades suggereixen que el paper de la SHBG/ABP en l'espermatogènesi és el de mantenir un ambient especial androgènic necessari per a la diferenciació i maduració de les cèl.lules germinals en el testicle i l'epidídim respectivament. El problema amb aquesta funció de la SHBG/ABP és que les cèl.lules germinals no sembla que expressin l'AR (Suárez-Quian, C.A. et al. 1999), així que si realment els andrògens són alliberats a les cèl.lules germinals no actuarien per la via clàssica de l'AR.

Per tal d'estudiar les accions de la SHBG/ABP a l'espermatogènesi, s'han desenvolupat dos models de ratolins transgènics que sobreexpressen l'un la proteïna de rata, i l'altre la proteïna humana.

### Ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata

Durant la dècada dels 90 és va desenvolupar el ratolí transgènic que sobreexpressa la SHBG/ABP de rata, per tal d'intentar esbrinar si tenia alguna funció més durant l'espermatogènesi. El ratolí és va desenvolupar mitjançant la microinjecció pronuclear d'un fragment de 5.5 Kb de DNA genòmic de rata, que contenia 1.5 Kb de la regió promotora i 4 Kb de regió codificant (Reventós, J. et al. 1993). Els primers resultats obtinguts en aquest laboratori amb el ratolí transgènic van assenyalar mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* que aquests animals tenien un increment d'expressió del mRNA de SHBG/ABP de rata a les cèl.lules de Sertoli. Per la tècnica de *Northern Blot* es va detectar expressió de SHBG/ABP a nivell del testicle i cervell. A més, mitjançant assajos de

*binding* es va veure que aquests ratolins transgènics presentaven una activitat més elevada d'unió de DHT tant a plasma com a homogenats testiculars (Larriba, S. et al. 1995; Esteban, C. et al. 1997.a). Es va poder observar que aquests ratolins tenien problemes de fertilitat, ja que s'obtenien ventrades amb un número reduït de cries quan es comparava amb els creuaments normals. En un primer moment es van desenvolupar tres línies de ratolins transgènics, una d'elles es va perdre per la falta de fertilitat, mentre que les altres dues presentaven una disminució del número de cries per ventrada. L'anàlisi morfològic dels testicles del ratolí transgènic va revelar l'existència de tots els estadiatges del cicle de l'epiteli seminífer, tot i que alguns túbuls presentaven una morfologia anormal (Larriba, S. et al. 1995; Esteban, C. et al. 1997.a; Joseph, D.R. et al. 1997.b). Per immunohistoquímica, s'ha detectat l'acumulació de la proteïna de rata en espermatòcits en fase de paquitè i metafase (Esteban, C. et al. 1997.b). Degut a que la SHBG/ABP uneix andrògens, s'havia especulat que un augment de la quantitat de proteïna podria afectar als nivells d'andrògens lliures tant a nivell plasmàtic com a nivell testicular. Malauradament, tots els anàlisi fets per tal de mesurar si existien diferències en els nivells d'andrògens entre els ratolins transgènics i els normals han resultat negatius (Joseph, D.R. 1994).

### Ratolí transgènic per la SHBG/ABP humana

S'ha generat un ratolí transgènic que expressa la SHBG/ABP humana (Janne, M. et al., 1998). Existeixen dues línies de transgènics diferents, una d'elles conté 4 Kb de la seqüència genòmica de la SHBG/ABP humana, tota la regió codificant i 0.9 Kb de regió promotora. L'altre línia conté 11 Kb de la seqüència genòmica de SHBG/ABP, dins d'aquest fragment de genòmic hi ha la regió codificant i 6 Kb de regió promotora, que conté la regió promotora A, que dóna lloc als *transcripts* alternatius. Les dues línies expressen la SHBG/ABP a fetge i ronyó, aquests mRNA provenen del promotor 1 i per tant contenen l'exó 1, fent-se proteïna secretada. Únicament la línia que conté el transgen d'11kb expressa la SHBG/ABP humana al testicle. Aquests *transcripts* testiculars correspondrien a *transcripts* de SHBG/ABP alternatius, i que per tant contenen l'exó A. En el testicle del ratolí transgènic shbg11, per hibridació *in situ* s'ha vist que hi ha un augment del mRNA de SHBG/ABP a l'interior dels túbuls, detectant-se marcatge des de l'estadiatge VII fins al XII. Els autors consideren que aquests *transcripts* estarien a les cèl.lules de Sertoli. D'altra banda, aquests animals sembla que tenen una espermatogènesi i fertilitat normal. Les dues línies de ratolins transgènics tenen uns nivells plasmàtics de SHBG/ABP molt elevats, així com uns nivells de T circulants molt alts (Janne, M. et al. 1998).



#### IV.10. La homologia amb altres proteïnes

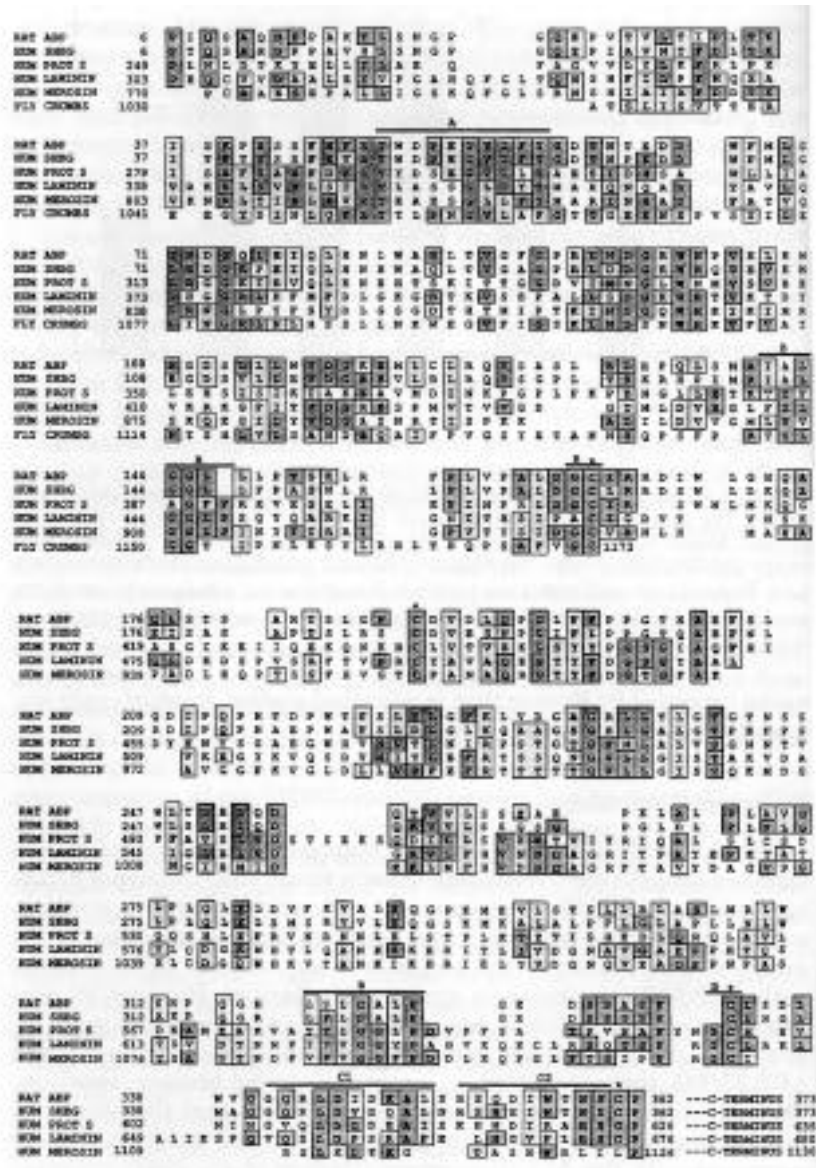
L'anàlisi computacional de les seqüències utilitzant programes d'aliniament van permetre veure que la SHBG/ABP tenia semblances amb proteïnes del plasma, de la matriu extracel.lular i del desenvolupament (Figura 24). La SHBG/ABP té homologia amb la proteïna S (factor de coagulació de la sang), amb la Laminina (proteïna de la matriu extracel.lular) i amb la proteïna del desenvolupament *Crumbs* de *Drosophila* (Baker, M.E. et al. 1987; Joseph, D.R. and Baker, M.E. 1992). La seqüència més conservada està a la regió que ha estat identificada a la SHBG/ABP com al lloc d'unió al receptor. També estan molt conservats els 4 residus Cys a totes les proteïnes.

La proteïna S és un corregulador negatiu del mecanisme de coagulació sanguini. De manera específica és un cofactor de la proteïna C activada que inactiva per proteòlisi els factors Va i VIIIa (Dählback, B. et al. 1986; Hoskins, J. et al. 1987).

La proteïna *crumbs* és una proteïna semblant al EGF que actua en l'organització de l'epiteli (Tepass, U. et al. 1990).

La Lamina i la Merosina (una forma de la làmina) són proteïnes que formen part de la membrana basal i són importants per a la proliferació, migració i diferenciació cel.lular (Beck, K. et al. 1990; Engel, J. 1992; Kleinman, H.K. et al. 1993).

S'han identificat altres proteïnes amb les que la SHBG/ABP guardaria homologia, com pot ser la proteïna Gas 6 codificada pel *growth arrest-specific gene* (Manfioletti, G. 1993). Totes aquestes proteïnes, tot i guardar un gran homologia en alguna de les seves regions, no semblen tenir funcions que aparentment estiguin relacionades. La SHBG/ABP i aquestes proteïnes podrien provenir d'un mateix gen ancestral, tot i que si així fos, caldria esperar que tinguessin propietats funcionals semblants.



**Figura 24.** Múltiple aliniament de les proteïnes SHBG/ABP de rata, SHBG/ABP humana, proteïna S depenent de vitamina K humana, laminina A humana, merosina humana i proteïna *crumbs* de *Drosophila*. (Joseph, D.R. 1994)

#### IV.11. La regulació hormonal de l'expressió de SHBG/ABP

La SHBG/ABP té una regulació diferencial segons si s'expressa al fetge o al testicle. Al teixit hepàtic els estrògens augmenten la seva expressió i els andrògens la disminueixen (Anderson, D.C. 1974). La SHBG/ABP testicular és incrementada per la FSH i els andrògens (Hansson, V. et al. 1975; Hall, S.H. et al 1990). El paper de la FSH ha estat demostrat per la falta de producció de SHBG/ABP després d'una hipofisectomia, i la seva

producció després de l'administració de FSH (Joseph, D.R. 1994). Tot i així, la T sola és capaç de mantenir la secreció de SHBG/ABP només si és administrada just després de la hipofisectomia (Hansson, V. et al. 1976). A més a més, la T a altes dosis augmenta la producció de SHBG/ABP, però a baixes dosis la disminueix (Weddington, S.C. et al. 1976). De manera interessant, els nivells de SHBG/ABP al testicle de rates tractades amb Tamoxife (Tmf), i que els falta AR, tenen uns nivells superiors de SHBG/ABP en 10 cops respecte dels controls (Hansson, V. et al. 1976).

El desenvolupament de cultius primaris de línies de Sertoli ha permès estudiar la regulació de l'expressió i secreció de SHBG/ABP per part de FSH i AMPc (Reventós, J. et al. 1986), FSH i T (Reventós, J. et al. 1986). Els anàlisis d'expressió de SHBG/ABP després del tractament amb FSH i T ha donat resultats conflictius. Tot i que l'addició de FSH i T augmenta els nivells de SHBG/ABP en els cultius primaris de cèl.lules de Sertoli o en rates hipofisectomitzades (Reventós, J. et al. 1988), la FSH no augmenta la producció del *transcript* de 1.7 Kb, encara que manté la seva producció (Hall, S.H. et al 1990). S'ha suggerit que la regulació hormonal de la SHBG/ABP és indirecta, no mediada per l'element de resposta a AMPc (Joseph, D.R. 1994) i és possiblement mediada per factors paracrins regulats per andrògens (Skinner, M.K. and Fritz, I.B. 1985). S'ha estudiat la regulació del promotor P1 de SHBG/ABP a la línia cel.lular de Sertoli MSC-1, a la qual s'ha transfectat el vector pCMVAR, que codifica per l'AR. Els resultats obtinguts en aquest model han demostrat que ni els andrògens ni la FSH regulen directament l'expressió d'aquest gen (Fenstermacher, D.A. and Joseph, D.R. 1998). Tot i que es coneix l'existència de dos mitjos elements regulats per andrògens en el gen de rata per la SHBG/ABP (Joseph, D.R. 1994), calen més experiments per esbrinar si hi ha una regulació directe per part de FSH i andrògens.

L'expressió de SHBG/ABP al testicle no és constant al llarg de tots els estadiatges del cicle de l'epiteli seminífer. Utilitzant transil.luminació i microdissecció de túbuls seminífers en estaditatges, s'ha pogut veure que els nivells més alts de SHBG/ABP es troben als estadiatges VII i VIII, però la proteïna no apareix fins més tard, als estaditges IX i X (Ritzén, E.M. et al. 1982). El missatger de l'AR s'expressa de manera similar, trobant-se nivells alts en estaditges posteriors (Isomaa, V. et al. 1985).

En cultius cel.lulars d'hepatòcits, estrògens i andrògens augmenten els nivells de SHBG/ABP (Lee, I.R. et al. 1987), mentre que la insulina i la prolactina inhibeixen la seva producció (Plymate, S.R. et al. 1988).

#### **IV.12. Els llocs d'expressió de SHBG/ABP**

La presència de SHBG/ABP ha estat identificada en nombroses espècies. Als humans, els dos llocs principals d'expressió de SHBG/ABP són els hepatòcits i les cèl·lules de Sertoli. La SHBG/ABP és sintetitzada als dos tipus cel·lulars durant la vida fetal i la vida adulta, mentre que als rosegadors no hi ha expressió al fetge en l'edat adulta, i a la rata només hi ha expressió al fetge fetal (Carreau, S. 1986). A nivell testicular la SHBG/ABP ha estat robada a les diferents espècies de mamífers analitzades com a l'humà, monos, rata, ratolí, conill i bous, així com a espècies més llunyanes, com peixos teleostis i taurons (Joseph, D.R. 1994).

Durant els últims anys l'expressió de SHBG/ABP ha estat descrita en diferents teixits. En el tracte reproductor femení, s'ha detectat expressió de SHBG/ABP en ovari, oviducte i úter del ratolí femella transgènica que sobreexpressa la SHBG/ABP de rata (Joseph, D.R. et al. 1997.a). En humans s'ha demostrat la presència de variants de la SHBG/ABP a l'endometriosis ovàrica (Misao, R. et al. 1998.a) i a l'endometri uterí (Misao, R. et al. 1997.a). Al sistema nerviós, s'han detectat tant formes secretades com alternatives a diferents regions del cervell fetal i adult de la rata (Becchis, M. et al. 1996; Wang, Y.M. et al. 1990). El ratolí transgènic que sobreexpressa el gen de la SHBG/ABP humana té expressió al ronyó i duodè (Jänne, M. et al. 1998; Jänne, M. et al. 1999). A més a més, s'ha trobat expressió de SHBG/ABP en diferents neoplàsies humanes regulades hormonalment, com el càncer de mama (Moore, K.H. et al. 1996; Murayama, Y. et al. 1999), d'ovari (Misao, R. et al. 1998.b), d'endometri (Misao, R. et al. 1997.b), de cèrvix (Misao, R. et al. 1997.c) i de pròstata (Mercier-Bodard, C. et al. 1991; Plymate, S.R. et al. 1991).

## V. LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA O APOPTOSI DURANT L'ESPERMATOGÈNESI

L'apoptosi és un procés actiu que controla el nombre final de cèl·lules en una gran varietat de teixits, a més d'estar involucrada en la morfogènesi durant el desenvolupament embrionari i en la remodelació tisular (Adams, J.M. et al. 1998; Oltvai, Z.N. et al. 1993; Tilly, J.L. 1996; Wang, R.A. et al. 1998).

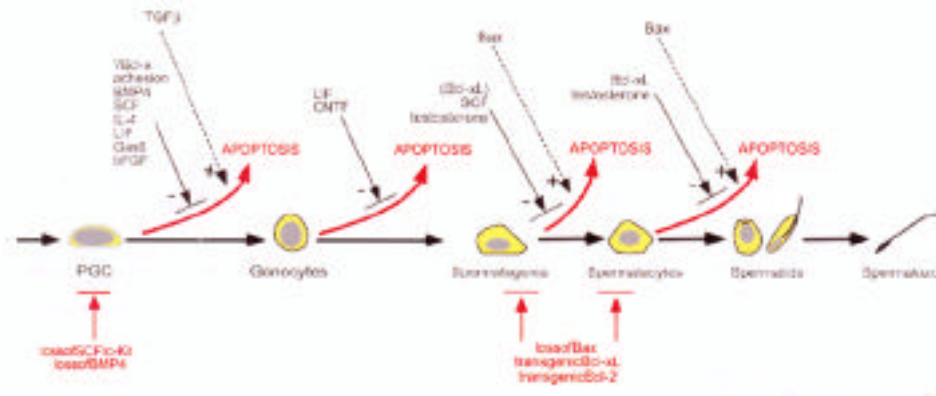
L'espermatozou madur és el producte final d'un procés de desenvolupament acuradament regulat, durant el qual les cèl·lules germinals proliferen, es diferencien, s'autorenoven i moren. El control de l'apoptosi de cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi és molt important. Si una cèl·lula germinal mor o sobreviu és determinat per una xarxa de senyals complexes. Això inclou, senyals paracrines com el factor *stem cell* (SCF) o el factor inhibitori de la leucèmia (FIL), i senyals endocrines com les gonadotrofines hipofisàries i la T. Les cèl·lules germinals, així com altres tipus cel·lulars, responen tant a senyals externes com internes, que activaran vies de senyalització intracel·lular que acabaran determinant la fi de la cèl·lula. Les proteïnes de la família Bcl-2 poden ser essencials per a la homeostasi de les cèl·lules germinals. Alguns membres d'aquesta família promouen la supervivència cel·lular (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1 i A1), mentre que d'altres promouen la mort (Bax, Bak i Bim) (Adams, J.M. et al. 1998). L'abundància relativa a cada cèl·lula d'aquests membres determinarà probablement la seva mort per apoptosi o bé, la seva supervivència (Oltvai, Z.N. et al. 1993). La interacció competitiva dels factors pro-apoptòtics i anti-apoptòtics de la família Bcl-2 regula l'activació de proteases (caspases) que acabaran desmuntant la cèl·lula per uns processos encara poc coneguts (Adams, J.M. et al. 1998).

Els animals modificats genèticament amb guany o pèrdua de funció en gens que codifiquen per proteïnes de la família de Bcl-2, o bé altres reguladors de l'apoptosi, presenten defectes en l'espermatogènesi. La naturalesa d'aquests defectes, juntament amb el coneixement dels patrons d'expressió normal d'aquests gens, permet obtenir dades noves sobre el control de la supervivència de les cèl·lules germinals.

### V.1. El procés de desenvolupament i mort de les cèl·lules germinals

Com ja se sap, la producció de l'espermatozou madur és un procés que inclou múltiples estadis de desenvolupament. El procés s'inicia a l'embrió de ratolí al voltant de

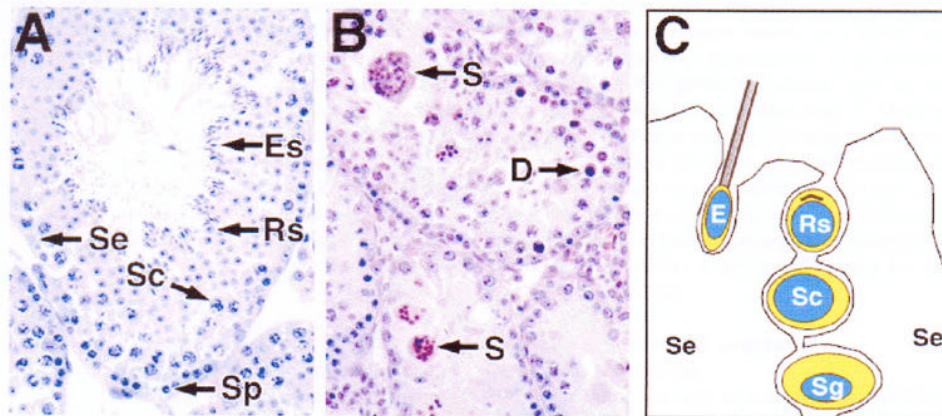
l'onzè dia després del coit, quan les cèl.lules germinals primordials (CGP) colonitzen la cresta genital. Sota la influència de les cèl.lules de Sertoli les CGP proliferen, algunes d'aquestes pateixen apoptosi (Wang, R.A. et al. 1998), i les que sobreviuen esdevenen gonòcits (Figura 25). Els gonòcits es mantenen quiescents fins just després del naixement, moment en que són reactivats i inicien el procés d'espermatogènesi.



**Figura 25.** Desenvolupament gonadal durant l'espermatogènesi i la primera onada d'espermatogènesi, que va acompanyada per una gran apoptosi a tots els tipus de cèl.lules germinals.

A l'animal jove, el desenvolupament de la primera cohort de gonòcits en espermatozous és conegut com la primera onada d'espermatogènesi (Wang, R.A. et al. 1998) (Figura 25). Es caracteritza per l'aparició seqüencial de cèl.lules germinals cada cop més madures. Durant el procés, cada cèl.lula germinal és fortament agafada per una o més cèl.lules de Sertoli (Figura 26C) que s'encarreguen de proveir-les de nutrients (Russell, L.D. et al. 1990). La primera onada de l'espermatogènesi s'inicia quan els gonòcits es diferencien en espermatogònies. En el ratolí, això té lloc entre el naixement i el cinquè dia postnatal, a l'humà té lloc entre el naixement i el sisè mes d'edat. Les espermatogònies es divideixen per a mantenir el número d'espermatogònies estable, d'altres es diferencien en espermatòcits, aquest fenomen té lloc al voltant del desè dia postnatal al ratolí. A la pubertat en l'home s'inicia la meiosi. Al ratolí, cap al vintè dia es generen les espermatides haploids, i al dia 35 apareixen els primers espermatozous a la llum dels túbuls seminífers. En l'humà, l'inici està associat amb l'increment de les gonadotrofines i els nivells d'andrògens, que anuncia l'aparició de les espermatides haploids. La primera onada d'espermatogènesi va acompanyada per una extensa apoptosi de cèl.lules germinals. En el ratolí el pic de mort és dues setmanes després del naixement (Wang, R.A. et al. 1998; Rodriguez, I. et al. 1997). Es creu que aquest procés d'apoptosi pot ser degut a

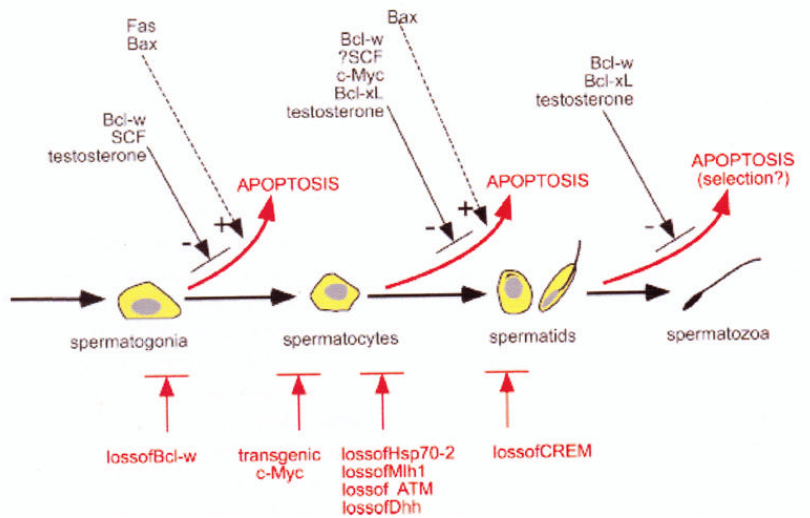
l'ajustament del número de cèl.lules germinals que poden ser mantingudes per les cèl.lules de Sertoli (Orth, J.M. et al. 1988) i és regulat per múltiples senyals (Figura 25). La reducció del número de cèl.lules de Sertoli en testicles de rata immadura causa una reducció proporcional en el número d'espermàtides rodones de l'animal adult, el que donaria suport a l'afirmació anterior (Orth, J.M. et al. 1988).



**Figura 26.** A la imatge A s'observa l'anatomia del testicle adult, il·lustrat en un túbul seminífer normal. Se: cèl.lula de Sertoli; Sp: espermatogònia i Rs: espermatòcit rodó. A la imatge B s'observa un túbul seminífer d'un ratolí *knock-out* per *bcl-w*. Es pot observar la gran desorganització del túbul amb l'aparició de simpastes (S) i de nuclis degenerants (D). A la imatge C s'observa un diagrama esquemàtic de la relació de les cèl.lules de Sertoli amb els diferents tipus de cèl.lules germinals.

A l'adult, l'espermatogènesi es caracteritza per la contínua maduració de cèl.lules germinals cap al centre del túbul seminífer: proliferació mitòtica d'espermatogònies, divisió meiótica d'espermatòcits, diferenciació d'espermàtides, i finalment alliberament de l'espermatozou a la llum del túbul (Russell, L.D. et al. 1990; Kretser, D.M. et al. 1998) (Figura 26 i Figura 27). La incidència exacte de l'apoptosi de cèl.lules germinals en l'animal adult encara no està clara, ja que no totes les cèl.lules germinals que degeneren tenen una morfologia apoptòtica clàssica. Les espermatogònies i les espermatòcits rodons moren per apoptosi, i tenen una morfologia i unes característiques bioquímiques apoptòtiques, com són, la compactació del DNA del nucli i el marcatge del nucli per la terminal transferasa (Allan, D.J. et al. 1987; Henriksen, K. et al. 1998). Les espermatòcits rodons sovint degeneren en massa, formant simpastes multinucleats, fruit d'una incompleta citoquinesi. Les cèl.lules germinals apoptòtiques són eliminades a la llum del túbul seminífer, o bé fagocitades per les cèl.lules de Sertoli. La mort per apoptosi dels espermatòcits i les espermatòcits allargats és menys clara, algunes poden ser marcades

amb la terminal transferasa i l'anexina V, però no mostren les característiques nuclears associades a l'apoptosi i és possible que el marcatge sigui degut a una morfologia anormal i a la configuració del DNA d'aquestes cèl.lules. La mort dels espermatozous és possible que no sigui mitjançant el procés clàssic d'apoptosi, on les caspases sembla ser que no intervindrien (Weil, M. et al. 1998).



**Figura 27.** Durant l'espermatogènesi de l'adult es produeix l'apoptosi de cèl.lules germinals que manté el número apropiat de cada tipus de cèl.lules germinals.

## V.2. Els senyals que regulen l'apoptosi de les cèl.lules germinals

### V.2.1. Els senyals paracrins

Hi ha diferents senyals paracrins que són candidats a regular el destí de les cèl.lules germinals i tenen un paper durant el desenvolupament embrionari (Figura 25). Per exemple, les cèl.lules germinals primordials (CGP) expressen el receptor pel factor inhibitori de la leucèmia (FIL) (Cheng, L. et al. 1994), i la supervivència d'aquestes cèl.lules en cultiu és promoguda per aquest factor (De Felici, M. and Dolci, S. 1991). El paper del FIL *in vivo* no està clar, ja que el ratolí *knock-out* per aquest gen és fèrtil (Stewart, C.L. et al. 1992). El receptor Sky és expressat per les CGP i el precursor de les cèl.lules de Sertoli de la cresta genital, mentre que Gas 6, que és un lligand soluble per Sky, és secretat per les cèl.lules intersticials que envolten a les cèl.lules Sky positives.



Aquest patró d'expressió i el fet que Gas 6 promou la supervivència de les CGP *in vitro* (Matsubara, N. et al. 1996), suggereix que Gas 6 potser promou la supervivència de les CGP a l'embrió. Altres factors que promouen la supervivència de les CGP *in vitro* són la interleukina-4 (IL-4), el factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF), el factor *stem cell* (SCF) i la proteïna morfogènica de l'òs (Lawson, K.L. et al. 1999). Pel contrari, el TGF promou l'apoptosi de gonòcits *in vitro* (Olaso, R. et al. 1998). El destí dels gonòcits, a l'igual que les CGP, està regulat per mecanismes paracrins. La supervivència dels gonòcits co-cultivats amb cèl.lules de Sertoli és promoguda pel bFGF (Van Dissel-Emiliani, F.M. et al. 1996), pel FIL (De Miguel, M.P. et al. 1996) i pel factor neurotròfic ciliar (CNTF) (De Miguel, M.P. et al. 1996). El paper d'aquests factors *in vivo* encara no ha estat determinat.

En l'adult, membres de la família de la proteïna morfogènica de l'òs (BMP) promouen la supervivència de les cèl.lules germinals *in vivo*. El BMP-8A i el BMP-8B són secretats per les espermatides rodones (Zhao, C.Q. and Hogan, B.L. 1996) i produïrien senyals de supervivència als espermatòcits. Ratolins *knock-out* per aquests dos gens presenten una elevada incidència de l'apoptosi a nivell d'espermatòcit primari (Zhao, C.Q. et al. 1996; Zhao, C.Q. and Hogan, B.L. 1998).

### V.2.2. Els senyals per contacte cel.lular

A més a més dels senyals paracrins, les cèl.lules germinals depenen dels senyals provinents de les cèl.lules de Sertoli per contacte directe entre membranes. De tots els possibles factors, el més estudiat ha estat el SCF (Manduit, C. et al. 1999). El SCF que s'uneix a membrana és expressat per les cèl.lules precursors de les cèl.lules de Sertoli a la cresta genital embrionària, i el seu receptor, el c-kit tirosina quinasa, és expressat per la superfície de la CGP adjacent. Un fet interessant és que els nivells d'expressió del c-kit a les CGP de ratolí disminueixen al voltant del catorzè dia després del coit, que coincideix amb el començament de l'apoptosi de les CGP (Manova, K. et al. 1991). Ratolins amb mutacions en els gens de SCF o c-kit tenen uns fenotips molt complexes, que consisteixen en una reducció del número de CGP que migren cap a la cresta genital i una elevada apoptosi de les cèl.lules que aconsegueixen arribar (Loveland, K.L. and Schlatt, S. 1997) (Figura 25). El mecanisme pel qual aquestes CGP no poden migrar bé i l'elevada mort de les que arriben no ha estat aclarit, però possiblement és degut a la pèrdua dels senyals de guia, supervivència i proliferació (Loveland, K.L. and Schlatt, S. 1997).

El SCF també és requerit durant la primera onada de l'espermatogènesi. En el testicle del ratolí, l'expressió del SCF s'incrementa dràsticament durant els primers 10 dies després

del naixement (Manova, K. et al. 1993; Munsie, M. et al. 1997). Si als ratolins que estan patint la primera onada espermatogènica es tracten amb ACK2, que és un anticòs que bloqueja les interaccions entre SCF i c-kit, s'obtenen uns testicles que tenen tots els tipus cel·lulars de l'espermatogènesi, excepte l'espermatogònia de tipus A (Yoshinaga, K. et al. 1991). La incidència de l'apoptosi a nivell d'espermatogònies i espermatòcits en aquests ratolins és molt elevada, el que suggeriria que el SCF és un factor que proporcionaria supervivència a aquests tipus cel·lulars (Packer, A.I. et al. 1995).

En l'adult, el SCF que s'uneix a membranes és expressat a les regions basals de les cèl·lules de Sertoli, mentre que el c-kit és expressat a la superfície corresponent de les espermatogònies (Manova, K. et al. 1993). Quan la interacció entre SCF i c-kit és bloquejada en edat adulta amb l'anticòs ACK2, s'indueix un increment de l'apoptosi en espermatogònies i espermatòcits (Packer, A.I. et al. 1995). En experiments *in vitro*, l'addició de SCF exogen protegeix de l'apoptosi a diferents tipus de cèl·lules germinals (Yan, W. et al. 2000).

Les cèl·lules de Sertoli fan servir el sistema Fas per regular el destí de les cèl·lules germinals. El lligand de Fas és expressat per les cèl·lules de Sertoli, mentre que Fas és expressat per les espermatogònies adjacents. Quan es tracten els testicles de ratolins amb tòxics contra les cèl·lules de Sertoli, es provoca una mort per apoptosi de les cèl·lules germinals. Aquestes cèl·lules que moren presenten un increment d'expressió a les seves superfícies de Fas que va acompanyat per un increment de l'expressió del lligand de Fas per part de les cèl·lules de Sertoli (Lee, J. et al. 1997). De totes maneres, el ratolí *knock-out* per Fas és fèrtil, per tant, Fas seria important per a l'homeostasi de les cèl·lules germinals, però no imprescindible (Adachi, M. et al. 1995).

### **V.2.3. Els senyals endocrins**

Tant la T com les gonadotrofines (FSH i LH), se sap que influencien en el destí de les cèl·lules germinals (Tapanainen, J.S. et al. 1993). La seva absència provoca l'apoptosi de les cèl·lules germinals, però això té lloc presumiblement a través d'efectes indirectes, com pot ser la presència de receptors hormonals a les cèl·lules somàtiques, i no a les cèl·lules germinals (Russell, L.D. et al. 1977; Billig, H. et al. 1995; Nandi, S. et al. 1999; Woolveridge, I. et al. 1999). El tractament amb estrògens indueix l'apoptosi a totes les cèl·lules germinals, incloent les espermatòides allargades i es creu que mimetitzaria la falta gradual de gonadotrofines (Blanco-Rodriguez, J. and Martinez-Garcia, C. 1996). La gonadotrofina coriònica humana s'ha utilitzat per accelerar el descens dels testicles de

nens o adolescents. Aquest tractament incrementa l'apoptosi d'espermatogònies (Dunkel, L. et al. 1997). Per altra banda l'ús de T de manera experimental com a contraceptiu pels homes inhibeix la producció de gonadotrofines induint l'apoptosi de les cèl.lules germinals.

Encara no es coneix el mecanisme pel qual l'absència de T provoca la mort de les cèl.lules germinals. Es pensa en la possibilitat de que la falta d'andrògens alteraria l'expressió dels gens de la família de Bcl-2 de les cèl.lules germinals, ja que l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-2 s'ha vist alterada en el testicle de pacients que eren tractats amb anti-andrògens pel seu càncer de pròstata (Woolveridge, I. et al. 1998). El fet de que aquesta alteració de l'expressió tingui lloc quan el tractament està molt avançat i l'augment d'apoptosi s'hagi produït molt abans, suggereix que aquest mecanisme no és important fisiològicament.

### **V.3. Les proteïnes intracel.lulars que decideixen el destí de la cèl.lula germinal**

Les cèl.lules germinals com s'ha descrit amb anterioritat responen a diferents senyals externs activant mecanismes de senyal intracel.lulars que decidiran el destí final de la cèl.lula. Els membres de la família Bcl-2, com per exemple la proteïna pro-apoptòtica Bax, juguen un paper fonamental. El ratolí *knock-out* per Bax té cèl.lules germinals als seus testicles (Kudson, C.M. et al. 1995), per tant, Bax no seria essencial per a la supervivència de les cèl.lules germinals a l'embrió. Tot i així, s'ha vist posteriorment que Bax és essencial per a la supervivència de les cèl.lules germinals durant la primera onada d'espermatogènesi (Figura 24). En el testicle de ratolí, entre la primera i la tercera setmana després del naixement, es troben uns nivells elevats de Bax (Rodriguez, I. et al. 1997) i es creu que seria el desencadenant de l'apoptosi d'espermatogònies i espermatòcits que té lloc en aquest període. Donant suport a aquesta hipòtesi, s'ha detectat la presència de Bax a l'interior de les cèl.lules que moren per apoptosi durant la primera onada d'espermatogènesi (Rodriguez, I. et al. 1997). Els testicles dels ratolins adults *knock-out* per Bax tenen un nombre excessiu d'espermatogònies i espermatòcits en pre-leptotè, que seria provocat per la fallida de l'apoptosi durant la primera onada d'espermatogènesi (Kudson, C.M. et al. 1995). En els testicles d'un ratolí normal, només trobem expressió de Bax a nivells baixos en espermatogònies (Rodriguez, I. et al. 1997, Krajewski, S. et al. 1994.a). Així, si bé queda clar quin es el paper de Bax durant la primera onada d'espermatogènesi, no està gens clar el paper que juga en l'edat adulta.

També pot jugar un paper importat la proteïna pro-supervivència Bcl-x<sub>L</sub>. El ratolí *knock-out* per Bcl-x<sub>L</sub> mor durant l'embriogènesi. S'ha pogut observar en cultius de CGP, que l'increment de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> augmenta de manera dràstica la supervivència (Watanabe, M. et al. 1997). Bcl-x<sub>L</sub> podria regular la supervivència de les cèl.lules germinals durant la primera onada d'espermatogènesi ja que s'han trobat nivells d'expressió elevats durant aquesta etapa (Rodríguez, I. et al. 1997). A més a més, l'expressió d'un transgen de Bcl-x<sub>L</sub> a les cèl.lules germinals, redueix l'apoptosi de la primera onada d'espermatogènesi, produint en l'animal adult, una patologia similar a la del *knock-out* per Bax (Rodríguez, I. et al. 1997). Un fenotip similar també es pot observar quan un transgen per Bcl-2 és expressat en espermatogònies (Rodríguez, I. et al. 1997, Furuchi, T. et al. 1996), senyalant la funció pro-supervivència de Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-2. A testicles adults Bcl-x<sub>L</sub> és poc abundant i només el trobem a espermatòcits i espermatòides (Krajewski, S. et al. 1994.b).

Hi ha altres membres de la família de Bcl-2, com pot ser Bcl-w, que sembla indispensable en el testicle durant l'embriogènesi i les dues setmanes després del naixement. Hi ha altres proteïnes intracel.lulars que han estat trobats al testicle, com són Bfl-1, Bak, Bad, Bok, Bim, DIVA i Boo, però no se'ls coneix bé la funció.

#### **V.4. L'apoptosi selectiva de cèl.lules germinals danyades**

Els espermatòcits incapaços de completar la meiosi són selectivament eliminats per apoptosi. Per exemple, els espermatòcits de ratolí que porten segments de cromosomes desaparellats i no han acabat la meiosi es creu que són eliminats per apoptosi (Burgoyne, P.S. et al. 1984; Odorisio, T. et al. 1998). Els espermatòcits del ratolí *knock-out* per la hsp-70 (Dix, D.J. et al. 1996) o la proteïna reparadora del DNA Mlh-1 (Baker, S.M. et al. 1996) no poden acabar la meiosi i són eliminades per apoptosi.

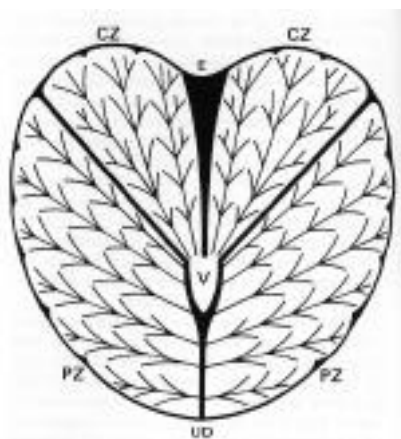
L'apoptosi també elimina de manera selectiva les espermatogònies i les espermatòides haploids danyades. Utilitzant radiació es danyen preferentment espermatogònies, que són eliminades per apoptosi (Allan, D.J. et al. 1987).

El CREM és un factor de transcripció que es necessita per l'expressió de gens post-meiotícs. El ratolí *knock-out* per CREM presenta una aturada al primer estadiatge de l'espermatogènesi i les cèl.lules són eliminades per apoptosi (Nantel, F. et al. 1996).



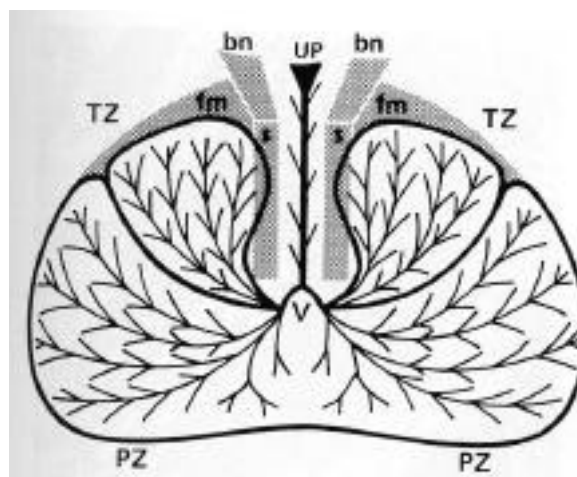
## VI.1. El teixit glandular

En una secció coronal seguint el curs del conducte ejaculador i el segment distal de l'uretra es pot observar la relació anatòmica entre les dues regions glandulars de la pròstata (McNeal, J.E. 1968) (Figura 29). La zona perifèrica comprèn el 70% de la massa glandular. Els seus conductes surten des del segment distal de l'uretra i el *verumontanum* cap a la part apical de la pròstata. En un pla coronal es pot observar que els conductes s'extenen de manera lateral com si fossin les branques d'un arbre (Figura 30). La zona central comprèn el 25% de la massa glandular prostàtica. Els seus conductes surten des d'una petita regió del *verumontanum* al voltant del conducte ejaculador. Els conductes i les seves branques van cap a la base de la pròstata seguint el curs del conducte ejaculador.



**Figura 29.** Diagrama de la secció coronal de la pròstata; mostra la zona central (CZ), la zona perifèrica (PZ) en relació al segment distal de l'uretra (UD), el *verumontanum* (V) i el conducte ejaculador (E). (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

**Figura 30.** Diagrama d'una secció coronal obliqua de la pròstata. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)



El segment proximal de l'uretra prostàtica es pot observar millor en un pla coronal obliquu d'una secció que aniria des de la base del *verumontanum* fins al coll de la bufeta (Figura 30). El segment proximal de l'uretra està relacionat només amb el 5% del teixit glandular prostàtic i la majoria d'aquest és representat per la zona de transició (McNeal, J.E. 1978). Aquesta zona està formada per dos lòbuls petits independents, els seus conductes surten des de l'inici del segment proximal de l'uretra i la part baixa de l'esfínter preprostàtic. L'esfínter és una coberta de fibres musculars llises que envolta el segment proximal de l'uretra (McNeal, J.E. 1972; McNeal, J.E. 1968). La majoria dels conductes de la zona de transició s'extenen de manera lateral al voltant de la vora distal de l'esfínter.

La regió glandular periuretral és una regió petita de la zona de transició que conté uns conductes diminuts que s'extenen al llarg del segment proximal de l'uretra, les branques dels quals s'endinsen a la regió preprostàtica de l'esfínter.

La zona perifèrica és la regió més susceptible a la inflamació i és el lloc on s'originen la majoria dels carcinomes (McNeal, J.E. 1968; McNeal, J.E. 1969). Alguns càncers s'inicien a la zona de transició, mentre que la zona central és bastant resistent, tant a la inflamació com al carcinoma. La zona de transició i la regió periuretral són els únics llocs d'origen de l'hiperplàsia nodular benigna (BPH) (McNeal, J.E. 1978).

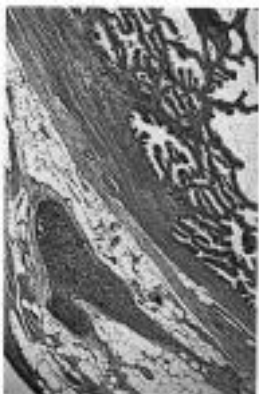
## VI.2. El teixit no glandular

El teixit no glandular de la pròstata inclou: l'esfínter preprostàtic, l'esfínter estriat, l'estroma fibromuscular anterior i la càpsula prostàtica. Els nervis i el sistema vascular també formarien part d'aquest teixit no glandular.

- L'esfínter preprostàtic consisteix en un conjunt de fibres circulars que formen un cilindre compacte que envoltaria al segment proximal de l'uretra que acaba al coll de la bufeta. Es creu que l'esfínter preprostàtic tindria una funció important durant l'ejaculació, ja que evitaria que el fluid seminal tornés cap enrera des del segment distal de l'uretra (Blacklock, N.J. 1949).
- L'estroma fibromuscular anterior és un teixit en forma de llençol que aniria des del coll de la bufeta cap a baix, per sobre de la superfície anteromedial de la pròstata (McNeal, J.E. 1978) (Figura 28). Els seus marges laterals es barregen amb la càpsula prostàtica al llarg de tota la línia en que la càpsula cobreix la regió anterior (Figura 30). La part més profunda de la seva superfície està en contacte amb l'esfínter preprostàtic, la zona de

transició i l'esfínter estriat. Aquest estroma fibromuscular està format per feixos llargs i compactes de cèl.lules musculars llises, que són similars a les del coll de la bufeta, amb les que es barregen a la part proximal. Aquestes fibres musculars llises estan més o menys aliniades verticalment, i sovint estàn separades per bandes denses de teixit fibrós.

- Entre el *verumontanum* i la part apical de la pròstata hi ha un petit esfínter, uniforme i compacte, format per fibres musculars estriades. A la part apical de la pròstata és on aquest esfínter està més ben desenvolupat (McNeal, J.E. 1972; Myers, R.P. et al. 1987). L'esfínter és incomplet a la part lateral posterior, on les seves fibres semicirculars s'inserten en el teixit glandular anterior de la zona perifèrica. El seu desenvolupament varia d'un individu a un altre.
  
- La càpsula prostàtica envolta la majoria de la superfície externa de la pròstata, incloent la part final de les branques dels conductes de la zona central i la zona perifèrica. La part final dels conductes de la zona de transició, que inclou l'estroma fibromuscular anterior i les glàndules periuretrals, no s'allarga més enllà de la superfície prostàtica (McNeal, J.E. 1978; McNeal, J.E. 1988.b). A la part apical de la pròstata hi ha una manca de càpsula a la part anterior i a la part lateral anterior. En aquesta zona, la majoria de les fibres distals de l'estroma fibromuscular anterior i de l'esfínter estriat entren en contacte amb el teixit glandular prostàtic anterolateral. De manera idònia, la càpsula prostàtica consisteix en una capa interna de fibres musculars llises, que majoritàriament s'orienten de manera transversal, i una membrana externa de col.lagen. Tot i així, les quantitats relatives i absolutes de teixit muscular i fibrós, així com la seva disposició, varia considerablement segons l'àrea (Ayala, A.G. et al. 1989; McNeal, J.E. 1990) (Figura 31).



**Figura 31.** Aspecte lateral de la càpsula prostàtica que està just per sobre de la zona perifèrica de la pròstata. La càpsula té capes de col.lagen i múscul llis. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)



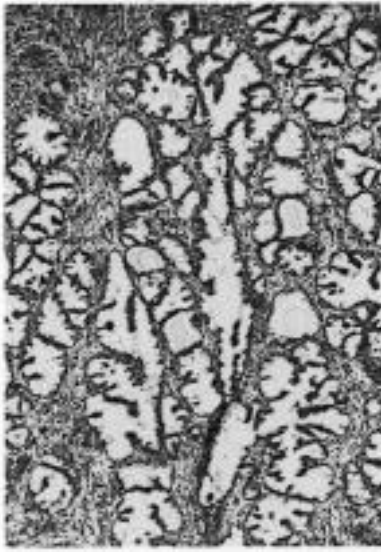
### VI.3. L'arquitectura de la pròstata glandular

El paper biològic de la pròstata és el d'acumular petites quantitats de fluid i expulsar-les ràpidament de manera ocasional. Aquests requeriments poden ser realitzats per un òrgan muscular que té una gran capacitat d'emmagatzament i una baixa capacitat de secreció. Per la seva banda, els conductes i acins pròstàtics són morfològicament idèntics, i es diferencien per la seva geometria i els dos semblen tenir la funció de ser reservoris de secreció. A totes les zones de la pròstata, tot el sistema de conductes i acins estan recoberts per cèl.lules secretores columnars idèntiques, tant a conductes com a acins. Els marcatges immunohistoquímics per l'antigen específic de la pròstata (PSA) i per la fosfatasa àcida de la pròstata (PAP) mostren un patró granular uniforme, tant a les cèl.lules dels conductes com a la dels acins. Considerant totes aquestes dades, sembla bastant provable que no existeixi una funció diferent entre els conductes i els acins a la pròstata.

La majoria del conductes de la pròstata s'originen a nivell de l'uretra i acaben a prop de la càpsula, excepte per la majoria dels conductes de la zona de transició, que acaben a l'estroma fibromuscular anterior (McNeal, J.E. 1988.a, McNeal, J.E. 1968, McNeal, J.E. 1978) (Figura 29 i Figura 30). Degut a que els conductes i els acins de cada una de les zones tenen un diàmetre i una separació comparable i la mateixa aparença histològica, es fa impossible la seva distinció microscòpica. Així, les anormalitats en l'arquitectura són detectades per desviacions del tamany i la separació de les glàndules.

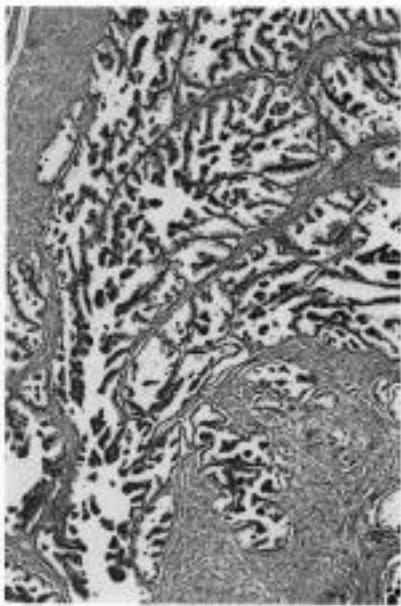
La majoria del conductes excretors de la zona perifèrica surten des de l'uretra i s'extenen de manera paral.lela al llarg del segment distal de la mateixa. De cada un dels conductes surten a la seva vegada conjunts de 3 o 4 conductes que van des de l'uretra fins a la càpsula. Cada una de les branques es dividirà donant lloc als acins (Figura 32). L'arquitectura de la zona de transició és similar a la de la zona perifèrica, tot i que les ramificacions són més extenses.

Tant a la zona perifèrica com a la zona de transició, els conductes i els acins acostumen a tenir un diàmetre entre 0.15 i 0.3 mm. Tenen un forma rodona que no és perfecte, ja que la vora de l'epiteli té ondulacions (McNeal, J.E. 1988.a; McNeal, J.E. 1970). Aquestes ondulacions poden ser fruit d'un intent d'augmentar la capacitat d'emmagatzematge. Un criteri important per diagnosticar els carcinomes ben diferenciats, és la seva tendència a formar contorns glandulars rodons o ovalats, que reflecteix la pèrdua de la funció de reserva (Gleason, D.F. 1977).



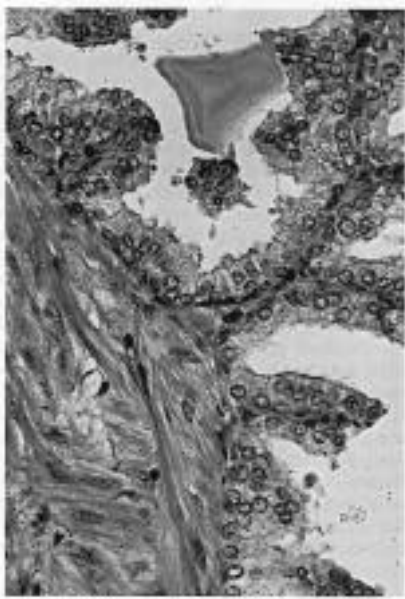
**Figura 32.** Zona perifèrica que té nòduls i acins de diàmetre i histologia semblants. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

Els conductes i els acins de la zona central tenen un diàmetre més gran i són més llargs que els de la zona perifèrica i de transició (Figura 33). Al contrari del que passa a la zona perifèrica, a la zona central els conductes i els acins són més llargs a mesura que ens acostem a la base de la pròstata. També existeix un augment de la densitat dels acins a mesura que els conductes s'apropen a la base de la pròstata.



**Figura 33.** Conductes i acins de la zona central. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

Les subdivisions glandulars entre les branques del mateix conducte de la zona central estan separades per bandes estretes i compactes de fibres musculars llises (Figura 34). Les diferents branques estan separades per bandes més gruixudes. El *ratio* entre epiteli i estroma en aquesta zona és el doble del que podem trobar a la zona perifèrica o de transició. A la zona perifèrica, tot i que l'estroma és més abundant, està menys entrellaçat, i per tant, els feixos de fibres deixen espais que són ocupats per fibres fines de col.lagen (Figura 35).

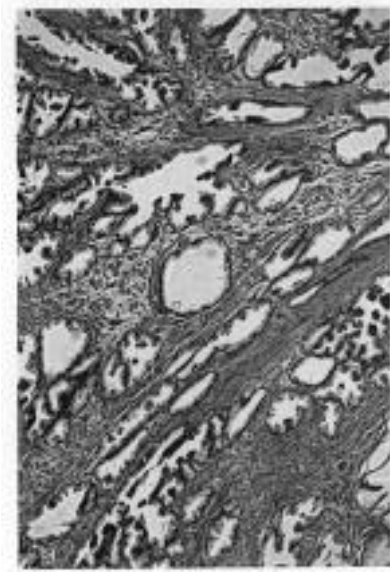


**Figura 34.** Acins de la zona central (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

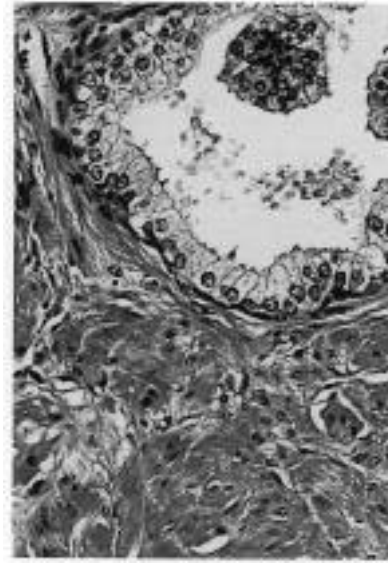


**Figura 35.** Acins de la zona perifèrica. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

Així, un canvi radical en la morfologia de l'estroma delimita el límit entre la zona central i la zona perifèrica. Passa el mateix entre la zona perifèrica i la zona de transició, (Figura 36), ja que l'estroma de la zona de transició té feixos compactes de fibres musculars llises (Figura 37). Aquesta densitat de l'estroma de la zona de transició contrasta amb la poca densitat de l'estroma de la zona perifèrica. De totes maneres, aquestes diferències en la densitat de l'estroma són menys evidents a mesura que augmenta l'edat i poden ser eliminades per malalties.



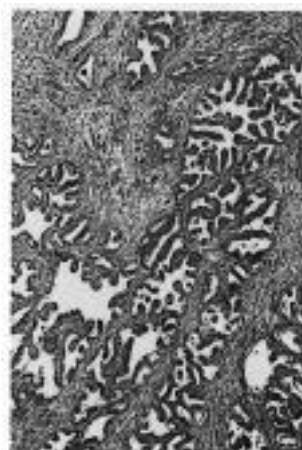
**Figura 36.** Part intermitja entre la zona de transició i la zona perifèrica. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)



**Figura 37.** Acins de la zona de transició. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

L'atrofia de la pròstata es relaciona amb l'edat, i presumiblement pot ser deguda a la manca d'andrògens que és un fet consistent a partir del 70 anys (McNeal, J.E. 1970; McNeal, J.E. 1984). No hi ha una explicació clara per l'atrofia que pateixen alguns individus abans dels 70 anys.

De manera característica, l'atrofia deguda a l'edat és difusa (Figura 38), mentre que l'atrofia prematura ve acompanyada per una reducció del volum secretat, i per una reducció o absència de marcatge pel PSA i PAP. A la zona perifèrica i de transició, l'arquitectura no es veu afectada, mentre que, a la zona central es pot trobar una alteració dramàtica de l'arquitectura.



**Figura 38.** Zona central amb atrofia difusa deguda a l'edat. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

#### VI.4. Els compartiments epitelials

A l'igual que a d'altres òrgans glandulars, les cèl.lules secretores de la pròstata estan separades de la membrana basal i de l'estroma per una capa de cèl.lules basals. Aquestes cèl.lules són allargades i estan disposades paral·lelament a la membrana basal i tenen un nucli prim, filiforme i fosc, amb poca quantitat de citoplasma (Mao, P. and Angrist, A. 1966). Aquestes cèl.lules costa veure-les, fins i tot poden no veure's en preparacions rutinàries. Cal un marcatge immunohistoquímic específic per tal de detectar aquestes cèl.lules basals (keratin 34 E12) (Brawer, M.K. et al. 1985). Sempre es troben envoltant conductes i acins i només en casos d'invasió maligne deixen de recobrir-los (Bostwick, D.G. and Brawer, M.K. 1987).

Aquestes cèl.lules basals no són mioepitilials com les del teixit mamari, ja que s'ha vist que són el compartiment proliferatiu de l'epiteli prostàtic, i es divideixen i maduren donant cèl.lules secretores (Dermer, G.B. 1978; Cleary, K.R. et al. 1983).

Totes les zones de l'epiteli prostàtic contenen una petita població de cèl.lules aïllades que són cèl.lules endocrines i paracrines. Aquestes cèl.lules són riques en grànuls que contenen serotonina i contenen l'enolasa específica de neurones (Di Sant'Agnesse, P.A. and de Mesy Jensen, K.L. 1984; Di Sant'Agnesse, P.A. et al. 1985). Subpoblacions d'aquestes cèl.lules també contenen gran varietat d'hormones peptídiques, com la somatostatina, la calcitonina i la bombesina (Di Sant'Agnesse, P.A. and de Mesy Jensen, K.L. 1984; Di Sant'Agnesse, P.A. 1986). Aquestes cèl.lules acostumen a quedar-se a la capa de cèl.lules basals, entre les cèl.lules de secreció. El seu paper específic en la biologia de la pròstata és desconegut.

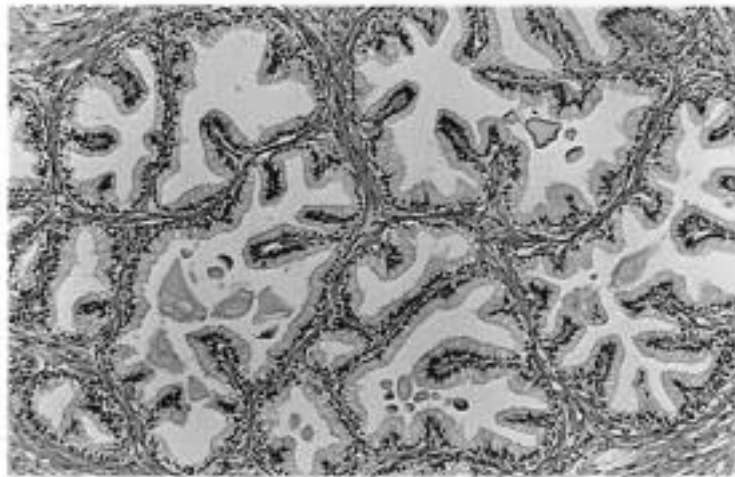
Les cèl.lules secretores de la pròstata contribueixen amb una gran varietat de productes al plasma seminal. El PSA i PAP són produïts per les cèl.lules secretores dels conductes i acins de totes les zones. El Pepsinogen II i l'activador del plasminogen tissular són produïts de manera normal només a la zona central (Reese, J.H. et al. 1986; Reese, J.H. et al. 1988). La lactoferrina també és un producte de secreció específic de la zona central, però també pot ser secretada en àrees que pateixen inflamació (Reese, J.H. et al. 1992). S'ha suggerit, també, que la zona central està especialitzada en la producció d'enzims, els substrats dels quals són secretats per la zona perifèrica, tot i que aquests substrats no han estat identificats (Reese, J.H. et al. 1988).

Les cèl.lules secretores de la zona central tenen un citoplasma granular molt prominent quan el comparem amb els d'altres regions de la pròstata. Les cèl.lules tenen un nucli gran, que està disposat a alçades diferents en cèl.lules adjacents. En la zona central

activa, es poden veure petits glòbuls de citoplasma que possiblement tenen un paper en la secreció luminal, que provindrien de la línia de cèl.lules secretores. En canvi, les cèl.lules secretores de la zona perifèrica, de la zona de transició i de les glàndules periuretrals tenen uns nuclis petits que estan localitzats a la part basal de les cèl.lules. Aquestes cèl.lules tenen un citoplasma pàlid, degut a que conté vacuoles clares.

### VI.5. La Hiperplàsia Benigna de Pròstata (BHP)

La Hiperplàsia Benigna de Pròstata (BPH) és la malaltia més comuna entre els homes grans. El 80% dels homes més grans de 40 anys pateixen les conseqüències urodinàmiques de la BPH (obstrucció urinària). La teràpia més utilitzada en els estadis més avançats és la quirúrgica, consistent en la ressecció transuretral de la pròstata. La BPH és desenvolupa de manera majoritària a la part interna de la zona central així com a la zona de transició, mentre que el 80% dels càncers es desenvolupen a la part externa de la zona perifèrica (Figura 39).



**Figura 39.** Glàndules hiperplàsiques amb cèl.lules luminals/secretores de l'hiperplàsia benigna de pròstata. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

La hiperplàsia parauretral no es desenvolupa si abans de la pubertat es castra l'individu, fins i tot, si es pateix la malaltia i es castra l'individu aquesta regressiona per complet (Aumüller, G. 1992). Aquestes dades indiquen que la causa de la BHP podria ser hormonal, a més d'estar combinada amb el procés d'envelliment. L'androgen que és actiu a la pròstata és la dihidrotestosterona (DHT), que s'obté a partir de la T, mitjançant una reducció que catalitza l'enzim 5 $\alpha$ -reductasa. Aquesta DHT s'uneix als seus receptors i

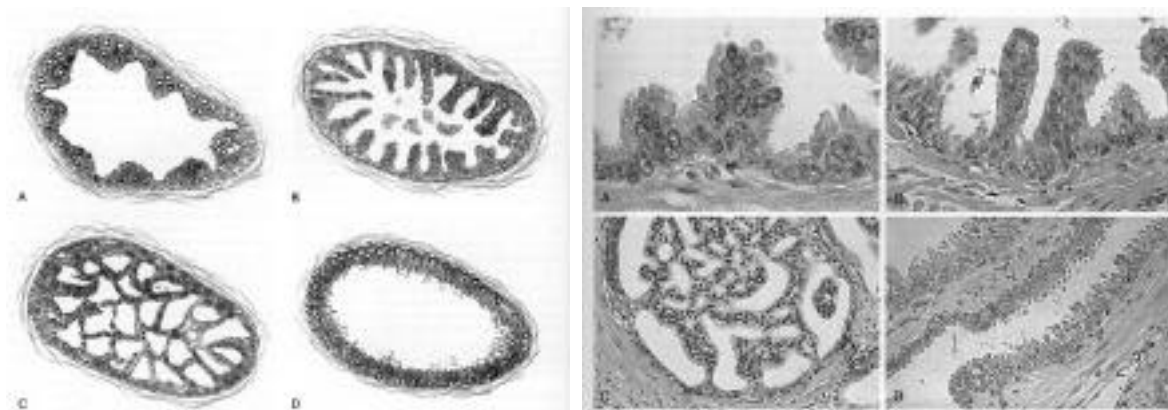
s'acumula a l'interior del nucli de les cèl.lules epitelials, activant la síntesi de RNA, DNA i proteïnes. La catabolització de la DHT acabarà donant el 3 $\alpha$ -androstane-20-one que té uns efectes androgènics molt potents. Tant la pròstata normal com la BPH contenen DHT, tot i que a la BPH s'acumula DHT i 3 $\alpha$ -androstane-20-one. Els estrògens semblen jugar un paper important, com a mínim en els gossos, que desenvolupen una hiperplàsia semblant a la dels humans. En aquests animals s'han trobat nivells d'estrògens plasmàtics elevats. La prolactina també sembla que juga un paper important en el desenvolupament de la BPH. Anàlisi recents permeten indicar que la BPH està lligada als continus canvis en el metabolisme androgènic que es donen durant l'envelliment. Mentre que la producció de DHT, per part de l'estroma, es manté constant durant tota la vida, l'epiteli va perdent a mesura que passen els anys la capacitat de transformar la T en DHT.

Per una altra banda, la BPH pot ser el resultat d'una alteració en el balanç hormonal, és a dir, per canvis en la relació estrògens/andrògens, ja sigui per estimulació de T, DHT o estrògens. Els factors de creixement poden jugar un paper molt important en la regulació de les activitats de les cèl.lules epitelials i estromals en la BPH (Aumüller, G. 1992; Aumüller, G. 1989). Dins dels factors de creixement de la glàndula prostàtica, jugarien un paper important l'EGF, el bFGF i els factors de creixement transformants (TGF- $\beta$  i TGF- $\alpha$ ). L'EGF estimula la proliferació de les cèl.lules epitelials. Els nivells alts d'andrògens disminueixen l'expressió del receptor d'EGF i els nivells molt baixos d'EGF provoquen una involució de les cèl.lules epitelials. Els nivells de bFGF són elevats en les BPH si es comparen amb el teixit normal de la pròstata, a més, és un agent mitogènic en cèl.lules de pròstata humanes en cultiu. El TGF- $\beta$  és un factor de creixement autocrí i paracrí que s'ha trobat tant a BPH com a carcinoma. Finalment el TGF- $\alpha$ , en absència d'EGF, indueix apoptosi en l'epiteli prostàtic, a més d'inhibir la proliferació en cultius de cèl.lules prostàtiques humanes.

## **VI.6. La Neoplasia Intraepitelial Prostàtica i el Càncer (PIN)**

La Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica (PIN) es caracteritza per una proliferació cel.lular en els conductes i acins ja existents, amb canvis citològics que mimetitzarien al càncer, com l'augment de tamany tant del nucli com del nuclèol. En un 85% dels casos aquets PIN coexisteix amb un càncer, tot i que el PIN manté intacte o de manera fragmentada la capa de cèl.lules basals, que en el càncer desapareix (McNeal, J.E. 1988; Schmid, K.W. et al. 1994; Aumüller, G. 1992). Hi ha 4 patrons arquitectònics de PIN: raïm,

micropapil·lar, cribiforme i pla (Figura 40). El patró en raïm és el més comú i és present en el 97% dels casos amb PIN i càncer, tot i que molts casos tenen patrons múltiples.

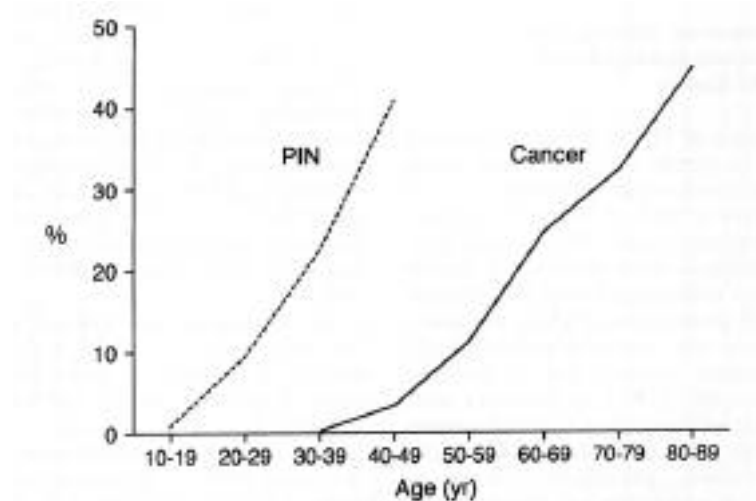


**Figura 40.** Patrons arquitectònics del PIN. A: patró raïm ; B: patró micropapil·lar; C: patró cribiforme i D: patró pla. (Foster. C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

Hi ha un lligam evident entre el PIN i el càncer. La incidència i extensió del PIN incrementa amb l'edat (Aumüller, G. 1989; Bostwick, D.G. et al. 1993; Benz, M. 1993; Helpap, B. 1995; Hedrick, L. and Epstein, J. 1989). La prevalència del PIN i el càncer també augmenta amb l'edat (Figura 41). Així, el PIN apareix en els homes a la segona o tercera dècada de vida (9% i 22% respectivament), i és el que precedeix al carcinoma, que apareixerà 10 anys més tard (Helpap, B. 1995; Wernert, N. et al. 1988; Bonkhoff, H. and Remberger, K. 1993).

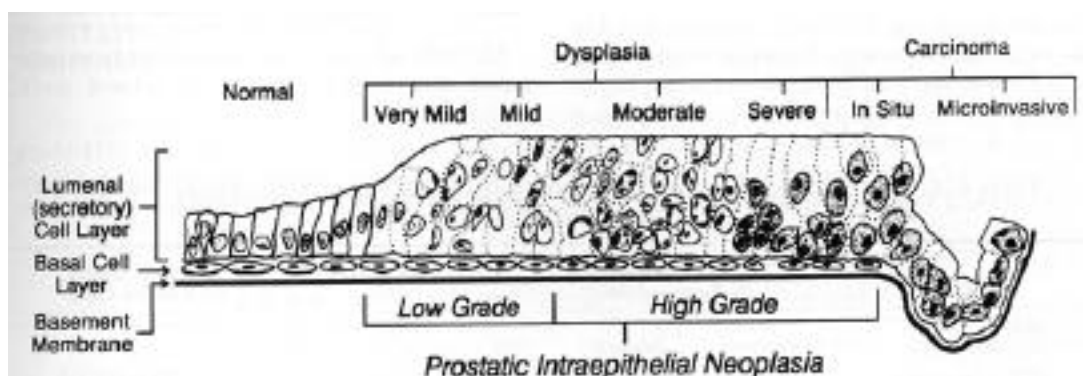
Igual que el càncer, el PIN és multifocal, i apareix majoritàriament en la zona perifèrica (Aumüller, G. 1993; Aumüller, G. 1989; Jones, E.G. and Harper, M.E. 1992; Benz, M. 1993; Bonkhoff, H. and Remberger, K. 1996; Montironi, R. et al. 1994), i de forma minoritària a la zona de transició (Aumüller, G. 1989; Jones, E.G. and Harper, M.E. 1992; Benz, M. 1993; Helpap, B. 1995; Hedrick, L. and Epstein, J. 1989; Bonkhoff, H. and Remberger, K. 1993).





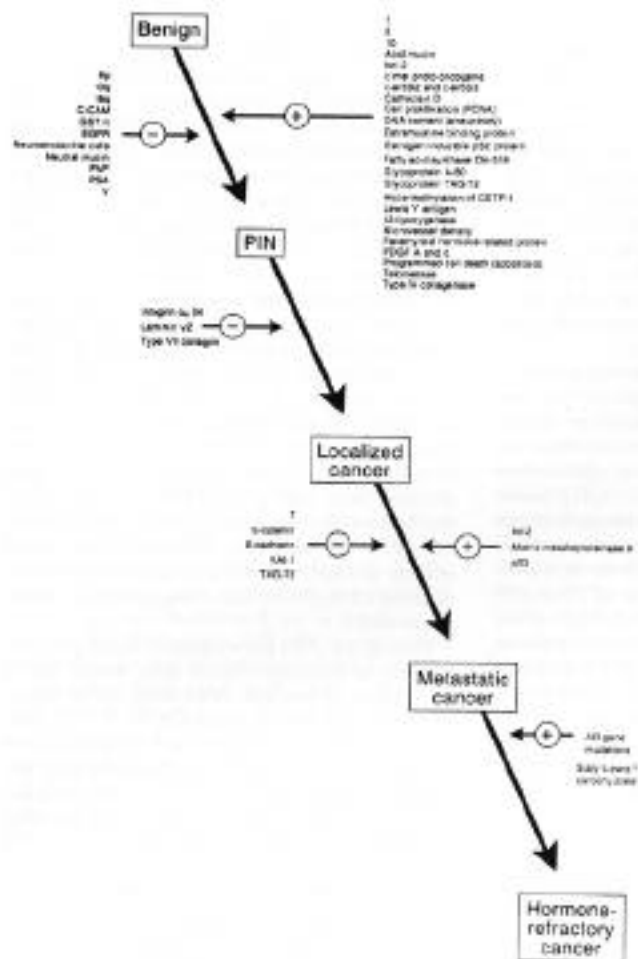
**Figura 41.** Freqüència del PIN i càncer de pròstata respecte a l'edat. Tenen increments paral·lels, però el PIN precedeix al càncer en 10 anys. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

L'increment del grau de PIN va associat a la progressiva disrupció de la capa de cèl·lules basals. Aquests estudis es porten a terme mitjançant marcatges immunohistoquímics amb l'anticòs contra la keratina 34 -E12. A l'epiteli d'una pròstata normal, es marca de manera continuada tota la capa de cèl·lules basals, en canvi a mesura que augmenta el grau de PIN, la disrupció de la capa de cèl·lules basals es fa més evident. S'ha vist que els carcinomes invassius que es troben en les primeres etapes apareixen en llocs on les glàndules pateixen una disrupció de la capa de cèl·lules basals. S'ha proposat un model per a la carcinogènesi de la pròstata basat en el fet de que el PIN evolucionaria morfològicament fins a donar lloc al càncer (Figura 42).



**Figura 42.** Canvis morfològics successius des de un epiteli prostàtic normal, passant pels diferents graus de PIN, fins a arribar al carcinoma invassiu. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

La disrupció de la capa de cèl.lules basals s'associa amb l'aparició del càncer i això va acompanyat d'una sèrie d'anormalitats en els marcadors de diferenciació secretora, un increment del nucli i alteracions a nivell del nuclèol, un increment de la proliferació cel.lular, una variació del contingut de DNA i un increment de la inestabilitat genètica. Alguns marcadors biològics pateixen un sobreexpressió durant el procés d'evolució de la BPH fins al PIN d'alt grau i càncer i d'altres pateixen una disminució o pèrdua total de l'expressió (Figura 43). Les dades obtingudes permeten assegurar que la majoria dels marcadors biològics pateixen un augment de l'expressió, tot i que la seva importància és desconeguda. Existeixen uns canvis importants d'expressió entre la BPH i el PIN d'alt grau, indicant que aquest pas seria important pel càncer que es pogués desenvolupar més tard. El PIN té una heterogeneïtat important en quant a marcadors genètics, a més d'una absència de diferenciació cel.lular i control hormonal. Només un número petit de canvis són introduïts en la progressió del PIN d'alt grau a càncer localitzat, càncer metastàtic i càncer refractari hormonal.



**Figura 43.** Canvis genètics i altres canvis associats a la progressió del càncer de pròstata. (Foster, C.S. and Bostwick, D.G. 1998)

**OBJECTIUS**

1. Estudiar les alteracions que provoca la sobreexpressió de la SHBG/ABP de rata en el testicle del ratolí transgènic que sobreexpressa aquesta proteïna.
  - a) Analitzar la progressió de l'espermatogènesi a nivell morfològic.
  - b) Determinar l'existència d'un augment de la mort cel.lular programada en el testicle dels ratolins transgènics respecte dels controls.
  - c) Analitzar les possibles alteracions en la proporció de les poblacions de cèl.lules germinals en els ratolins transgènics respecte dels controls.
  - d) Analitzar l'expressió dels diferents receptors d'hormones esteroidals i d'altres gens potencialment involucrats en el mecanisme d'acció de la SHBG/ABP, en els ratolins transgènics i en els controls.
  
2. Estudiar les alteracions que provoca la sobreexpressió de la SHBG/ABP humana en el testicle del ratolí transgènic que sobreexpressa aquesta proteïna.
  - a) Analitzar el tipus cel.lular del testicle responsable de l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP humana.
  - b) Analitzar la localització de la proteïna SHBG/ABP humana en el testicle.
  - c) Determinar l'existència d'un augment de la mort cel.lular programada en el testicle de les dues línies de ratolins transgènics i dels controls.
  
3. Estudiar la presència de la SHBG/ABP en mostres humanes de testicle i espermatozous.
  - a) Estudiar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP en el testicle.
  - b) Localitzar la proteïna de la SHBG/ABP en el testicle i en els espermatozous.
  
4. Analitzar l'expressió del mRNA i/o proteïna de la SHBG/ABP humana en mostres de pròstata humana.
  - a) Analitzar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP, del receptor d'estrògens beta i del P450 aromatasas en pròstates humanes normals.
  - b) Analitzar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP, del receptor d'estrògens beta i del P450 aromatasas en tumors de pròstata humans.
  - c) Analitzar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP, del receptor d'estrògens beta, del receptor d'estrògens beta cx, del receptor d'estrògens alfa, del receptor d'andrògens i del P450 aromatasas en les línies cel.lulars de pròstata humana

- normal (PZHPV-7 i CAHPV-10) i en les línies cel.lulars de pròstata humana normal androgen dependent (LNCaP) i androgen independent (PC3).
- d) Identificar els diferents *transcripts* de la SHBG/ABP que s'expressen a les línies cel.lulars tumorals PC3 i LNCaP.
  - e) Analitzar si les línies cel.lulars derivades de pròstata humana contenen proteïna de la SHBG/ABP i del receptor d'estrògens beta.
  - f) Determinar si el *transcript* majoritari de la SHBG/ABP que expressen les línies cel.lulars tumorals PC3 i LNCaP es secreta.