

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**CARACTERITZACIÓ D'UNA PROTEÏNA DE  
55 KDA ASSOCIADA A LA MATRIU NUCLEAR DURANT LA  
PROLIFERACIÓ CEL·LULAR**



Test doctoral presentada per Rosa Maria Aligué i Alemany  
per optar al grau de Doctora en Biologia

**Rosa Maria Aligué i Alemany**

**1991**

Barcelona, octubre de 1991

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**CARACTERITZACIÓ D'UNA PROTEÏNA DE  
55 KDA ASSOCIADA A LA MATRIU NUCLEAR DURANT LA  
PROLIFERACIÓ CEL·LULAR**

**Tesi doctoral presentada per Rosa Maria Aligué i Alemany  
per optar al grau de Doctora en Biologia**

**Barcelona, octubre de 1991**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció dels Dr. Oriol Bachs Valdeneu, en el Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Octubre 1991

***INDEX***

<b>1.-INTRODUCCIO</b>	<b>7</b>
1.1.- EL FETGE: Característiques generals . . . . .	7
1.2.- MÈTODES D'INDUCCIÓ PROLIFERATIVA HEPATOCEL.LULAR . . . . .	9
1.3.- LA REGENERACIÓ HEPÀTICA POST-HEPATECTOMIA PARCIAL. . . . .	10
1.3.1.- Paràmetres cinètics. . . . .	10
1.3.2.- Canvis moleculars durant el procés de regeneració hepàtica i possibles mecanismes de regulació de la replicació de l'ADN. . . . .	11
1.3.3.- Expressió d'oncogens durant la regeneració hepàtica. . . . .	30
1.3.4.- Factors reguladors negatius de la proliferació cel.lular. . . . .	32
1.4.- LA MATRIU NUCLEAR. . . . .	33
1.4.1.- Estructura i composició de la matriu nuclear. . . . .	33
1.4.2.- Replicació de l'ADN. . . . .	36
1.4.3.- Transcripció ARN. . . . .	39
<b>2.- OBJECTIUS</b>	<b>41</b>
<b>3. - MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>42</b>
3.1.- MATERIAL D'ESTUDI . . . . .	42
3.1.1.- Animals. . . . .	42
3.1.2.- Tècniques quirúrgiques. . . . .	42
3.1.3.- Administració <i>in vivo</i> d'antagonistes adrenèrgics. . . . .	43
3.1.4.- Cultius cel.lulars. . . . .	44
3.1.5.- Sincronització cultius cel.lulars . . . . .	44
3.1.6.- Marcatge de proteïnes de cèl.lules en cultiu amb metionina-S <sup>35</sup> . . . . .	45
3.2.- MÈTODES DE SUBFRACCIONAMENT CEL.LULAR . . . . .	46
3.2.1.- Subfraccionament cel.lular de teixit hepàtic . . . . .	46
3.2.1.1.- Obtenció nuclis i matriu nuclear . . . . .	46
3.2.1.2.- Obtenció de filaments intermedis . . . . .	48
3.2.2.- Subfraccionament cel.lular de cèl.lules en cultiu . . . . .	48
3.2.2.1.- Obtenció de nuclis . . . . .	48
3.2.2.2.- Obtenció de nuclis, matriu nuclear i citoesquelet <i>in situ</i> . . . . .	49

3.3.- MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES . . . . .	50
3.3.1.- Mètode Lowry . . . . .	50
3.3.2.- Mètode Lowry modificat . . . . .	51
3.3.3.- Mètode Bradford . . . . .	53
3.4.- OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS . . . . .	53
3.4.1.- Purificació de l'antigen . . . . .	53
3.4.2.- Electroelució de proteïnes . . . . .	54
3.4.3.- Procés d'immunització . . . . .	54
3.4.4.- Purificació d'anticossos policlonals. . . . .	57
3.4.4.1.- Purificació per columnes de proteïna A . . . . .	57
3.4.4.2.- Purificació per afinitat. . . . .	58
3.5.- ELECTROFORESI DE PROTEÏNES . . . . .	62
3.5.1.- Electroforesi en gels SDS-poliacrilamida . . . . .	62
3.5.2.- Electroforesi bidimensionals (2D-page) . . . . .	65
3.5.2.1.- Primera dimensió . . . . .	65
3.5.2.1.1.- IEF ( <i>Isoelectric focusing</i> ) electroforesi . . . . .	65
3.5.2.1.2.- NEPHGE ( <i>nonequilibrium pH gradient electrophoresis</i> ) electroforesi . . . . .	68
3.5.2.2.- Segona dimensió . . . . .	69
3.5.3.- Mètodes directes de detecció de proteïnes . . . . .	70
3.5.3.1.- Tinció amb Coomassie blue . . . . .	70
3.5.3.2.- Tinció amb plata . . . . .	71
3.5.3.3.- Fluorografia . . . . .	73
3.6.- IMMUNOTRANSFERÈNCIA . . . . .	74
3.7.- IMMUNOPRECIPITACIÓ . . . . .	78
3.8.- FOSFORIL·LACIÓ DE PROTEÏNES <i>IN VITRO</i> . . . . .	78
3.9.- MÈTODE D'IDENTIFICACIÓ DE RECEPTORS DE CALMODULINA . . . . .	79
3.9.1.- Marcatge de la calmodulina (CaM) amb I <sup>125</sup> . . . . .	79
3.9.2.- Identificació dels receptors de la calmodulina . . . . .	81

3.10.- MÈTODE D'IDENTIFICACIÓ DE PROTEÍNES ACCEPTORES D'ADN .....	82
3.11.- ANÀLISI DE SEQÜENCIA D'AMINOÀCIDS .....	83
3.12.- MAPATGE PEPTÍDIC EN GELS SDS-POLIACRILAMIDA ....	84
3.13.- MÈTODES IMMUNOCITOQÍMICS PER A MICROSCOPIA ÒPTICA .....	85
3.13.1.- Immunocitoquímica de teixit hepàtic .....	86
3.13.1.1.- Perfusió <i>in vivo</i> amb paraformaldehid i pre-inclusió amb parafina .....	86
3.13.1.2.- Congelació del teixit i post-fixació .....	91
3.13.2.- Immunocitoquímica de nuclis aïllats .....	93
3.13.3.- Immunocitoquímica de cèl.lules en cultiu .....	94
3.14.- MÈTODES IMMUNOCITOQÍMICS PER A MICROSCOPIA ELECTRÒNICA .....	97
3.14.1.- Immunocitoquímica de teixit hepàtic .....	97
3.14.1.1.- Post-inclusió en Lowicryl 4KM .....	97
3.14.1.2.- Crioultramicrotomia .....	101
3.14.2.- Immunocitoquímica de cèl.lules en cultiu .....	105
3.14.2.1.- Crioultramicrotomia .....	105
3.14.2.2.- Pre-inclusió de cèl.lules subfraccionades <i>in situ</i> . .....	106
3.15.- AUTORADIOGRAFIA CEL.LULAR .....	107
3.15.1.- Incorporació del precursor radioactiu .....	107
3.15.2.- Procés autoradiogràfic .....	108
3.15.2.1.- Emulsionat de les seccions .....	108
3.15.2.2.- Revelat i fixat. ....	109
3.16.- REVELAT DE NEGATIUS I REALITZACIÓ DE FOTOGRAFIES .....	109
<b>4.- RESULTATS</b>	<b>111</b>
4.1.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN TEIXIT HEPÀTIC .....	111

## INDEX

4.1.1.- Anàlisi electroforètica de la matriu nuclear durant l'activació proliferativa dels hepatòcits . . . . .	111
4.1.1.1.- Anàlisi unidimensional en gels SDS-poliacrilamida. . . . .	111
4.1.1.2.- Anàlisi bidimensional en gels SDS-poliacrilamida (IEF) . . . . .	112
4.1.2.- Purificació de la p55 . . . . .	114
4.1.3.- Obtenció d'anticossos policlonals anti-p55 . . . . .	115
4.1.4.- Immunolocalització de la p55 en fraccions subcel.lulars . . . . .	116
4.1.5.- Immunocitoquímica en nuclis aïllats amb l'anticòs anti-p55 . . . . .	117
4.1.6.- Immunocitoquímica en teixit hepàtic amb l'anticòs anti-p55. . . . .	118
4.1.7.- Immunocitoquímica amb l'anticòs anti-p55 combinada amb autoradiografia . . . . .	120
4.1.8.- Immunocitoquímica amb l'anticòs anti-p55 en cèl.lules hepàtiques en mitosi . . . . .	121
4.1.9.- Identificació de proteïnes acceptores d'ADN . . . . .	122
4.1.10.- Efecte dels antagonistes adrenèrgics sobre l'expressió de la p55 . . . . .	123
4.1.11.- Fosforilació <i>in vitro</i> de proteïnes de la matriu nuclear . . . . .	125
4.1.12.- Anàlisi de la seqüència d'aminoàcids . . . . .	127
4.1.13.- Immunocitoquímica en teixit hepàtic congelat amb anti-p55 i anti-citoqueratines emprant distints fixadors . . . . .	131
4.1.14.- Purificació de filaments intermedis de fetge de rata . . . . .	133
4.1.15.- Immunotransferència de distintes fraccions cel.lulars emprant els anticossos anti-p55 i anti-citoqueratina . . . . .	135
4.1.16.- Immunotransferències bidimensionals de les fraccions de matriu nuclear i filaments intermedis emprant l'anticòs anti-p55 . . . . .	139
4.1.17.- Mapatge peptídic de la p55 i la citoqueratina 8 . . . . .	140
4.1.18.- Immunocitoquímica de teixit hepàtic per a microscopia electrònica . . . . .	141
4.2.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN DISTINTS TEIXITS DE RATA . . . . .	142.
4.2.1.- Detecció de la p55 en diferents teixits de rata mitjançant immunotransferència. . . . .	142
4.2.2.- Estudi immunocitoquímic en testicle i cervell de rata emprant l'anticòs anti-p55 . . . . .	145.



4.3.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN DISTINTES CÈL.LULES EN CULTIU . . . . .	146.
4.3.1.- Detecció immunocitoquímica de la p55 en cèl.lules NRK 44F . . . . .	146
4.3.2.- Detecció de la p55 en cèl.lules NRK mitjançant immunotransferència . . . . .	150
4.3.3.- Anàlisi bidimensional de la p55 en les cèl.lules NRK . . . . .	151
4.3.4.- Detecció immunocitoquímica de la vimentina en les cèl.lules NRK . . . . .	154
4.3.5.- Detecció de la vimentina i la citoqueratina en mostres de cèl.lules NRK per immunotransferència . . . . .	156
4.3.6.- Anàlisi bidimensional de la vimentina en les cèl.lules NRK per immunotransferència. . . . .	158
4.3.7.- Immunocitoquímica de la p55 en altres tipus cel.lulars en cultiu . . . . .	159
4.3.8.- Detecció per immunotransferència de les proteïnes reconegudes per a l'anticòs anti-p55 en distintes línies cel.lulars . . . . .	162
4.3.9.- Estudis de localització de la p55 en l'estructura matriu nuclear-filaments intermedis de distintes línies cel.lulars en cultiu . . . . .	165
4.3.10.- Anàlisi de la localització de la p55 en les cèl.lules NRK mitjançant microscopia confocal . . . . .	168
4.3.11.- Immunolocalització de la p55 en cèl.lules NRK per microscopia electrònica . . . . .	168
5.- DISCUSSIÓ	170
6.- CONCLUSIONS	193
7.- BIBLIOGRAFIA	195

# ***1. INTRODUCCIÓ***

## 1.1.- EL FETGE: CARACTERÍSTIQUES GENERALS.

El fetge dels mamífers adults representa aproximadament el 2.5% del pes corporal. És un òrgan implicat en nombroses funcions fisiològiques importants com són: síntesi i secreció de bilis, proteïnes sèriques; processos de detoxificació, fabricació d'urea, i processos de biotransformació de la població xenobiòtica, drogues i metabolits endògens.

El fetge està format per un conjunt de cèl.lules epitelials que constitueixen el 85% del volum total de l'òrgan. El 15% restant està ocupat pels espais intracel.lulars: 10% per capilars sinusoidals, 4.5% per espais de Disse i el 0.5% per conductes biliars (Evans W.H. 1980). Es poden diferenciar quatre tipus cel.lulars morfològica i funcionalment diferents:

- cèl.lules del parènquima hepàtic o hepatòcits, ocupen el 70% del volum total del fetge.
- cèl.lules endotelials que ocupen el 2.8% del volum total.
- cèl.lules de Kupffer, formen part del sistema fagocitari mononuclear i ocupen el 2.1% del volum total.
- cèl.lules d'Ito o cèl.lules emmagatzemadores de greix (*fat-storing cells*), ocupen el 1.4%.

L'organització estructural del fetge és especial i està adaptada a les nombroses funcions que desenvolupa. Els hepatòcits, són cèl.lules polièdriques que s'organitzen formant cordons cel.lulars orientats al voltant de les venes centrals hepàtiques. Entre cèl.lula i cèl.lula dels cordons cel.lulars s'obre un sistema de canals secretors o canalículs biliars. Les cèl.lules endotelials delimiten els capilars sinusoidals i envolten els cordons d'hepatòcits. Entre les cèl.lules endotelials es localitzen les cèl.lules de Kupffer. L'espai entre les cèl.lules endotelials i els hepatòcits és l'espai de Disse i és on es localitzen les cèl.lules d'Ito (fig. 1).

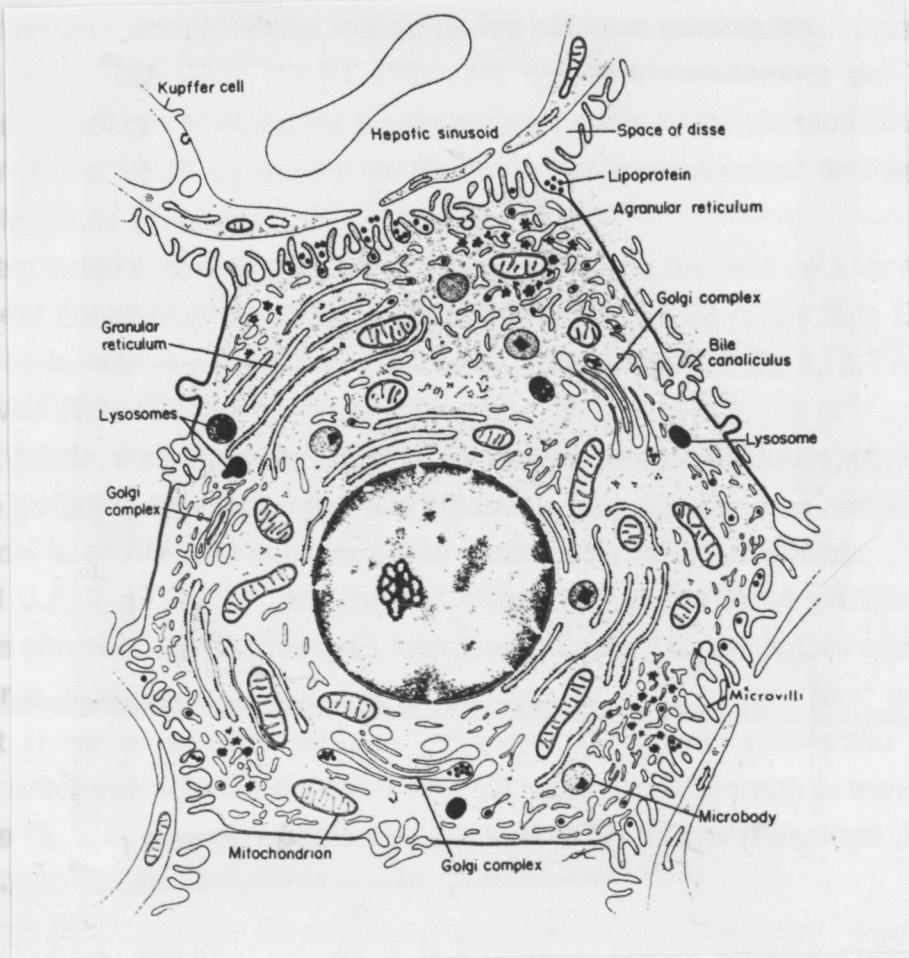


Figura 1.- Dibuix d'un hepatòcit observat al microscopi electrònic (Bloom W. i Fawcett D.W.).

## 1.2.- MÈTODES D'INDUCCIÓ PROLIFERATIVA HEPATOCEL·LULAR.

Fonamentalment s'utilitzen quatre mètodes per induir l'activació de la proliferació cel·lular en el fetge dels animals adults.

Des del punt de vista funcional, el fetge s'organitza en unitats bàsiques anomenades acinus (Rappaport A.M. 1975, 1980). L'acinus (fig.2) es defineix com una agrupació irregular de cèl·lules que envolten l'eix d'una vena portal, una arteriola hepàtica i un conducte biliar. Aquests tres elements formen l'espai portal. temporal sense produir àrees de necrosi (Short J. i al. 1972).

Els hepatòcits dels mamífers adults, són cèl·lules molt diferenciades que presenten una activitat proliferativa extraordinàriament baixa. En la rata l'índex mitòtic és aproximadament de  $1 \cdot 10^{-4}$  (Bucher N.L.R. i Malt R.A. 1971). La majoria de les cèl·lules del fetge adult resten aturades en la fase  $G_0$  del cicle cel·lular (Lajtha L.G. 1963).

Pel contrari, durant el desenvolupament embrionari i durant les primeres setmanes després dels naixement, l'índex mitòtic de les cèl.lules parenquimàtiques és més elevat. A les 3 setmanes d'edat s'observa que aproximadament del 7% dels hepatòcits sintetitzen ADN, i a les 8 setmanes, el percentatge disminueix a l'1.5%. Posteriorment el nivell de síntesi va disminuint progressivament fins assolir els valors dels adults (Bucher N.L.R. i Malt R.A. 1971).

Malgrat aquestes variacions de l'índex mitòtic, la durada del cicle cel.lular es manté relativament constant amb valors d'aproximadament 21-22 h. La fase G<sub>1</sub> ocupa entre 8.5 i 9 h, la fase S unes 9 h, i la fase G<sub>2</sub> més la mitosi entre 3 i 3.5 h (Bucher N.L.R. i Malt R.A. 1971).

Per altra banda, els hepatòcits adults, igual que altres tipus cel.lulars, contenen els gens que porten la informació per a la biosíntesi dels components necessaris per que es doni la proliferació cel.lular en un estat de repressió reversible (Whitfield J.F. i al. 1979). Així doncs, des del punt de vista proliferatiu, els hepatòcits són cèl.lules inactives, els manquen el conjunt de molècules necessàries per iniciar la replicació de l'ADN i la divisió cel.lular, però poden ésser activades, i per tant entrar en el cicle cel.lular, mitjançant un estímul proliferatiu com per exemple, una hepatectomia parcial. L'estímul proliferatiu permetrà la transició des de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> i posteriorment la fase S i mitosi (Fabrikant J.I. 1968, Grisham J.W. 1962).

## 1.2.- MÈTODES D'INDUCCIÓ PROLIFERATIVA HEPATOCÉL.LULAR.

Fonamentalment s'utilitzen quatre mètodes per induir l'activació de la proliferació cel.lular en el fetge dels animals adults:

1- Administració, via endovenosa, d'una solució que conté triiodetironina, aminoàcids, glucagó i heparina (solució TAGH). Produeix hiperplasia hepàtica temporal sense produir àrees de necrosi (Short J. i al. 1972).

2- Administració de productes químics necrogènics tals com el tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>). Produeix la destrucció del fetge en les zones perivenoses dels acinus hepàtics (Alison M.R. 1986).

3- Activació mitjançant un canvi de dieta. Després de mantenir durant tres dies

rates adultes amb una dieta absent de proteïnes, es canvia la dieta per una altra rica amb proteïnes, es produeix una resposta proliferativa important.

4- Hepatectomia parcial. Consisteix en l'extirpació dels lòbuls esquerra i mig del fetge (2/3 parts de la massa hepàtica) (Higgins G.M. i Anderson R.M. 1931). L'extirpació del 70% de fetge produeix una resposta proliferativa important amb un percentatge de supervivència pràcticament del 100%.

Apart dels mètodes experimentals d'inducció, la proliferació hepàtica pot donar-se en condicions naturals tals com per exemple, hepatitis víriques, cirrosi, reaccions hepatotòxiques i en necrosis massives del fetge.

### **1.3.- LA REGENERACIÓ HEPÀTICA POST-HEPATECTOMIA PARCIAL.**

#### **1.3.1.- Paràmetres cinètics.**

La regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial, ha estat el mètode experimental més utilitzat per a l'estudi dels mecanismes de control de la proliferació dels hepatòcits *in vivo*.

La pèrdua important de massa hepàtica provoca una resposta regenerativa. Aquesta depèn del percentatge de teixit hepàtic estirpat, així com d'altres factors tant exògens com endògens. Normalment, amb una hepatectomia parcial del 70% s'aconsegueix una resposta regenerativa important amb un percentatge de supervivència molt elevat (Bucher i Swaffield 1964, Bucher 1967, Weinbren i Taghizadeh 1965, Goss R.J. 1965). Altres factors que poden modificar les característiques de la resposta proliferativa són: l'edat, el sexe i el pes de l'animal, i l'hora del dia en que es practica l'hepatectomia parcial (Liozner L.D. 1974, Bucher i al. 1964). Per tant és necessari estandaritzar les condicions experimentals per a la reproduïbilitat del model.

L'hepatectomia parcial provoca un creixement hipertròfic i hiperplàsic dels lobuls hepàtics remanents, sense que es doni cap procés de desdiferenciació cel.lular. (Fausto N. i al. 1976, 1989, Michalopoulos G.K. 1990).

L'activació proliferativa post-hepatectomia parcial desencadena en les cèl.lules hepàtiques remanents una transició de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub>, i una posterior entrada a la fase S i mitojsi.

La resposta proliferativa afecta a tots els tipus cel.lulars del fetge. S'observa un increment de l'índex mitòtic en els hepatòcits i posteriorment, amb un retard entre 24-72 h, en els altres tipus cel.lulars (Fausto N. i al 1989). En els hepatòcits, l'inici de la síntesi d'ADN comença a les 16h després d'una hepatectomia parcial, assolint el valor màxim (30-40%) a les 24 h després de la intervenció quirúrgica (Fabrikant J. 1968, Grisham J.W.C. 1962 i 1969, Whitfield J. i al. 1980). L'activitat mitòtica comença a observar-se al voltant de les 22 h post-hepatectomia parcial i el percentatge màxim s'obté a les 27-28 h (Carter D.B. i al. 1956, Fabrikant J. 1968, Whitfield J. i al. 1980). Després d'arribar als valors màxims, ambdós índex proliferatius disminueixen fins assolir-se valors similars als controls (fig.3). El procés regeneratiu s'atura als 7-10 dies post-hepatectomia, moment en que la massa hepàtica assoleix els valors originals del fetge normal (Bucher N.L.R. i al. 1971, Gerhard H. 1975, Grisham J.W. 1962).

Evidències experimentals indiquen que per a restituir la massa hepàtica estirpada és necessari que la totalitat dels hepatòcits es divideixin com a mínim una vegada (Alison M.R. 1986, Michalopoulos G.K. 1990), donant-se una segona divisió en alguns grups d'hepatòcits (Serratosa J. 1985, Grisham J.W. 1969).

Durant les primeres 24 h de regeneració, s'observa una distribució concreta de les cèl.lules proliferants. Malgrat l'activació proliferativa post-hepatectomia parcial és un procés relativament sincrònic, s'observa una distribució preferent de les cèl.lules activades durant les primeres 24 h de regeneració, per les zones periportals dels acinus hepàtics (Fabrikant J.I. 1967). A les 48 h de regeneració la distribució ja és a l'atzar.

### **1.3.2.- Canvis moleculars durant el procés de regeneració hepàtica i possibles mecanismes de regulació de la replicació de l'ADN.**

L'activació proliferativa que es desencadena després d'una hepatectomia parcial, provoca en els hepatòcits remanents, la transició de l'estat quiescent a la fase G<sub>1</sub> i la posterior progressió del cicle cel.lular. Aquesta transició és un punt clau en qualsevol procés d'activació proliferativa i depèn de senyals extracel.lulars que interaccionen amb receptors específics de la membrana plasmàtica, engegant els mecanismes de transducció cap a l'interior de la cèl.lula, o de factors que atravessen la membrana plasmàtica per activar receptors citoplasmàtics i/o nuclears.

Les fites que es pretenen assolir amb l'estudi de l'activació proliferativa post-hepatectomia parcial, es resumeixen en tres (Fausto N. i al. 1989):

- a) identificació de senyals externes intrahepàtiques, implicades en el desencadenament de la resposta proliferativa i en el control d'aturada.
- b) identificació dels marcadors que corresponen als punts claus dels esdeveniments implicats en l'entrada dels hepatòcits al cicle cel.lular, i la posterior progressió de la síntesi d'ADN.
- c) identificació de les relacions entre les senyals positives o negatives de la proliferació i els esdeveniments més importants de la resposta replicativa (es a dir, determinar les connexions entre a i b).

A continuació s'han analitzat els coneixements actuals sobre la regeneració hepàtica a nivell molecular des de l'entrada dels hepatòcits al cicle cel.lular fins la síntesi d'ADN. Període que comprèn les fases pre-replicativa i replicativa, i en el qual es poden diferenciar tres etapes, que reuneixen els esdeveniments que donen lloc a les reaccions tant de creixement cel.lular com d'inici de la replicació de l'ADN.

### **Primera etapa:**

Aquesta primera etapa, que s'extèn durant les primeres 10 h post-hepatectomia parcial, es caracteritza pel desencadenament de l'activació proliferativa deguda a senyals extracel.lulars i les reaccions inicials que aquestes provoquen. Els canvis moleculars associats a la primera etapa es resumeixen en el següent esquema:

#### Factors extracel.lulars

- Disminució del nivells de calci extracel.lulars.
- Increment dels nivells de vasopresina.
- Acció de catecolamines.
- Acció de la insulina i el glucagó.
- Acció del factor de creixement hepàtic (HGF).
- Acció de la triiodetironina.
- Augment dels nivells del factor de creixement epidèrmic (EGF).



### Canvis en la membrana plasmàtica

- Augment de la fosforil.lació de proteïnes de membrana.
- Disminució dels receptors de glucagó i EGF.
- Augment dels receptors d'insulina.
- Activació de la fosfolipasa  $A_2$  dependent de  $Ca^{2+}$  ( $PLA_2-Ca^{2+}$ ).
- Increment dels receptors per a la vasopresina ( $VP_1$ ) que activen a la fosfoinositidasa C (PIC).
- Activació de la PLC (fosfolipasa C).
- Activació de la fosfoinositidasa C (PIC).
- Canvis específics de glicoproteïnes de membrana.
- Disminució d'àcid siàlic.
- Activació de l'adenil ciclase (AC) per acció de la tiroxina.
- Activació de PIC i adenil ciclase (AC) per l'acció de l'àcid araquidònic.
- Increment de la captació d'aminoàcids.
- Increment dels nivells de GMPc.

### Canvis intracel.lulars

- Increment de  $Ca^{2+}$ .
- Increment de la producció de prostaglandines,  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$ , a partir de l'àcid araquidònic.
- Increment de l'activitat  $PLA_2-Ca^{2+}$ .
- Activació de la via d'inositols fosfat ( $PtdIns(4,5)P_2$ ).
- Primer increment d'AMPc.
- Primer increment de calmodulina (CaM).
- Increment de proteïnes quinases dependents d'AMPc.
- Increment de proteïnes quinases dependents de  $Ca^{2+}$ -CaM, en el nucli.
- Activació del trencament del  $PIP_2$  (fosfatidil inositol 4,5, difosfat) en diacil glicerol (DAG) i Inositol 4,5, difosfat ( $IP_2$ ), per acció de la PLC.
- Increment de l'inositol ( $1,4,5$ ) $P_3$ , per fosforil.lació de  $PI_2$ , que activa l'alliberament de calci dels calciosomes.
- Increment de l'activitat L-ornitina descarboxilasa (OCD).
- Increment de poliamines degut a l'activitat de l'OCD, enzim regulador de la biosíntesi de poliamines.
- Increment de la biosíntesi de proteïnes.
- Increment de l'ARN total, (ARNm i ARNr).

- Increment activitat proteïna quinasa S6.
- Increment de l'expressió dels gens c-fos i c-myc.

Hi han bastants evidències que indiquen que el sèrum de rates hepatectomitzades conté substàncies capaces d'estimular la síntesi d'ADN en els hepatòcits (Whitfield J.F. i al. 1973, Rixon R.H. i al. 1971, Rixon R.H. i al. 1970, Yamaguchi D.T. 1987). Aquests components del sèrum s'han associat a distintes hormones, neurotransmisors i factors de creixement (d'origen hepàtic o extrahepàtic) (McManus i Whitfield 1969, Leffert H.L. i al. 1979). No obstant, no existeix un coneixement clar de quins són els factors fonamentals que regulen el procés proliferatiu.

La infusió d'una barreja de triiodetironina, aminoàcids, glucagó i heparina (solució TAGH), produeix un augment de la síntesi d'ADN en les cèl.lules del parènquima hepàtic (Short J. i al. 1972). L'element clau per desencadenar l'activació proliferativa, d'aquesta barreja, és la triiodetironina.

Les catecolamines també tenen un paper important en la proliferació hepatocel.lular. Es sap que la noradrenalina inhibeix la resposta proliferativa després d'una hepatectomia parcial, en canvi l'acetilcolina l'activa (Kato H. i al. 1983). No obstant, s'han obtingut resultats contraris en cultius primaris d'hepatòcits (Cruise J.C. i al. 1985).

Un altre factor capaç d'incrementar la síntesi d'ADN en els hepatòcits de rates normals és, el factor de creixement hepàtic (HGF), inicialment anomenat l'hepatotropina (Nakamura i al. 1984) o hepatopoietina (Michalopoulos i al. 1983). És una proteïna àcida de pes molecular entre 100-150 KDa, purificada del sèrum de rates regenerants post-hepatectomia parcial per diversos laboratoris (Nakamura T. i al. 1987, Gohda E. i al. 1988, Zarnegar R. i al. 1989, 1989a), i deduïda llur estructura primària a partir dels clons de cDNA (fig.4) (Miyazawa K. i al. 1989).

Els nivells dels ARNm del HGF, presenten un gran increment entre les 3-6 h post-hepatectomia parcial, assolin valors màxims a les 12 h, moment en el qual comencen a disminuir fins arribar a nivells indetectables al voltant de les 72-96 h post-hepatectomia parcial. Donat que la síntesi d'ADN presenta el pic màxim a les 24 h post-hepatectomia, 12 h després del pic d'expressió d'ARNm de HGF, s'ha suggerit que el HGF podria ésser una de les senyals primerenques més importants

en el desencadenament de la proliferació hepàtica.

Evidències experimentals indiquen que el HGF indueix una ràpida fosforil·lació de determinades proteïnes, lo qual suggereix que receptors de tirosines quinases deuen ésser els mediadors de la senyal mitogènica (Rubin J.S. i al. 1991). També s'ha descrit que l'efecte del HGF es dona a través d'un únic tipus de receptor (Zarnegar R. i al. 1990).

Estudis recents presenten la identificació del receptor de HGF (Bottaro D.P. i al. 1990), el qual consisteix en una proteïna de 145 KDa identificada com la subunitat  $\beta$  del protooncogen c-met. El protooncogen c-met està format per dues subunitat: la subunitat  $\alpha$  extracel·lular, i la subunitat  $\beta$  formada per un domini extracel·lular, un domini transmembrana i amb dominis d'unió a tirosines quinases (Giordano S. i al. 1989, Tempest P.R. i al. 1986). S'ha descrit que el HGF actua fosforil·lant la proteïna c-met pels residus de tirosina (Bottaro D.P. i al. 1990).

El factor de creixement epidèrmic (EGF), apareix molt aviat després de practicar una hepatectomia parcial. L'EGF pot desencadenar l'augment de glucagó i AMPc i estimular hepatòcits quiescents, però els seus nivells en circulació portal apareixen incrementats en la fase pre-replicativa de la segona etapa (Francavilla A. i al. 1986), per tant no pot ésser considerat de les senyals inicials que desencadenen la proliferació (Armato U. 1983, Armato U. i al. 1982, Draghi E. i al. 1980, Leffert H.L. 1974).

També s'han descrit factors que, malgrat no activar la proliferació cel·lular, són importants per la potenciació de la mateixa, com és el cas de la insulina i el glucagó (Bucher N.L.R. i al. 1983). A les 2 h post-hepatectomia parcial s'observa un augment dels nivells de glucagó (Cornell R.P. 1985), als quals s'associa com a resposta, l'alliberament de calcitonina que disminuirà el  $Ca^{2+}$  circulant en plasma. Els nivells d'insulina en la circulació portal, decauen a les 2 h de regeneració hepàtica post-hepatectomia. Però aquest efecte ve compensat per un increment de receptors actius d'insulina en la superfície de les cèl·lules, abans d'ésser inactivats per *down-regulation* (Cornell R.P. 1985, de Hemptine B. i al. 1983, Leffert H.L. i al. 1979, Leffert H.L. i al. 1983).

La decaiguda dels nivells de calci extracel·lulars és una característica de l'activació proliferativa post-hepatectomia parcial (Rink T.J. i al. 1990). Els nivells de calci decauen fins un valor de 1.0 mg/100 ml de plasma, a les 6 h post-hepatectomia

parcial (Whitfield J.F. i al. 1973a).

Experimentalment s'ha demostrat que rates hipocalcèmiques, sotmeses a hepatectomia parcial no presenten resposta proliferativa (Whitfield J.F. i al. 1976, Asherson G.L. i al. 1970).

Totes aquestes dades indiquen que la resposta regenerativa esta regulada probablement per més d'un factor, i que els diferents factors hepatotròfics, hormones, ions i neurotransmisors, intervenen conjuntament en el control de la resposta proliferativa, encara que es important destacar l'específica estimulació del factor de creixement hepàtic, el qual sembla jugar un paper fonamental en la resposta proliferativa hepàtica, enfront a altres factors de creixement que apareixen com a respostes tardanes de la regeneració, o a factors no completament mitogènics.

En aquesta primera etapa es donen nombrosos canvis moleculars a nivell de membrana plasmàtica com a resultat de l'interacció dels factors hepatotròfics circulants, amb els hepatòcits.

S'han descrit modificacions en la composició proteica de la membrana plasmàtica, així com en el nombre de receptors hormonal i de factors de creixement. A les 8 i 24 h després de l'hepatectomia parcial, s'ha demostrat que hi ha una disminució en el nombre de receptors per l'EGF (Earp H.S i al. 1981), receptors de glucagó (Leffert H.L. 1977) i de les asialoproteïnes (Howard D.J. i al. 1982), a les 24 h hores. Contràriament, i tal com ja s'havia esmentat, el nombre de receptors per a la insulina augmenta, arribant a valors màxims a les 24 h (Pezzino V. i al. 1981).

L'augment dels receptors de la insulina en la superfície dels hepatòcits està relacionat amb l'activació dels transport de metabolits (glucosa i aminoàcids) i ions, a través de la membrana plasmàtica (Fehlman H. i al. 1979, Kig G.L. i al. 1985, Moore R.D. 1983), fets associats al desencadenament de la síntesi de proteïnes i d'ADN.

S'han detectat també, canvis en el patró de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica dels hepatòcits regenerants. A les 6 h post-hepatectomia parcial apareixen 4 noves glicoproteïnes, concretament en la membrana plasmàtica de la regió sinusoidal de l'hepatòcit (Enrich C. i al. 1985).

Una altra modificació interessant detectada en la membrana plasmàtica és la

disminució d'àcid siàlic (Enrich C. i al. 1984). La disminució afecta essencialment a glicoproteïnes específiques (Enrich C. i al. 1985) i pot tenir importància en dos aspectes concrets: en el paper que té l'àcid siàlic en el reconeixement i adhesió cel·lulars (Jeanloz R.W. i al. 1976), i llur possible relació amb altres esdeveniments pre-replicatius. S'ha demostrat que existeix una correlació entre la disminució d'àcid siàlic en la membrana plasmàtica i l'increment citosòlic de calmodulina (Coll M.J. i al. 1986). També s'ha observat que la calmodulina inhibeix específicament a la UDP-N-acetil-D-glucosamina 2'-epimerasa, un enzim clau de la via anabòlica de l'àcid siàlic. La desialització de la membrana plasmàtica també pot afectar l'activitat específica de determinats enzims.

També es detecta la fosforil·lació de determinades proteïnes durant la primera etapa de la regeneració hepàtica. La fosforil·lació de proteïnes de membrana és un dels mecanismes implicats en la transducció i distribució de senyals, i afecta directament l'activitat i distribució de receptors. A les 8 h post-hepatectomia, s'ha observat la fosforil·lació de tres proteïnes de membrana deguda a quinases independents d'AMPc però activables per  $Ca^{2+}$  (MacManus J.P. and Whitfield J. 1981).

Una de les alteracions del sistema de transport de metabolits que s'observa en aquesta primera etapa és el sistema A de transport d'aminoàcids. Aproximadament a les 2 h post-hepatectomia parcial es detecta un increment en el transport d'aminoàcids cap a l'interior de la cèl·lula, assolint valors màxims entre les 6-8 h (Short J. i al. 1975). El sistema de transport associat a aquest increment és el sistema A, que transporta alanina, prolina, serina, glicina, metionina i l'aminoàcid no metabolitzable alfa-aminoisobutirat (Guidotti G.G. 1978). Aquest transport és dependent de  $Na^+$ . El bloqueig de l'entrada de sodi, mitjançant l'administració d'amilorida durant la regeneració hepàtica, inhibeix el transport d'aminoàcids, la biosíntesi de proteïnes i la replicació de l'ADN.

Durant les primeres hores de la regeneració hepàtica tenen lloc canvis en altres sistemes de transport que s'associen a l'adequació funcional del fetge romanent i no estan implicats en la iniciació de l'activitat sintètica de l'ADN.

L'activitat específica de nombrosos enzims de la membrana plasmàtica també esdevé modificada durant les primeres hores de la regeneració hepàtica. Tenint en compté el canvis relacionats clarament amb la iniciació de la síntesi d'ADN, s'observa un primer increment de l'activitat adenil ciclasa (AD) entre les 2-4 h de regeneració post-hepatectomia. Aquest primer augment està correlacionat amb el

primer augment d'AMPc intracel.lular observat entre les 2-4 h. Apart d'aquesta correlació entre l'adenilat ciclase i l'AMPc, s'ha observat que el primer increment de l'AD és també sensible a la tiroxina, la qual pot provocar un augment de l'activitat específica de l'AD a les 2-4 h post-hepatectomia (Leoni S. i al 1975).

També s'observa un augment en l'activitat de la fosfoinositidasa C (PIC). L'activitat de la PIC incrementa per l'acció d'algun mitògen o senyal de la primera etapa de la regeneració. L'activació de PIC, catalitza el trencament del fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) en inositol-4,5- difosfat (IP<sub>2</sub>) i diacilglicerol (DG). L'IP<sub>2</sub> es fosforila donant lloc a inositol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i aquest actua movilitzant els diposits de Ca<sup>2+</sup> intracel.lulars.

El desencadenament de la via dels inositols (Berridge M.J. i al. 1989) i l'alliberament del Ca<sup>2+</sup> intracel.lular, provoca una pèrdua de l'efecte del Ca<sup>2+</sup> extracel.lular. A partir d'aquest punt la disminució del calci extracel.lular sols afecta determinades respostes proliferatives com, l'activitat de les quinases dependents de Ca<sup>2+</sup>-CaM del nucli, en la primera etapa (Sikorska M. i al. 1983, Walker P.R. i al. 1981) i l'expressió de la subunitat C de les proteïnes quinases dependents d'AMPc, necessaries en la segona etapa (Rixon R.H. i al. 1989, Sikorska M. i al. 1985). L'activitat de les proteïnes quinases de la membrana plasmàtica i altres respostes inicials de la regeneració, no es veuen afectades per la disminució del calci extracel.lular (McManus J.P. i al. 1981, Walker P.R. i al. 1978, 1981).

Evidències experimentals, indiquen que les primeres senyals de Ca<sup>2+</sup> provoquen dos aconteixements moleculars: l'augment de quinases dependents de Ca<sup>2+</sup>-CaM al nucli dels hepatòcits regenerants, i l'activació de la fosfolipasa A2 dependent de calci (PLA<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup>).

A nivell intracel.lular, el fluxe inicial de calci afecta indirectament la síntesi de prostaglandines (Whitfield J.F. i al. 1972). A les 2 h post-hepatectomia parcial, s'observa un màxim en la síntesi de prostaglandines a partir de l'àcid araquidònic (PGEs i PGF<sub>2α</sub>), i aquest màxim es manté fins les 6 h (McManus J.P i al. 1976).

La síntesi de prostaglandines té lloc per l'activació de PLA<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup>, enzim responsable de la transformació d'àcid araquidònic en prostaglandines, i tal com s'ha indicat inicialment, enzim regulat per l'inicial flux de calci. La transformació de l'àcid araquidònic en PGEs i PGF<sub>2α</sub> es dona mitjançant dues vies diferents: la PGEs es forma per l'estimulació de l'adenil ciclase i la PGF<sub>2α</sub> per l'activació de PIC.

Les dues prostaglandines estimulen l'inici de la síntesi d'ADN amb la mateixa

eficiència en cultius primaris d'hepatòcits adults (Skouteris G.C. i al. 1988).

S'ha observat que la indometacina, que bloqueja totalment la resposta de PGEs, inhibeix la duplicació d'ADN (Whitfield J.F. i al. 1976). No obstant, quan s'administra PGE, no es reverteix la inhibició de la síntesi d'ADN. Aquest fet indica que la PGE no està implicada directament en la replicació de l'ADN. Però existeixen evidències que impliquen les prostaglandines en algun procés relacionat amb la posterior entrada dels hepatòcits a la fase mitòtica del cicle cel.lular (Rixon R.H. i al. 1982).

L'activitat de la L-ornitin descarboxilasa (ODC) comença a augmentar des de la primera hora de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial, assolint valors màxims a les 4 h, els quals es mantenen elevats fins les 16 h post-hepatectomia (Walker R.P. i al. 1978). S'ha suggerit que l'activitat de l'ODC durant el procés regeneratiu podria ésser induïda, en primer lloc per la interacció d'hormones amb la membrana plasmàtica de l'hepatòcit, i en segon lloc per el primer increment d'AMPc intracel.lular. Probablement la inducció d'ODC per AMPc es realitza a través de l'activació de proteïnes quinases dependents d'AMPc (Byus C.V. i al. 1977, Bachrach U. 1979).

L'ODC és l'enzim regulador de la síntesi de poliamines, i el responsable de l'acumulació intracel.lular d'aquestes, especialment de putrescina i espermidina. La putrescina i l'espermidina comencen a incrementar a partir de les 4 h post-hepatectomia, i presenten valors màxims a les 8-10 h (Snyder S.H. i al. 1970, Whitfield J.F. i al. 1976).

La funció de les poliamines s'associa a la síntesi, estabilització i funció dels àcids nucleics, especialment de l'ARN (Bucher N.L.R. i al. 1971), a la síntesi de proteïnes, i a l'estabilització i permeabilització de les membranes (Tabor i al. 1976). Evidències experimentals indiquen que el metabolisme de les poliamines és independent de la concentració de calci (Walker R.P. i al. 1978).

Per altra banda, l'ODC també està involucrada en la regulació de la síntesi d'ARN. L'augment de l'activitat d'ODC provoca un increment de la síntesi d'ARN durant la regeneració hepàtica.

L'ODC s'uneix a l'ARN polimerasa I produïnt un canvi conformacional de l'enzim, a partir del qual esdevé actiu (Manen C.A. i al. 1977). L'ODC estaria implicada en la síntesi de proteïnes observada després de l'hepatectomia parcial.

Immediatament després dels processos inicials, entre les 2-3 h post-hepatectomia parcial, es produeix un increment general de la síntesi d'ARN i de proteïnes (Fausto N. 1984, Friedman J.M. i al. 1984, Madujar C. i al. 1967). Evidències experimentals

indiquen, que malgrat aquests increments, no hi ha un procés de desdiferenciació dels hepatòcits, es a dir no hi han grans canvis qualitius en les poblacions d'ARN missatgers (ARNm) ni de les proteïnes cel.lulars (Fausto N. 1986).

L'increment d'ARN total es deu, principalment, a un augment de la síntesi d'ARNm i ARN ribosòmic (ARNr) (Bucher N.L.R. i al. 1971). A l'injectar antinomicina D, es produeix una inhibició de la resposta proliferativa, aquest fet indica que la síntesi d'ARNm és necessària per portar a terme la duplicació cel.lular (Sobczak J. i al. 1986). L'increment de la síntesi d'ARNr es detecta, a partir de les primeres hores de regeneració hepàtica fins a les 12 h, moment en el que s'assoleixen els valors màxims. Aquest període coincideix amb l'augment del nombre de ribosomes en els hepatòcits de rates regenerants (Bucher N.L.R. i al. 1971).

Entre les 3-5 h post-hepatectomia parcial, apareix un augment de l'activitat de la proteïna quinasa S6. La quinasa S6 fosforila la subunitat S6 dels ribosomes, per tal d'incrementar l'afinitat d'aquests pels complexos d'iniciació del procés de traducció.

L'increment de la proteïna quinasa S6 s'associa indirectament a l'augment de l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC) al final de la primera etapa i a l'augment de l'activitat dels receptors d'insulina, que actuen estimulants les proteïnes quinasas de tirosina (PK-tyr) (Traugh J.A. i al. 1986, Maller J.L. i al. 1985, Pelech S.L. i al. 1987).

A nivell intracel.lular també s'observen canvis en la concentració de nucleòtids cíclics. Durant la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica, es produeix un augment bifàsic de la concentració citosòlica d'AMPc. El primer increment assoleix els valors màxims entre les 2-4 h i el segon entre les 12-14 h post-hepatectomia parcial (McManus i al. 1972). La primera etapa de la regeneració engloba el primer increment d'AMPc.

S'ha descrit que l'injecció d'un antagonista  $\beta$ -adrenèrgic (D-L-propranolol) una hora després de l'hepatectomia parcial produeix una inhibició del primer increment d'AMPc, sense afectar el segon increment ni la síntesi de l'ADN (McManus J.P. i al. 1973, Thrower S. i al. 1974). Això suggereix que el primer augment d'AMPc no és necessari per a la replicació de l'ADN. No obstant, si que sembla ésser relacionada amb l'entrada dels hepatòcits a la fase mitòtica del cicle cel.lular (Rixon R.H. i al. 1985).

L'increment d'AMPc és responsable, en aquesta primera etapa, del primer augment de l'activitat proteïna quinasa dependent d'AMPc del tipus I, que s'observa



a les 6 h post-hepatectomia (Sikorska M. i al. 1983).

La calmodulina CaM és el receptor de  $Ca^{2+}$  més àmpliament distribuït en els eucariotes (Klee C. i al. 1980, 1982, Cohen P. i al. 1988). L'acció del calci esta mediada per la formació dels complexos  $Ca^{2+}$ -CaM. Després d'una hepatectomia parcial es produeix un increment de la concentració citosòlica de CaM a partir de les 6 h post-hepatectomia, assolint els nivells màxims entre les 8 i 12 h (McManus J.F. i al. 1981a, Soriano M. i al. 1985). L'administració de trifluoperacina (TFP), inhibidor del complex  $Ca^{2+}$ -CaM produeix una inhibició de la síntesi d'ADN que es pot revertir al subministrar CaM (Boynton A.L. i al. 1980). Això indica que la CaM es un factor implicat en la duplicació de l'ADN (Rasmussen C.D. i al. 1989).

Per altra banda, l'augment de calmodulina sembla ésser desencadenat pel primer increment d'AMPc. Evidències experimentals (Soriano M. i al. 1988) indiquen que la inhibició del primer increment d'AMPc mitjançant l'administració de D-L-propranolol, produeix la inhibició de l'acumulació intracel.lular de calmodulina. Experiments complementaris demostren la reversió d'aquesta inhibició quan s'administra via endovenosa AMPc (Soriano M. i al. 1988). L'augment de calmodulina està produït per nova síntesi de proteïna precedida per un increment en la transcripció (Pujol M.J. i al. 1987a).

En general, l'acumulació citosòlica de calmodulina sembla ésser responsable de la desorganització del citoesquelet, de la disminució d'àcid siàlic en la membrana plasmàtica i de l'increment de la síntesi de fibronectina (Coll M.J. i al. 1986), fets associats a l'activació proliferativa.

### **Segona etapa:**

Aquesta segona etapa, engloba el període  $G_1$  del cicle cel.lular. Comença a les 10 h post-hepatectomia parcial i finalitza amb l'activació de als síntesi d'ADN (entre 16-18 h post-hepatectomia), fet que determina l'entrada a la fase S.

Els esdeveniments que es presenten en aquesta segona etapa es resumeixen en el següents:

#### Factors extracel.lulars

- Increment dels nivells d'EGF.

- Augment inicial dels nivells de TGF- $\alpha$ .
- Actuació de la norepinefrina a través de receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics.

#### Canvis en la membrana plasmàtica

- Increment dels receptors per a la insulina.
- Augment de l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC), degut als nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  i DAG, provocant un increment del cotransport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .
- Activació del cotransport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , augmentant els nivells de sodi intracel.lulars.
- Augment de l'activitat de l'ATPasa ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), disminuint els nivells de sodi intracel.lulars.
- Increment de l'activitat fosfatasa alcalina.

#### Canvis intracel.lulars

- Increment del pH intracel.lular degut al cotransport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .
- Segon increment dels nivells d'AMPc, degut a l'augment de l'activitat específica de l'adenilat ciclase i la disminució de l'activitat fosfodiesterasa.
- Estimulació receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics, que desencadenaran trencament de  $\text{PIP}_2$ .
- Increment dels nivells d'inositol 4,5 trifosfat ( $\text{IP}_3$ ), degut a la fosforil.lació d' $\text{IP}_2$ .
- Movilització dels diposits de calci del reticle endoplasmàtic (ER) per l'acció dels nivells d' $\text{IP}_3$ .
- Activació de les proteïnes quinases de tirosina com a resposta als nivells d'EGF i a la segona acumulació de glucagó.
- Increment de l'activitat proteïna quinasa dependent d'AMPc en el citoplasma i posteriorment en el nucli.
- Increment de GMPc en el nucli.
- Increment de la síntesi de proteïnes dependents d'AMPc i CaM.
- Increment de l'activitat de proteïnes quinases nuclears independents de  $\text{Ca}^{2+}$  i AMPc.
- Estimulació del transport de ARNm cap al citoplasma mitjançant les subunitats RII i C de les proteïnes quinases dependent d'AMPc.
- Transport d'EGF al nucli.
- Activació receptors PK-tyr (proteïnes quinasa de tirosines).
- Increment de l'expressió dels gens p53, H-ras i K-ras.

Al voltant de les 12 h post-hepatectomia, els hepatòcits es tornen sensibles a la resposta del factor de creixement epidèrmic (EGF). Els nivells inicials d'EGF apareixen molt aviat després de l'hepatectomia parcial. Aquest augmenten uniformement durant la regeneració, presentant increment molt definit entre les 12-18 h post-hepatectomia (Cornell R.P. 1985, Francavilla A. i al. 1986).

S'ha descrit un possible transport dels complexos receptor EGF-EGF cap el nucli, mitjançant vesícules dirigides pels microtúbuls i pel mecanisme lisosomal (*lysosome-bypassing transport*) (Vale R.D. 1987, Polet H. 1987, Polet H. i al. 1988). En el nucli l'acció d'EGF activa els receptors de les quinases de tirosina (PK-tyr) que presenten un màxim d'activitat al voltant de l'interval 12-18 h, just abans de l'aparició de les subunitats actives M2 de la ribonucleotidasa reductasa i al final de la fase pre-replicative (Youdale T. i al. 1984).

Recentment s'ha descrit que els hepatòcits regenerants produeixen activament el TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) (Mead J.E. i al. 1989, Fausto N. i al. 1989, Michalopoulos G. 1990). La secreció de TGF $\alpha$  constitueix una de les respostes autocrines en l'estimulació de la síntesi d'ADN. El TGF $\alpha$  comparteix el mateix receptor que l'EGF (Goustin A.S. i al. 1986, Roberts A.B. i al. 1985), això suggereix l'existència d'una regulació recíproca entre ambdós factors.

L'estimulació del TGF $\alpha$  és superior a la de l'EGF en els hepatòcits (Mead J.E. i al. 1989, Brenner D.A. i al. 1989).

Els nivells d'ARNm del TGF $\alpha$  no es detecten fins a les 12 h post-hepatectomia parcial, els quals assoleixen valors màxims a les 24 h de la regeneració hepàtica, coincidint amb el pic màxim de síntesi d'ADN (Mead J.E. i al. 1989).

Hi han autors que suggereixen que el TGF $\alpha$ , podria ésser responsable en part de l'inducció de la síntesi d'ADN en els hepatòcits, però la principal funció seria estimular la posterior síntesi d'ADN observada en les cèl.lules no parenquimals del fetge, les quals presenten el pic màxim de síntesi d'ADN a les 48 h post-hepatectomia (Grisham J.W. 1962).

Al final de la fase hipertròfica inicial, les cèl.lules estan preparades per una segona cascada de senyals, en la qual el glucagó, és el principal candidat. El segon increment de glucagó en la circulació portal comença a les 6 h post-hepatectomia parcial i presenta un màxim a les 12 h, coincidint amb els primers inicis de la replicació d'ADN.

El glucagó actua com a senyal multipotent, ja que pot activar diversos factors:

- La PIC mitjançant l'unió a receptor GR1 i l'adenil ciclase mitjançant l'unió a

receptors GR2 (Houslay M.D. i al. 1987). La resposta de PIC es desencadena via glucagó amb una eficiència més baixa que via vasopresina, però és suficient per movilitzar el  $Ca^{2+}$  del reticle endoplasmàtic i estimular la PKC (Houslay M.D. i al. 1987).

- També provoca l'obertura de canals de  $Ca^{2+}$ , incrementant el flux de calci intermembrana (Kimura S. i al. 1982, Exton J.H. 1988).
- La principal funció és el segon increment d'AMPc.

Entre les 12 i 16 h de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial es dona el segon increment d'AMPc citosòlic (McManus i al. 1972). Aquest segon increment, al contrari que el primer, està estretament relacionat amb la replicació de l'ADN. S'ha demostrat que l'administració, 8 h després d'una hepatectomia parcial, d'antagonistes  $\alpha$ -adrenèrgics produeix una inhibició de la síntesi d'ADN (McManus i al. 1973). Malgrat aquestes dades, l'AMPc no és el factor indispensable per iniciar la replicació de l'ADN després d'una hepatectomia parcial, ja que s'ha observat que les rates hipocalcèmiques no poden sintetitzar ADN post-hepatectomia, malgrat la presència dels dos increments d'AMPc en el citosol (Whitfield J.F. i al 1979).

Es sap que el segon pic d'AMPc intracel·lular s'estimula per un augment basal d'adenilat ciclase (mediat per glucagó), enzim responsable de la síntesi d'AMPc, conjuntament amb una disminució de l'activitat fosfodiesterasa, enzim responsable de la degradació d'AMPc. S'ha suggerit que l'increment de calmodulina, que té lloc en la primera etapa podria ésser el factor regulador de l'activitat adenil ciclase en aquesta segona etapa, ja que es coneix que l'adenilat ciclase és activable per la calmodulina (Whitfield J.F. i al. 1985).

L'augment del nivell d'AMPc és responsable de l'activació de les proteïnes quinases dependents d'AMPc de tipus II, que presenten un pic màxim a les 14 h post-hepatectomia (Laks M.S. i al. 1980). L'activació de les quinases dependents del segon increment d'AMPc, consisteix en l'alliberació de la subunitat catalítica (C) per l'efecte de l'unió de l'AMPc amb la subunitat reguladora (R). Es sap que la subunitat C transloca al nucli on és responsable de la fosforil·lació de distintes subespècies de la histona H1, esdeveniment que es relaciona amb la descondensació de la cromatina, requisit fonamental per a l'inici de la replicació de l'ADN (Laks M.S. i al. 1981, Ohba Y. i al. 1984, Sikorska M. i al. 1988,).

També hi han evidències de l'estimulació de l'expressió gènica mitjançant AMPc, a través de la interacció del complex AMPc-subunitat RII de les proteïnes quinases dependents d'AMPc amb el genoma (Servin E.S. i al. 1982, Kondrashin A.A. 1985).

Concretament les quinases dependents d'AMPc intervenen en l'activació de gens que transcripcionalment, estan associats al nucleoesquelet (matriu nuclear) (Sikorska i al. 1988). Aquesta activitat, ha fet pensar en la implicació de la segona acumulació d'AMPc, amb la producció dels enzims necessaris per la replicació de l'ADN (Cho-Chung Y.S. 1980, 1980a, Whitfield J.F. i al. 1985).

L'increment de les quinases dependents d'AMP que surgeix entre les 14-16 h post-hepatectomia, sembla ésser regulada per la via vitamina D<sub>3</sub> (via que depèn dels nivells de calci extracel.lulars). Les rates hipocalcèmiques sotmeses a una hepatectomia parcial, no són capaces d'iniciar la síntesi d'ADN. Aquestes rates presenten algun dels canvis pre-replicatius com són, els dos increments d'AMPc i l'augment de calmodulina citosòlic, en canvi no presenten els increments de quinases dependent d'AMPc, de ribonucleòtid reductasa, ni l'acumulació dels enzims replicatius, ni de desoxiribonucleòtids precursors. (Whitfield J.F. i al. 1976, Sikorska M. i al. 1983). S'ha demostrat que, l'administració de vitamina D<sub>3</sub> a rates hipocalcèmiques hepatectomitzades, restableix l'activitat de les proteïnes quinases dependents d'AMPc (Sikorska M. i al. 1983), malgrat no recuperar-se la replicació de l'ADN. Posteriorment es confirmà que la vitamina D<sub>3</sub> controla exclusivament la síntesi de les subunitats catalítiques d'alguns d'aquests enzims (Sikorska M. i al. 1985).

Cal destacar una darrera funció més general associada a les subunitats C de les quinases dependents d'AMPc com és, l'estimulació del transport d'ARNm a través dels pors nuclears al citoplasma, mitjançant la fosforil.lació i activació de proteïnes implicades en aquest transport (Agutter P.S. 1988, McDonald A.R. i al. 1986, Moffett R.B. i al. 1981).

Un dels fenòmens característics de l'activació proliferativa, post-hepatectomia parcial i observat en altres tipus cel.lulars és, l'acumulació intracel.lular de Na<sup>+</sup> i l'increment del pH intracel.lular (Leffert H.L. i al. 1985, Rozengurt E. 1986). Aquest increment de pH es desencadena en la primera etapa i assoleix els nivells màxims en la segona, ja que, es creu relacionat amb l'interacció prèvia d'algun mitogen o senyal extracel.lular amb la fosfolipasa C (PLC). La PLC activa catalitzaria la rotura de PIP<sub>2</sub> en IP<sub>2</sub> i DG. El IP<sub>2</sub> es fosforil.laria donant IP<sub>3</sub>, que actuaria mobilitzant els dipòsits de calci del reticle endoplasmàtic. Per últim el Ca<sup>2+</sup> i el DG activarien conjuntament la proteïna quinasa C (PKC) que a la vegada provocaria un increment del co-transport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> a través de la membrana plasmàtica del hepatòcit, incrementant l'entrada de Na<sup>+</sup> i la sortida d'H<sup>+</sup>, provocant com conseqüència un

augment de pH intracel.lular (fig.5).

El sodi és expulsat posteriorment de la cèl.lula per un augment de l'activitat ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )-ATPasa. S'ha descrit que l'activitat ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )-ATPasa augmenta al voltant d'un 60% a les 12 h després d'una hepatectomia parcial (Schenk D.B. i al. 1984, Enrich C. i al. 1986).

Entre les 12-16 h post-hepatectomia parcial, els hepatòcits regenerants esdevenen molt sensibles a l'efecte de la norepinefrina. Les catecolamines com l'epinefrina no són factors suficients per induir la síntesi d'ADN (Criuse J.L. i al. 1986), però formen part del conjunt de senyals associades a la proliferació cel.lular (Michalopoulos G. 1990). La norepinefrina actua estimulando els receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics (Cruise J.L. i al. 1987). L'estimulació dels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics desencadena el trencament de  $\text{PIP}_2$ , resultant un increment citoplasmàtic de DG i  $\text{IP}_3$ . Aquests desencadenen una altra cascada d'esdeveniments citoplasmàtics com són, l'activació de la PKC i la mobilització de calci intracel.lular (Exon J.H. 1988a). Per altra banda hi han evidències que impliquen l'efecte de la norepinefrina a través d'altres vies alternatives (Takai S. i al. 1988). A part de les funcions associades a la norepinefrina com són, la hiperpolarització de la membrana i l'increment de DG, efectes relacionats amb receptors mobilitzadors de calci com els  $\alpha_1$ -adrenèrgics, la norepinefrina inhibeix l'efecte del TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) (Houck K.A. i al. 1988, 1989), factor que es tractarà més endavant. La norepinefrina també regula la resposta d'EGF disminuint l'associació d'EGF a llurs receptors (Francavilla A. i al. 1986).

A nivell de membrana plasmàtica, a les 12 h de regeneració hepàtica, s'observa un increment, aproximadament d'unes 10 vegades, de l'activitat específica de la fosfatasa alcalina (Bachs O. 1983).

També s'ha descrit un segon augment puntual de l'activitat específica basal de l'adenilat ciclase, a les 13 h post-hepatectomia parcial (Bachs O. 1983). Aquest segon augment està correlacionat, igual que en la primera etapa, amb un increment d'AMPc.

Respecte als nivells de GMPc, també s'observa dos increments, el primer a les 8 h post-hepatectomia parcial, associat a la membrana plasmàtica, i el segon a partir de les 12 h, associat a la membrana nuclear i al nucli. Aquests increments localitzats, són deguts a una redistribució dels nivells de GMPc inicials, durant la

regeneració hepàtica (Fausto N. i al. 1976, Koide Y. i al 1978). S'ha suggerit que el GMPc podria participar en la regulació de funcions pre-mitòtiques dels microtúbuls o en la formació del fus mitòtic, encara que fins ara hi han poques evidències de llur mecanisme d'acció (Snyder J.A. i al. 1976).

En la segona etapa és quan la calmodulina i l'AMPc treballen junts promovent la síntesi de proteïnes. L'AMPc estimula l'associació de l'ARNm als ribosomes (Agutter P.S. i al. 1988, McDonald A.R. i al. 1986), i el  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM s'uneix al complex d'iniciació ribosòmic estimulant la traducció dels missatgers (Wolfman A. 1985).

A l'inici de la segona etapa, entre les 10 i 14 h post-hepatectomia parcial, es detecta un augment de l'activitat proteïna quinasa nuclear independent de calci i AMPc. Aquesta activitat, associada a la cromatina, és deguda a la quinasa de 105 KDa, que té com a substrate preferent una proteïna bàsica de 45 KDa, que s'uneix a la cromatina (Sikorska M. i al. 1982, 1983).

### **Tercera etapa:**

En les dues etapes anteriorment definides, s'han analitzat els canvis moleculars de la regeneració que conflueixen en l'inici de la síntesi de l'ADN i progressió del cicle cel.lular. Les evidències descrites indiquen l'existència de varies cadenes de reaccions que es reuneixen en un fi comú, la replicació de l'ADN. Aquesta tercera etapa estableix la relació entre els canvis intracel.lulars descrits i els canvis fonamentals necessaris per l'inici de la síntesi d'ADN con són:

- descondensació de la cromatina, perquè els enzims replicatius puguin unir-se a l'ADN i així començar la síntesi.
- la presència en el nucli de quantitats suficients dels enzims implicats en la replicació.
- la presència en el nucli de la quantitat suficient de desoxiribonucleòtids precursors d'ADN.

Aquests aconteixements fonamentals han d'anar acompanyats d'altres esdeveniments també importants per la finalització de la replicació com, la presència histones i de metilases, les quals participaran en l'organització posterior de l'ADN de nova síntesi.

La tercera etapa l'associem als canvis moleculars que intervenen a partir de les 14- 16 h post-hepatectomia parcial, resumits en el esquema:

#### Canvis moleculars en la membrana plasmàtica

- Disminució de les quinases dependent de calci (PK-Ca<sup>2+</sup>).
- Disminució dels nivells de fosforil.lació de les proteïnes de memembrana.
- Increment del sistema A de transport.

#### Canvis moleculars intracel.lulars

- Increment dels nivells de calci intranuclears.
- Disminució dels nivells d'AMPc.
- Increment de l'activitat PKC regulada per calci.
- Translocació de la CaM citoplasmàtica al nucli i llur associació amb la matriu nuclear.
- Increment de l'activitat ADN metilasa.
- Increment dels enzims replicatius: ADN polimerasa  $\alpha$ , ADN primasa, 3'-5' exonucleasa i ARNasa H.
- Increment dels enzims, ribonucleòtid reductasa, timidilat sintasa i quinases de desoxiribonucleòtids.
- Associació dels enzims replicatius a la matriu nuclear formant complexos multienzimàtics.
- Activació dels enzims replicatius per l'acció del complex Ca<sup>2+</sup>-CaM associat a la matriu nuclear.

Igual que en altres tipus cel.lulars les senyals que es donen en aquesta etapa produeixen, un alliberament del calci acumulat en el reticle endoplasmàtic (cap al nucli), una decaiguda de les quinases dependents de calci de la membrana plasmàtica i una disminució dels increments de CaM, AMPc i quinases dependents d'AMPc (Whitfield J.F. i al. 1980, 1987, McManus J.P. i al. 1981, 1981a).

La fosforil.lació dependent de calci de certes proteïnes de membrana, començava en les cèl.lules hepàtiques durant la primera etapa i provocava la decaiguda de l'augment inicial del transport actiu del sistema A. Aquest transport es mantenia a nivells baixos durant la segona etapa (Walker P.R. i al 1978a) fins el desencadenament de les senyals de la tercera etapa. En aquesta darrera etapa,



decau la fosforil.lació de proteïnes de membrana, fet que va acompanyat per un increment del transport actiu del sistema A, que consisteix amb un augment de la traducció d'ARNm just abans de l'activació replicativa (Walker P.R. i al. 1978a).

Un dels esdeveniments funcionals importants de la tercera etapa, és l'estimulació de la traducció i l'atur de la degradació dels productes ARNm, produïts i acumulats durant la segona etapa.

A partir de les 16 h de regeneració hepàtica post-hepatectomia, hi ha un increment de l'activitat dels enzims necessaris per a la replicació d'ADN com, l'ADN polimerasa  $\alpha$ , ADN primasa, 3'-5' exonucleasa, ARNasa H, ADN topoisomerasa II (Earshaw W.C. i al. 1988), així com dels enzims de la via biosintètica dels desoxiribonucleòtids precursors de l'ADN, ribonucleotid reductasa, timidilat sintasa i quinases de desoxiribonucleòtids.

S'ha observat que malgrat els gens que codifiquen per les dues subunitats de la ribonucleòtid reductasa semblen expressar-se coordinadament en la regeneració hepàtica (Wensing E.J. i al. 1988), les subunitats funcionals (M1 i M2) no apareixen coordinadament, estan sotmeses a diferents senyals (Whitfield J.F. i al. 1989, Youdale T. i al. 1985, 1984).

Respecte a la polimerasa  $\alpha$ , recentment s'ha descrit la implicació dels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics amb la regulació de la síntesi d'ADN, a través de l'activació de l'ADN polimerasa  $\alpha$  (Agell N. i al. 1991). S'ha suggerit que l'activació de l'enzim, mitjançant l'estimulació dels receptors  $\alpha$ -adrenèrgics, provoca un increment de l'afinitat de l'enzim per l'ADN (Agell N. i al. 1991). L'ADN polimerarsa  $\alpha$  s'activaria per un canvi en llur estat fosforil.lat, el qual es pot dur a terme per dues vies:

- activació dels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics (per acció de la norepinefrina), provocarien un increment de la PKC, i aquest seria la responsable de la fosforil.lació de la polimerasa  $\alpha$ , o
- hi han evidències experimental que indiquen que, els receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics indueixen l'associació de la CaM a la matriu nuclear (Pujol M.J. i al. 1989). En aquest cas, la CaM o proteïnes quinases dependents de CaM (PK-CaM), podrien estar implicades en la fosforil.lació i activació de la polimerasa  $\alpha$ .

Tal com s'ha esmentat en les etapes anteriors, el calci extracel.lular esdevé un dels factors importants en aquesta etapa. S'observa un augment del calci extracel.lular entre les 16-18 h post-hepatectomia (). La deficiència de calci extracel.lular anul.la l'activitat dels enzims replicatius i l'acumulació de

desoxiribonucleòtids (Whitfield J.F. i al. 1987, Rixon R.H. i al. 1989), tal com s'ha observat en rates hipocalcèmiques hepatectomitzades.

La calmodulina citosòlica transloca al nucli durant aquesta etapa, on s'associa preferentment a la matriu nuclear (Serratosa J. i al. 1988). Evidències experimentals demostren que la traslocació de la calmodulina al nucli no depèn dels nivells de calci nuclears, provinent del reticle endoplasmàtic, en canvi, l'associació de la calmodulina a la matriu nuclear, sí depèn dels nivells de calci, i aquests s'ha demostrat que estan regulats per acció dels receptors  $\alpha$ -adrenèrgics (Pujol M.J. i al. 1989).

Els complexos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM es redistribueixen a la matriu nuclear (o nucleoesquelet) (Serratosa J. i al. 1988) on activaran els enzims replicatius i participaran en l'assamblatge dels complexos multienzimàtics (Reddy, G.P.V. i al. 1987).

Evidències experimentals demostren la presència de receptors de calmodulina en la matriu nuclear tant en en cèl.lules hepàtiques com en cèl.lules de cervell (Bachs O. i al. 1987, 1990, Vendrell M. i al. 1991).

En aquesta tercera etapa, s'ha observat un segon increment de la PKC en el nucli, increment que assoleix valors màxims a les 22 h post-hepatectomia parcial (Okamoto Y. i al. 1981). La funció de la PKC s'associa a la hiperfosforilació de la histona H1 durant la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica (Martelli A.M. i al. 1991). Aquesta evidència suggereix que la quinasa  $p34^{\text{cdc}2}$ , quinasa específica de la histona H1 en la transició de les fases  $G_2/M$ , no sembla estar implicada en la fosforilació de la histona H1 en la transició  $G_1/S$ , ja que aquesta darrera fosforilació s'inhibeix totalment amb anticossos anti-PKC (Martelli A.-M. i al. 1991).

### 1.3.3.- Expressió d'oncogens durant la regeneració hepàtica.

L'expressió d'oncogens també forma part del procés proliferatiu de la regeneració hepàtica. Aquesta expressió presenta tres característiques (Fausto N. i al. 1989):

- és específica, només s'expressen certs oncogens (s'observen transcrits dels gens fos, myc, p53 i ras), altres no estan implicats com, abl, mos, src...(Fausto N. 1984, Fausto N. i al. 1983).
- l'expressió d'aquests oncogens és seqüencial, els ARNm dels específics proto-oncogens incrementen en períodes ben definits, després d'una hepatectomia parcial (Thompson N.L. i al. 1986).

- el període d'increment dels transcrips dels gens fos, myc i p53 és molt curt, contràriament al període d'increment del gen ras que és aproximadament de 30 h, durant la regeneració hepàtica (fig.7).

Durant els primers 15 minuts de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial es detecten nivells, 4 vegades superiors als normals, dels ARNm del gen c-fos, nivells que decauen al voltant de les 2 h post-hepatectomia. Els ARNm del gen c-myc assoleixen nivells màxims (5 vegades superiors als normals) entre els 30 min i les 2 h post-hepatectomia parcial. Els increments dels transcrits de c-fos i c-mys semblen ésser desencadenats per factors humorals, ja que es donen molt aviat post-hepatectomia parcial. Les proteïnes codificades per aquests gens probablement modulen l'activitat d'altres gens necessaris per la progressió del cicle cel.lular (Morello D. i al. 1990).

S'ha descrit que els ARN del gen c-my estan regulats majoritàriament a través de mecanismes post-transcripcionals (Morello, D.A. i al. 1989), en canvi els del gen c-fos depenen de la regulació, tant transcripcional com post-transcripcional. També s'ha suggerit que l'expressió del gen c-fos igual que la del gen c-jun, podria ésser important per la cadena d'esdeveniments que permeten l'activació del TGF $\alpha$  durant la regeneració hepàtica (Mead, J.E. i al. 1989).

A les 8 h post-hepatectomia parcial es dona una segona fase d'expressió dels gens c-fos i c-myc (Corral M. i al. 1985). Aquesta doble activació no s'ha observat en altres sistemes proliferatius (Thompson C.B. i al. 1985, Rabbitts P.H. i al. 1985). Però sembla ésser similar al patró de canvis bifàsics que es donen per l'activitat ornitin decarboxilasa i per les concentracions d'AMPc, durant la regeneració hepàtica (Hölttä E. i al- 1972, McManus J.P. i al. 1972). S'hauria d'establir si algun o tots aquests esdeveniments són independent. Recentment s'ha descrit la regulació de l'expressió dels proto-oncogens c-fos i c-myc a través de les proteïnes quinases de tirosina (PK-tyr), quinasa C (PKC) i AMPc (Reuse S. i al. 1990), aquest fet suggereix la no independència entre els canvis bifàsics descrits.

Els nivells dels ARNm del gen p53 incrementen a partir de les 8 i assoleixen un pic màxim a les 12 h, amb nivells 5 vegades superiors als normals, després d'una hepatectomia parcial. Aquest increment es reflecteix en un increment dels nivells de la proteïna p53 entre les 12 i 15 h post-hepatectomia parcial. Aquest increment està associat a la progressió de la fase G<sub>1</sub>, es a dir a les senyals que es desencadenen durant la segona etapa. Els nivells de la proteïna ras p21 incrementen més tard, coincidint amb la replicació de l'ADN i la divisió cel.lular

(Goyette M. i al. 1983, 1984).

Aquesta seqüencial expressió dels proto-oncogens durant la regeneració hepàtica reflexa l'associació dels esdeveniments amb el desencadenament i progressió del cicle cel.lular i pot servir com a marcadors per a la identificació d'específics factors humorals implicats amb la regeneració hepàtica.

Recentment s'ha descrit, que la transformació activada per oncogens associats a la membrana, com el ras, (també oncogens associats al citoplasma però no els nuclears), augmenta l'activitat de la PLA<sub>2</sub>, la qual provoca una acumulació elevada dels nivells de GPI (Glicerifosfoinositol) citoplasmàtics. Aquests nivells elevats de GPI, constitueixen un bon marcador bioquímic per detectar processos de transformació, d'aquest particular grup d'oncogens (Alonso T. i al. 1990).

#### **1.3.4.- Factors reguladors negatius de la proliferació cel.lular.**

Per últim cal destacar els factors que intervenen en l'atur de la replicació de l'ADN, es a dir els factors que controlen negativament la síntesi d'ADN (Fausto N. I al. 1987, 1987a, 1989, Michalopoulos, G. 1990). Aquests factors inclouen: el TGFβ, la interleuquina 1β i l'inhibidor de la proliferació hepàtica (HPI).

Respecte al TGFβ, s'han identificat més de tres membres de la família TGFβ, els quals presenten un pes molecular aproximadament de 26 KDa. Però sols el TGFβ1 s'ha associat funcionalment als hepatòcits. Aproximadament 2 ó 3 dies després del pic màxim de síntesi d'ADN, apareix un increment dels ARNm del TGFβ, que assoleix nivells màxims entre 8 i 10 vegades els normals (Braun L. i al. 1988, Fausto N. i al. 1987). Els nivells d'ARNm són molt baixos en el fetge normal, en la regeneració hepàtica, durant les primeres 2-e hores post-hepatectomia, es comencen a detectar nivells d'ARNm de TGFβ. Al voltant de les 4 h post-hepatectomia, aquests nivells d'ARNm s'estacionen fins a les 18-20 h post-hepatectomia, moment en que augmenten assolint valors màxims a les 72 h. El TGFβ actua com a potent inhibidor de la síntesi d'ADN en hepatòcits en cultiu (Braun L. i al. 1988, Carr B.I. i al. 1986, Nakamura T. i al. 1985, Russell W.E. 1988, Strain A.J. i al. 1987). Sorprenentment *in vivo*, malgrat els hepatòcits contenen receptors per TGFβ i responen al factor TGFβ, no el sintetitzen. Els ARNm s'han trobat en les cèl.lules no parenquimals, pricipalment en les cèl.lules endotelials (Braun L. i al. 1988). Els nivells de TGFβ de les cèl.lules epitelials són capaços

d'inhibir la síntesi d'ADN dels hepatòcits regenerants *in vivo* (Russell W.E. i al. 1988a).

S'ha proposat que el TGF $\beta$  és l'efector d'un circuit regulador paracrí, el qual s'activa en la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial amb la funció de prevenir una proliferació cel.lular incontrolada (fig.8). TGF $\beta$  forma part de les senyals que controlen la finalització de la proliferació en el moment previst.

Recentment s'ha observat que la interleuquina 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ), una forma de IL1, inhibeix la proliferació dels hepatòcits. El grau d'inhibició de la síntesi d'ADN no és tant completa com en el cas del TGF  $\beta$ . La inhibició és d'un 80% de la síntesi d'ADN. La IL 1 $\beta$  actua redireccionant la fase de síntesi proteica en el fetge, afectant l'expressió gènica (Nakamura T. i al. 1988).

L'inhibidor de la proliferació hepàtica (HPI), és una proteïna d'uns 15 KDa. L'activitat del HPI no s'inhibeix mitjançant anticossos contra TGF  $\beta$  (Huggett A.C. i al. 1987).

## 1.4.- MATRIU NUCLEAR

### 1.4.1.- Estructura i composició de la matriu nuclear.

Operacionalment la matriu nuclear o nucleoesquelet, és l'estructura romanent insoluble obtinguda després d'extreure la cromatina i tots els components solubles nuclears. La matriu nuclear és similar, en dimensió i forma, al nucli original, i està formada, principalment, per dos tipus d'estructures:

- les làmines nuclears, que formen una xarxa fibrosa al voltant de tot el nucli, seguint la membrana nuclear interna, i residus del complex nucleopor (Gerace i al. 1988, Nigg 1989).
- una estructura interna formada per fibres i components granulars (He i al. 1990, Kaufmann i al. 1984, Spector 1990).

La matriu nuclear representa una estructura complexa amb una composició proteica pròpia, que la diferencia d'altres estructures cel.lulars.

Berezney i Coffey (1977) mostraren que la matriu nuclear està constituïda

majoritàriament per proteïnes àcides no-histones (80%). Aquestes proteïnes inclouen les làmines, RNP (ribonucleoproteïnes) i un grup de proteïnes poc abundants i escassament caracteritzades. La detecció d'aquest últim grup de proteïnes depèn en moltes ocasions del procediment i condicions emprades per l'obtenció de la fracció, matriu nuclear.

Les làmines, són els components majoritaris i més àmpliament estudiats de la matriu nuclear (Aaronson i al. 1975, Fry 1976, Berezney i al. 1977, Lam i al. 1979, Franke i al. 1981b, Dwyer i al. 1976, Gerace i al. 1978, Bibor-Hardy i al. 1991). Formen part de la família de filaments intermedis (McKeon i al. 1986, Fisher i al. 1986, Höger i al. 1988) i darrerament s'ha implicat a les làmines (específicament la làmina B) com el lloc d'unió intranuclear dels filaments intermedis citoplasmàtics (Georgatos i al. 1987, 1987a, 1987b).

Donades aquestes evidències les làmines representen el pont d'unió entre la matriu nuclear i els filaments intermedis. Estructures conceptualment similars (donades llurs propietats físiques comuns) i àmpliament estudiades per Penman i col.laboradors, com un estructura continua NM-IF (matriu nuclear-filaments intermedis) (fig.10) però amb característiques bioquímiques ben diferenciades (Fey i al. 1986a, Capco i al. 1982, Fey i al. 1985, Carmo-Fonseca i al. 1987).

La composició de proteïnes de la matriu nuclear és distinta de les altres fraccions cel.lulars. Una part de proteïnes que la componen es troben en totes les fraccions de matriu nuclear dels diferents tipus cel.lulars analitzats. No obstant, hi han proteïnes de matriu nuclear específiques de tipus cel.lular ( Fey i al. 1988) i també s'han descrit canvis en la composició de la matriu nuclear durant l'activació proliferativa i la diferenciació cel.lular (Stuurman i al. 1989, 1990).

### **Purificació de la matriu nuclear.**

Els mètodes de purificació de la matriu nuclear en ocasions presenten confusions, tal com s'ha esmentat anteriorment.

S'han publicat diversos protocols per a la purificació de la matriu nuclear. Tots ells tenen en comú dos processos: 1) presentar el nucli accessible a l'acció de les nucleases, per les quals l'ADN es digereix i s'extreu posteriorment; i 2) l'extracció de tots els components nuclears solubles.

Un important primer pas, en la purificació de la matriu nuclear, és l'aïllament de nuclis. La majoria de procediments utilitzen tampons amb concentració salina no fisiològica, per tal d'evitar l'agregació dels nuclis. Com a resultat es pot obtenir una desestabilització de certes estructures nuclears i la pèrdua d'algunes proteïnes associades a la matriu (Cook 1988).

Un procés alternatiu és el procediment desenvolupat per Cook i col.laboradors, que consisteix en la inclusió de les cèl.lules en petites gotes d'agarosa i purificació de la matriu nuclear posteriorment, sota condicions més fisiològiques (Jackson i al. 1985). Altres autors han resolt l'estabilització de la matriu nuclear mitjançant el tractament dels nuclis amb l'agent oxidant tetracionat sòdic (Kaufmann i al. 1984), amb ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Kaufmann i al. 1981), o simplement escalfant a  $37^{\circ}\text{C}$  ó  $42^{\circ}\text{C}$  (Gasser i al. 1986). També s'han emprat el tractament de *heat shock* en les cèl.lules *in vivo* abans de purificar els nuclis, amb el propòsit d'estabilitzar l'estructura nuclear (Evan i al. 1985, Fisher i al. 1989).

Un altre punt clau en els passos de purificació de la matriu nuclear, és l'extracció de la cromatina dels nuclis després de digerir amb nucleases. Molts grups utilitzen condicions de força iònica moderada o alta (He i al. 1990, Kaufmann i al. 1984, Stuurman i al. 1990). Altres extrauen primer les histones dels nuclis intactes amb litium 3'-5'- diiodosalicilat (LIS), abans de la digestió amb nucleases i de l'extracció dels fragments d'ADN, mantenint la força iònica propera a condicions fisiològiques (Mirkovitch i al. 1984).

Una altra alternativa és separar la cromatina mitjançant electroforesi, en condicions fisiològiques (Jackson i al. 1985).

Aquests distins tipus d'extracció donen com a resultat una selectiva dissociació dels components de la matriu, els quals diferiran per cadascun dels procediments emprats. Per exemple, a l'utilitzar l'extracció LIS, es perden completament els nous transcrits (Mirkovitch i al. 1984, Gasser i al. 1986), així com l'activitat ARN polimerasa II (Roberge i al. 1988). Per contrast, tots els constituents del complex transcripcional com són, els nous transcrits, l'activa ARN polimerasa i els gens transcripcionalment actius, es mantenen amb l'extracció de cromatina mitjançant electroforesi (Jackson i al. 1985).

Penman i col.laboradors, han destacat, que el tractament amb ARNasa conjuntament amb ADNasa, sota determinades condicions provoca dramàtics resultats en l'estructura interna de la matriu nuclear (Fey i al. 1986). Aquests resultats suggereixen la interessant possibilitat de que l'ARN, probablement en forma de RNPs, estigui estabilitzant l'estructura de la matriu nuclear.

Alternativament, els RNPs podrien ésser les unitats estructurals, mitjançant la polimerització de les quals es formés la matriu nuclear. Aquesta hipòtesi estaria recolzada per les evidències descrites en l'apartat anterior, on es descriuen els snRNP formant una estructura reticular en el nucli i es trobaven implicats en el processament de l'ARN (Specta 1990).

Malgrat aquestes evidències, el col.lapsament o pèrdua de l'estructura interna de la matriu nuclear, després del tractament amb ARNases, està també associat al mètode general emprat per a la purificació de la matriu nuclear. Ja que, el tractament d'ARNases en nuclis aïllats per ultracentrifugació en gradients de sacarosa, segons el protocol descrit per Kaufman i al. (1981), no provoca efectes tant dramàtics com a l'aplicar ARNases a nuclis prèviament tractats amb detergents (Fey i al. 1986).

Les diferents tècniques emprades per a la visualització de la matriu nuclear per microscopia electrònica, afegeix confusions al voltant de la morfologia de la matriu nuclear. Les tècniques de muntatge sencer (*whole-mount*) (Capco i al. 1982), seccions incloses (*embedded sections*) (Kaufman i al. 1984) i seccions lliures de resina (*resinless sections*) (Fey i al. 1986, He i al. 1990, Jackson i al. 1988), tendeixen a presentar diferents resultats.

Malgrat aquests fets, totes les tècniques emprades tenen en comú, l'existència d'una estructura interna fibrosa i/o granular en el nucli, després d'eliminar la cromatina.

#### 1.4.2.- Replicació de l'ADN.

Nombroses evidències experimentals demostren que els processos de replicació (Jackson D.A. 1986, 1984, Aelen J.M. i al. 1983, Berezney R. i al. 1976, 1981, Cook P.R. i al. 1984, Dijkwel P.A. i al. 1979, Hunt B.F. i al. 1981, McCready S.J. i al. 1980, Pardoll D.M. i al. 1980, Valenzuela M.S. i al. 1983, van der Velden H.M. i al. 1984, Volgelstein B. i al. 1980, Vaughn i al. 1990) i transcripció (Jackson i al. 1981, 1985, Ciejek i al. 1982, van Eekelen i al. 1981) tenen lloc a la matriu nuclear. Experiments realitzats mitjançant l'administració de timidina tritiada a cèl.lules activades i posterior purificació del nucli, demostren que l'ADN sintetitzat de *novo* es troba exclusivament associat a la matriu nuclear (Dijkwel P.A. i al. 1979, Pardoll D.M. i al. 1980).

Estudis inicials proposaven, que l'important procés de replicació de l'ADN eucariota



requeria l'agrupació de diversos factors i enzim replicatius per tal de formar un complexe replicacional o replisomes (Kornberg 1980, 1982, Reddy i al. 1980, Jazminski i al. 1982, 1984).

Posteriorment, estudis de l'inici de la replicació de l'ADN *in vivo* demostren l'associació del complex multienzimàtic o replisomes a la matriu nuclear (Berezney i al. 1975, 1976, 1981, Dijkwel i al. 1979, McCreedy i al. 1980, Pardoll i al. 1980).

L'associació de l'ADN polimerasa  $\alpha$  amb la matriu nuclear durant el procés replicatiu, fou la primera evidència enzimàtica a favor del model de replisomes (Smith i al. 1980, 1982, 1983, Foster i al. 1985, Tubo i al. 1985). Posteriorment s'han identificat altres enzims necessaris per la replicació de l'ADN, associats a la matriu nuclear i formant part dels replisomes, com són ADN primasa (Conaway i al. 1982, 1982a, Shioda i al. 1982, Tseng i al. 1982, 1983, Yagura i al. 1982, 1983, Kaguni i al. 1983, Chang i al. 1984, Hu i al. 1984, Jazwinski i al. 1984, Plevani i al. 1984, Singh i al. 1984, Wang i al. 1984), 3'-5' exonucleasa (Ottiger i al. 1984, Skarnes i al. 1986), ADN metilasa (Ottiger i al. 1984, Noguchi i al. 1983), receptors de diadenosin tetrafosfat ( $AP_4A$ ) (Grummt i al. 1979, Rapaport i al. 1981, Vishwanatha i al. 1986), ribonucleasa H (Ottiger i al. 1984), ATPasa ADN-dependent (Cobianchi i al. 1979, Boxer i al. 1980, Ottiger i al. 1984), topoisomerases (Noguchi i al. 1983, Jazwinski i al. 1984, Ottiger i al. 1984) i enzims implicats amb la biosíntesi de nucleòtids precursors (Reddy i al. 1980, 1982, Noguchi i al. 1983).

L'organització dels components que formen els replisomes i els llocs de replicació no es coneixent totalment, i aquest fet a portat a la realització d'anàlisi moleculars dels replisomes associats a la matriu nuclear durant la regeneració hepàtica, per tal de desbrinar l'organització multienzimàtica dels enzims replicatius descrits (Tubo i al. 1987).

Durant la regeneració hepàtica s'ha observat un increment pre-replicatiu de les activitats enzimàtiques replicatives, unides a la matriu nuclear. Aquestes activitats inicials s'ha associat amb l'assamblatge pre-replicatiu dels replisomes eucariòtics (Smith i al. 1980, 1982, 1983).

A les 6 h post-hepatectomia parcial incrementa abundantment l'activitat de l'ADN primasa associada a la matriu nuclear. Això suggeria que l'ADN primasa juga un paper important en l'assamblatge i activació dels replisomes. Aquesta evidència es correlaciona amb les dades que indiquen que l'origen de replicació es troba permanentment associat a la matriu nuclear durant tot el cicle cel·lular (Aelen i al. 1983, van der Valden i al. 1984, Carri i al. 1986, Dijkwel i al. 1986) i també coincideix amb la funció de l'ADN primasa com enzim iniciador de la replicació en

els eucariotes. Així doncs, l'unió de l'ADN primasa amb la matriu nuclear durant la fase pre-replicativa podria desencadenar l'assamblatge o activació de l'aparell replicacional. Aquest procés és un procés seqüencial, ja que l'activitat continuaria amb el desassamblatge o inactivació de l'ADN primasa com subunitat dels replisomes que seqüencialment s'activarien i completarien la replicació durant la fase S (Hand 1978).

S'ha proposat a la matriu nuclear, com l'estructura que ordena i organitza el procés de replicació de l'ADN, en el qual l'ADN es desplaça en forma de llaços (*loops*) a través dels replisomes fixats a la matriu nuclear (fig.11) (Nelson W.G. i al. 1986, Jackson i al. 1986).

La matriu nuclear també es considera l'estructura promotora de l'alt nivell d'empaquetament cromosòmic (fig.12) (Pienta i al. 1984), a través de l'ADN topoisomerasa  $\alpha$ , enzim implicat amb catalitzar l'estructura superhelicoidal de l'ADN, i que es troba associat amb la matriu nuclear (Berrios i al. 1984, Halligan i al. 1984).

Aquest empaquetament cromosòmic està restringit a la fase de mitosi i s'associa a l'estructura anomenada, esquelet cromosòmic (*chromosome scaffold*), la qual presenta composició similar a la matriu nuclear durant la interfase (Lewis i al.1984).

Les regions de la matriu nuclear que s'uneixen específicament a l'ADN, anomenades SARs (*scaffold-associated regions*) i les regions d'ADN que s'associen específicament a la matriu nuclear, MARS (*matrix-associated regions*), han estat especialment estudiades (Mirkovitch i al. 1984, Cockerill i al. 1986, von Kries i al. 1991).

Les MARs s'han trobat associades a regions properes a gens. Aquest fet va fer pensar amb els MARs com les regions bàsiques per a la formació dels llaços d'ADN (de Jong i al. 1990, von Kries i al. 1991). Organització característica d'unió de l'ADN a la matriu nuclear i a través dels quals es donaran el processos de replicació en la fase S i empaquetament cromosòmic durant la mitosi.

La majoria de les regions MARs s'han trobat localitzades en regions d'ADN que no es transcriuen. S'ha suggerit que les MARs podrien estar implicades amb importants funcions com són l'organització i regulació del genoma (Stief i al. 1989, Blasquez i al. 1989).

### 1.4.3.- Transcripció ARN.

Durant els últims anys, s'han acumulat nombroses evidències que demostren l'associació de la transcripció amb la matriu nuclear. Els arguments que ho comproven són similars als utilitzats per a la replicació de l'ADN. Experiments amb marcadors radioactius, mostren l'associació de l'ARN amb la matriu nuclear, un cop s'extret la cromatina (Jackson i al. 1981, Ciejek i al. 1982, van Eekelen i al. 1981).

Gens transcripcionalment actius, s'han trobat de forma enriquida en preparacions de matriu nuclear, després d'extraure la cromatina (Robinson i al. 1982, Ross i al. 1982, Ciejek i al. 1983, Hentzen i al. 1984, Small i al. 1985, Thorburn i al. 1988, Apostolopoulos i al. 1989). Aquest fet suggereix l'associació de regions actives de la cromatina amb la matriu nuclear.

Respecte als enzims implicats en el procés de transcripció, s'ha trobat associada a la matriu nuclear l'ARN polimerasa II (Jackson i al. 1985).

Per altra banda també es troben associats a la matriu nuclears factors transcripcionals com, els receptors d'hormones esteroidals (Barrack 1987, 1987a, Carmo-Fonseca 1988, Howell i al. 1989, Kaufmann i al. 1986, Kirsch i al. 1986). Aquest receptors són específics de teixit i s'acumulen en la matriu nuclear solament com a resposta a específics estímuls hormonals, no a l'atzar.

La matriu nuclear sembla ésser una regió intranuclear d'interacció de receptors hormonals, ja que entre el 50-75%, de tots els receptors nuclears es troben recobrint la matriu nuclear purificada.

Les proteïnes snRNP, petites partícules de ribonucleoproteïnes (*small ribonucleoprotein particles*), implicades en el procés de *splicing* de l'ARN (Zieve i al. 1990, Smith i al. 1989), i certes hnRNP, heterogènies ribonucleoproteïnes, que contenen precursors del'ARNm en algunes etapes del processament i maduració dels ARNm, els quals han estat exportats fora del nucli (Dreyfuss i al. 1988), s'han trobat associades amb la matriu nuclear (Verheijen i al. 1988). Així doncs sembla que, entre els temps de síntesi i el de transport cap el citoplasma, l'ARN esta permanentment associat a la matriu nuclear.

Evidències experimentals mostren que els snRNP es troben concentrats formant grups distribuïts per tot el nucli excloent el nucleol (Nyman i al. 1986, Verheijen i al. 1986, Fu i al. 1990). Recentment, Spector (1990) ha presentat evidències que demostren que les agrupacions snRNP formen un constituti reticle intranuclear. Malgrat aquestes dades, no es tenen evidències del lloc exacte on es dona el procés de *splicing*, si te lloc en les agrupacions o en la trama reticulars entre les

agrupacions, o en ambdues. Tampoc es tenen evidències de si els snRNP són components integrals de la matriu nuclear o solament estan associats a ella. Encara que resultats obtinguts, després d'un tractament amb ARNases, mostren l'eliminació o col.lapsament dels components integrals de la matriu nuclear (Fey i al. 1986). Aquests resultats suggereix que els snRNP són components integrals de la matriu nuclear o si més no estan implicats directament en el manteniment de l'estructura.

A part de la síntesi i processament de l'ARN, la matriu nuclear està implicada en el transport de l'ARN (Xing i al. 1989).

El fonament per al qual, l'estructura primària, parcialment processada o madurada dels transcrits, és guiada des del lloc de síntesi cap els pors nuclears no es coneix, però donades les evidències, es suggereix com un procés modulats per la matriu nuclear (de Jong i al. 1990).

## ***2. OBJECTIUS***

L'acció de factors humorals, regulen i provoquen l'activació proliferativa dels hepatòcits, desencadenant una cascada de reaccions, tant a nivell de membrana plasmàtica com intracel·lulars que culminen en la síntesi d'ADN i posterior divisió cel·lular.

Treballs inicials dels Departament de Biologia Cel·lular, han aportat nous coneixements dels esdeveniments que tenen lloc a nivell de membrana plasmàtica, així com dels canvis intracel·lulars que tenen lloc durant la regeneració hepàtica. Recentment també s'han descrit factors que intervenen a nivell nuclear, els quals semblen estar estretament relacionats amb la síntesi d'ADN.

Aquests factors, com és el cas de la calmodulina, s'associen concretament a la matriu nuclear.

Tal com s'ha descrit en la introducció, la matriu nuclear és l'estructura en la que s'uneixen els enzims replicatius i on s'inicia el procés de síntesi d'ADN.

Així, doncs, davant aquests antecedents i considerant la importància de la matriu nuclear durant la síntesi del'ADN, i l'escassa informació que es té, tant a nivell de les proteïnes que la componen com a nivells dels paper que desenvolupa, s'ha plantejat els següents objectius:

- Estudi dels canvis proteics de la matriu nuclear durant la fase replicativa de la regeneració hepàtica.
- Caracterització d'una proteïna de 55 KDa que s'associa a la matriu nuclear durant la replicació de l'ADN.
- Identificació de la proteïna de 55 KDa en altres tipus cel·lulars i altres models proliferatius, per tal d'esbrinar si la presència d'aquesta proteïna és un fet general o concret de les cèl·lules hepàtiques.
- Possible funció de la proteïna de 55 KDa de la matriu nuclear durant la proliferació cel·lular.

### ***3. MATERIALS I MÈTODS***

.

### **3.1.- MATERIAL D'ESTUDI**

#### **3.1.1.- Animals.**

S'han utilitzat rates mascle Sprague-Dawley, d'edat compresa entre 10-12 setmanes i de pes aproximat d'uns 250 g.

Els animals han estat sotmesos a períodes de 12 hores de llum i 12 hores de fosc, amb la finalitat de mantenir constants els ritmes circadians.

El menjar subministrat ha estat una dieta de manteniment de la casa Panlab S.A. Tant el menjar com la beguda s'ha subministrat *ad libitum* i únicament s'ha retirat el menjar 12 hores abans de qualsevol intervenció quirúrgica.

Els animals s'han sacrificat per desnucació i dessagnament.

#### **3.1.2.- Tècniques quirúrgiques.**

##### **Anestesia**

Com anestèsic s'ha utilitzat Ketolar (Parke Davis), format principalment per Clorhidrat de ketamina, que no presenta cap efecte hepatotòxic.

La dosi d'anestèsic administrada és de 120 mg/kg de pes corporal, via interperitoneal.

##### **Hepatectomia parcial**

Per evitar variacions en la resposta regenerativa, és important estandaritzar l'horari de les intervencions quirúrgiques (Barbason i Le Lievre, 1970). Per tal motiu, totes les operacions s'han realitzat entre 8-10 del mati.

L'hepatectomia parcial consisteix, en l'extirpació d'aproximadament un 70% de la massa hepàtica. La magnitud de la resposta regenerativa és proporcional a la quantitat de massa hepàtica extirpada. L'extirpació del 70% del fetge, assegura una resposta proliferativa elevada amb un índex de mortalitat mínim (Bucher i Swaffiel, 1965).

La tècnica utilitzada és la descrita per Higgins i Anderson, 1931. Una vegada anestesiada la rata, es neteja la superfície abdominal amb alcohol etílic, es fa un tall longitudinal, seguint la línia central de l'abdomen, d'uns 2-3 cm de longitud. A



continuació s'extreuen els lòbuls esquerra i el mig, pressionant lleugerament l'abdomen lateralment, es pincen i després de fer un doble nus, s'extirpen. Finalment es sutura la ferida amb agulla del 3/0 i es neteja amb alcohol.

### 3.1.3.- Administració *in vivo* d'antagonistes adrenèrgics.

S'han administrat a rates hepatectomitzades distins tipus d'antagonistes adrenèrgics:

- Fentolamina, antagonista  $\alpha$ 1- i  $\alpha$ 2- adrenèrgic. S'ha administrat via intraperitoneal 8 h després de l'hepatectomia parcial a una dosi de 2 mg/100 gr de pes corporal, diluït en solució salina:etanol (9:1).
- Prazosin, antagonista  $\alpha$ 1-adrenèrgic. S'ha administrat via intraperitoneal, 8 h després de l'hepatectomia parcial, a una dosi de 2 mg/100 gr de pes corporal, diluït en propilenglicol (pH ajustat a 7.4 amb NaOH 0.1 N).
- D-l-propanolol, antagonista  $\beta$ -adrenèrgic. S'ha administrat via intraperitoneal, 1 h després de l'hepatectomia parcial, a una dosi de 2 mg/Kg de pes corporal, diluït en solució salina.
- Noradrenalina, agonista  $\alpha$ 1- i  $\alpha$ 2-adrenèrgic. S'ha administrat via intraperitoneal, immediatament després d'administrar els antagonistes  $\alpha$ -adrenèrgics (fentolamina i prazosin). La dosi ha estat 6 mg/100 gr pes corporal, diluït en solució salina.

Tal com s'ha descrit la fentolamina és un antagonista que actua a través dels receptors  $\alpha_1$  ó  $\alpha_2$ . El prazosin actua específicament a través dels receptors  $\alpha_1$ . Els agonistes  $\alpha_1$ -adrenèrgics estan implicats en la síntesi d'inositol 1,4,5-trifosfat el qual indueix una sortida de calci del reticle endoplasmàtic (Reinhart i al. 1984, Altin i al. 1985). L'actuació dels antagonistes a través dels receptors  $\alpha_2$ , no està tant definida, però malgrat algunes discrepàncies, es creu que actuen activant la transformació de ATP en AMPc. El d-l-propanolol és un antagonista que actua inhibint l'adenil ciclase, enzim responsable de la transformació de ATP en AMPc, el qual actua com a segon missatger (Stiles i al. 1984, Pritchard i al. 1985).

El temps d'administració dels antagonistes emprats ha estat en funció del temps en que es presenten en el fetge després d'una hepatectomia parcial, les vies específiques d'actuació de cadascun d'els antagonistes. Està descrit que després d'una hepatectomia parcial apareixen dos increments en els nivells d'AMPc, un entre les 2-4 h i l'altre entre les 12-16 h (MacManus i al. 1972; Rixon i Whitfield, 1985; Bachs i-----). Evidències experimentals indiquen que el primer increment d'AMPc regula l'increment citoplasmàtic de calmodulina durant les 6-12 h post-hepatectomia (M.J. Pujol i al. 1987) i s'ha suggerit que el segon increment d'AMPc està relacionat amb l'increment de proteïnes quinases dependents de AMPc que apareix entre les 12-16 h post-hepatectomia parcial. Respecte al calci, està descrit que les concentracions intranuclears del calci regulen mecanismes relacionats amb l'inici de la síntesi de ADN (procés que té lloc a partir de les 12 h post-hepatectomia parcial) (M. J. Pujol i al. 1990) .

#### 3.1.4.- Cultius cel.lulars

Les cèl.lules utilitzades han estat les NRK (Normal Rat Kidney cells), HeLa -----, 3T3 NIH (Swiss fibroblast)... Les cèl.lules s'han cultivat en flascons de plàstic (Costar, Canbridge,MA,USA), en una sola capa fins un 80% de confluència i en una atmòsfera humida al 5% de CO<sub>2</sub> i a una temperatura constant de 37°C.

El medi de cultiu normal utilitzat és DMEM (Dubelcco's Minimum Eagle's medium) suplementat amb el 5% de sèrum fetal, Aminoàcids no essencials 100x (de la casa Flow), 2 mM L-Glutamina i els antibiòtics: penicilina (5000 IU/ml) i streptomicina (5000 µg/µl).

#### 3.1.5.- Sincronització cultius cel.lulars

Les cèl.lules NRK s'han sincronitzat, deixant que el cultiu cel.lular arribés al 100% de confluència i aprofitant la propietat de les cèl.lules normals, d'inhibició de la divisió cel.lular per contacte. Un cop s'arribat al 100% de confluència es substitueix el medi amb el 5% de sèrum fetal per medi amb el 0.5% de sèrum fetal, aquesta concentració de sèrum és suficient per mantenir a les cèl.lules NRK vives i, després de 2 ó 3 dies, ens assegura un elevat percentatge de cèl.lules en fase G<sub>0</sub>. Per activar les cèl.lules sincrònicament, s'han canviat les cèl.lules a noves plaques de

cultiu, utilitzant tripsina 0.05% (W/V) durant 5 min, evitant la confluència i afegint medi amb el 5% de sèrum fetal. Els estudis en cultius cel.lulars sincronitzats s'han realitzat emprant cèl.lules de tres fases concretes del cicle cel.lular: cèl.lules en fase G0 (cèl.lules confluents inactivades), cèl.lules en fase G1 (entre 4-6 h després d'activar-les) i cèl.lules en fase S (cèl.lules després de 20 h d'activació, temps en que s'ha descrit que les cèl.lules NRK presenten el pic màxim de síntesi d'ADN).

### 3.1.6.- Marcatge proteic de cèl.lules en cultiu amb metionina-S<sup>35</sup>.

Per tal de comparar la síntesi proteica de les cèl.lules en fase G1 i S, s'ha realitzat el marcatge de cultius cel.lulars sincronitzats amb metionina-S<sup>35</sup> seguint els passos que es descriuen a continuació:

- Les cèl.lules sincronitzades, tal com s'ha descrit a l'apartat anterior, s'activen i es posen a créixer en dues plaques de 60 mm de diàmetre ( $0.4 \cdot 10^6$  cèl.lules aproximadament).

- Després de 3 h d'activació es canvia a cadascuna de les plaques, el medi normal de cultiu per 1 ml de medi lliure de metionina i s'ha afegeix 100  $\mu$ Ci de metionina-S<sup>35</sup>.

- A les 6 h després de l'activació (3 h d'incubació amb metionina-S<sup>35</sup>), s'extreuen les cèl.lules d'una de les plaques afegint 400  $\mu$ l de tampó de mostres (apartat 3.5.1.). Aquestes cèl.lules representen les cèl.lules en fase G1.

- A les 20 h després de l'activació (17 h d'incubació amb metionina-S<sup>35</sup>), s'extreuen les cèl.lules de la segona placa afegint també, 400  $\mu$ l de tampó de mostres. Aquestes representen les cèl.lules en fase S, tal com s'ha descrit a l'apartat anterior.

Les cèl.lules resuspeses en tampó de mostres es poden guardar a -80°C.

Les proteïnes de cèl.lules en cultiu marcades amb metionina-S<sup>35</sup>, s'han analitzat mitjançant gels bidimensionals (apartat 3.5.2) i el marcatge s'ha amplificat aplicant tècniques fluorogràfiques (apartat 3.5.3.3).

## 3.2.- MÈTODES DE SUBFRACCIONAMENT CEL.LULAR

### 3.2.1.- Subfraccionament cel.lular de teixit hepàtic

#### 3.2.1.1.- Obtenció de nuclis i matriu nuclear

Per l'obtenció de nuclis i matriu nuclear dels hepatòcits de rata, s'ha seguit el mètode descrit per S.H. Kaufman i J.H. Shaper, 1984.

#### Obtenció de nuclis

Es parteix de 4 fetges normals ó 12 fetges hepatectomitzats de rata, els quals es perfundeixen immediatament després de l'extracció amb 0.9% ClNa fred.

\* S'homogenitzen amb un homogenitzador Potter-Elvehjem tefló vidre, 3-5 *strokes* en el següent tampó d'homogenització (STM):

250 mM Sacarosa  
50 mM Tris-HCl pH 7.4 a 4°C  
5 mM MgSO<sub>4</sub>  
1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl)  
100 unitats Trasylol/ml

El PMSF i el Trasylol són inhibidors de proteases que afegim al tampó moments abans d'utilitzar-lo.

L'homogenat es filtra en 4 capes de gasa i es porta a un volum final de 240 ml. A continuació es centrifuga a 800 g (2575 rpm) durant 15 minuts. El sobrenadant s'elimina per aspiració i el pellet es resuspèn en tampó STM/PMSF,Trasylol i es repeteix el pas anterior.

El pellet obtingut en aquesta segona centrifugació es resuspèn amb el tampó DS:

2.1 M Sacarosa  
50 mM Tris-HCl pH 7.4 a 4°C  
5 mM MgSO<sub>4</sub>  
1 mM PMSF

i es col.loquen 10 ml en un tub d'ultracentrifuga sobre un coixí de 28-29 ml de

tampó DS/PMSF. Es centrifuga a 20,000 rpm (72,000 g) durant un hora, utilitzant un rotor basculant Beckman (SW-28).

El sobrenadant s'elimina per aspiració i el pellet es resuspèn amb el tampó STM/PMSF. A continuació es repeteix el pas anterior centrifugant 10 ml de mostra sobre un coixí de DS/PMSF a 20,000 rpm durant 30 minuts.

Després d'aquesta centrifugació el pellet obtingut correspon a la fracció nuclear. La densitat del coixí de sacarosa selecciona la sedimentació de nuclis exclusivament.

Resuspenem el pellet amb 3.5 ml de tampó STM/PMSF, guardem una alíquota de 0.5 ml a -80°C i els 3 ml restants els utilitzem per l'obtenció de matriu nuclear.

\* A partir d'ací tots els passos, tant per l'obtenció de nuclis com per l'obtenció de matriu nuclear, es fan a 4°C.

### **Obtenció de matriu nuclear**

Per cada 1000 µl de suspensió nuclear s'afegeixen 100 µl de les solucions DNasa I (2.5 mg/ml) i RNasa A (2.5 mg/ml) respectivament. Aquestes solucions 2.5 mg/ml de DNasa I i RNasa A estan dissoltes en el tampó:

10 mM Tris-HCl pH 7.4 a 4°C  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
0.5 mM PMSF  
1000 unitats Trasylol/ml

Després d'una hora de incubació els nuclis es sedimenten a 800 g durant 15 minuts. El sobrenadant (S1), format principalment per ARN, ADN i proteïnes no histones associades a l'ADN, es guarda a -80°C. Al pellet s'afegeixen 800 µl de tampó LS: 10 mM tris-HCl pH 7.4 a 4°C, 0.2 mM MgSO<sub>4</sub>; s'agita i a continuació s'afegeix lentament 3.2 ml de tampó HS: 2 M NaCl en tampó LS. La concentració final de sal en la mostra serà de 1.6 M. Després d'incubar durant 15 minuts, es centrifuga a 5,000 g 20 minuts.

El sobrenadant (S2) format per histones i altres proteïnes solubles principalment, es guarda a -80°C i amb el pellet es repeteix el pas anterior.

El pellet obtingut correspon a la fracció de matriu nuclear (MN), formada per l'embolcall nuclear, les làmines nuclears, restes de nucleol i altres proteïnes no

histones molt insolubles.

La matriu nuclear la resuspenem amb 1 ml de tampó LS i es guarda a -80°C.

### 3.2.1.2.- Obtenció de filaments intermedis (IF)

Es parteix de 23 gr de fetge de rata prèviament perfundits amb 0.9% de NaCl fret.\* Homogenitzem els fetges amb un homogenitzador Potter-Elvehjem tefló vidre, 3-5 *strokes* en el tampó IF (0.1 M NaCl):

0.1 M NaCl  
10 mM Tris-HCl pH 7.5 a 4°C  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
1 mM PMSF  
100 unitats Trasylol/ml

L'homogenitzat es filtra a través de 4 capes de gasa i es porta a un volum final de 250 ml. A continuació es centrifuga 15 minuts a 3000 g. El sobrenadant obtingut s'elimina i es resuspèn el pellet amb el tampó IF (1.5 M NaCl): és el mateix tampó IF descrit anteriorment però substituint 0.1 M NaCl per 1.5 M NaCl i afegint 0.5 % trito X-100. Després d'incubar l'homogenat amb aquest tampó que conté trito durant 1 hora amb agitació forta es centrifuga 15 minuts a 3000 g. El pellet obtingut seran els filaments intermedis, els quals, en el fetge de rata són formats per les citoqueratines 8 i 18 principalment. Aquest pellet es resuspèn amb el tampó IF (0.1 M NaCl).

### 3.2.2.- Subfraccionament cel.lular de cèl.lules en cultiu

#### 3.2.2.1.- Obtenció de nuclís

Per l'obtenció de nuclís a partir de cèl.lules en cultiu seguim el mètode descrit per Penman i altres, 1987, amb algunes modificacions.

Partim de  $2.0 \cdot 10^7$  cèl.lulés, que creixen adherides a la superfície dels flascons de cultiu. Traiem el medi de cultiu i rentem dues vegades per 5 minuts amb PBS pH 7.4 a 37°C. Seguidament incubem les cèl.lules 10 minuts amb 2 mM EGTA a 37°C

o bé 3-4 minuts amb 0.05% tripsina/0.02% EDTA, per tal d'obtenir les cèl.lules en suspensió. Si usem tripsina, passats els 3-4 minuts afegim medi de cultiu amb 10% de sèrum fetal, per neutralitzar l'efecte de l'enzim.

Es centrifuga la suspensió cel.lular 5 minuts a 650 g, s'elimina el sobrenadant i es resuspenen les cèl.lules amb tampó CSK 100:

100 mM NaCl  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
1% Trito X-100  
0.5 mM CaCl<sub>2</sub>  
1.2 mM PMSF  
10 mM PIPES pH 6.8

Suspenem 1 ml de tampó CSK 100 per cada 10<sup>7</sup> cèl.lules i s'incuben 5 minuts a 4°C. Es barregen amb el vortex 5 vegades per 5 segons i es centrifugen 5 minuts a 650 g. El pellet obtingut és la fracció nuclear més les proteïnes citoplasmàtiques insolubles, majoritàriament formades per els filaments intermedis. El pellet obtingut, es resuspèn amb el tampó CSK 50 (es diferencia del tampó CSK 100 amb la concentració de NaCl, en aquest cas és 50 mM), i guardem la mostra a -80°C.

### 3.2.2.2.- Obtenció de nuclis, matriu nuclear i citoesquelet *in situ*.

L'obtenció de nuclis i posteriorment de matriu nuclear i citoesquelet *in situ* per l'estudi de localització d'antígens, s'ha realitzat seguint el mètode descrit per Fey i al.(1986). Les cèl.lules es posen a créixer en cubres de vidre de 10 mm de diàmetre, es renten amb tampó fosfat salí (PBS pH 7.4: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 150 mM NaCl) abans de permeabilitzar-les durant 3 minuts a 4°C amb 0.5% de trito X-100 en tampó CSK:

10 mM PIPES pH 6.8  
100 mM KCl  
300 mM Sacarosa  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EGTA  
1.2 mM PMSF

Després d'aquesta permeabilització, en la que s'eliminen les proteïnes solubles citoplasmàtiques, obtenim citosquelet cel.lular i nuclis. Per tal de purificar la subfracció de nucli, matriu nuclear, fem un extracció de la cromatina i l'ARN digerint durant 30 minuts a temperatura ambient en 100 µg/ml DNasa I i 100 µg/ml RNasa A en el tampó de digestió:

10 mM PIPES pH 6.8  
50 mM KCl  
300 mM Sacarosa  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EGTA  
1.2 mM PMSF  
0.5% trito X-100

Passats els 30 minuts afegim sulfat amònic fins una concentració final de 250 mM, a partir d'una solució stock de 1 M. Després de 3 minuts d'incubació en 0.25 M sulfat amònic, per extreure les proteïnes nuclears solubles, es renta amb tampó CKS. L'estructura cel.lular que obtenim finalitzat el procés, està formada pels filaments intermedis i la matriu nuclear (IF-MN).

### 3.3.- MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ DE PROTEINES

Per determinar la quantitat de proteïna de les mostres s'han utilitzat tres mètodes diferents:

#### 3.3.1 - Mètode Lowry

Quantificació proteica segons el mètode descrit per Lowry et al. 1951:

Reactius:

reactiu 1) CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> al 2% en NaOH 0.1 N  
reactiu 2) SO<sub>4</sub>Cu · 5H<sub>2</sub>O al 0.5%  
reactiu 3) tartrat sòdio-potasio al 1.1%  
reactiu 4) reactivo Folin-Ciocalteu



reactiu 5) Albúmina sèrica bovina (BSA) 0.1 mg/ml

Abans de l'assaig es preparen les següents solucions:

- solució A: 1 ml de reactiu 3  
48 ml de reactiu 1 (agitem).  
1 ml de reactiu 2  
(Es important mantenir sempre aquest ordre.)
- solució B: El reactiu 4 es dilueix amb una proporció 1:1 amb aigua bidestil.lada.

#### Procediment:

Per fer la corba estandar, es preparen distintes concentracions de 0, 10, 20, 40 i 80 µg/ml de reactiu 5. A continuació s'afegeix l'aigua bidestil.lada necessària per arribar a un volum final de 0.5 ml.

En la resta de tubs es posen 50 µl de mostra diluïda 10 vegades i 450 µl d'aigua bidestil.lada. A cada tub s'afegeixen 2.5 ml de la solució A, s'agiten els tubs i s'espera 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament es posen 250 µl de la solució B a cada tub, s'agiten i passats 30 minuts a temperatura ambient es llegeix l'absortivitat en un espectrofotòmetre a 750 nm.

Els µg/µl de proteïna de cada mostra es calculen aplicant la següent fòrmula:

$$\frac{\text{D.O}}{\text{pt}} \frac{\text{dilució}}{\mu\text{l mostra}} = \mu\text{g de proteïna} / \mu\text{l}$$

pt= pendent de la corba estandar calculada gràficament.

### 3.3.2.- Mètode Lowry modificat

Quantificació proteica segons el mètode Lowry modificat:

Aquesta modificació del mètode Lowry ens serveix per determinar proteïnes en presència de material que interfereix com: detergents, SDS...(Anal. Biochem. 70, 241, 1976). Aquest mètode està basat en la precipitació de les proteïnes per separar-les del material que interfereix.

Reactius:

- A) 2%  $\text{NaCO}_3$   
0.4%  $\text{NaOH}$   
0.16% Na-tatrate  
1% SDS (sodium dodecyl sultat)
- B) 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- C) barrejar 100 parts de reactiu A amb 1 part de reactiu B.
- D) Diluir el reactiu Folin-Ciocalteu 1:1 amb aigua desionitzada.

Els reactius A i B són estables indefinidament a temperatura ambient.

Els reactius C i D s'han de preparar al moment, cada cop que es necessitin.

- La mostra de proteïna es porta fins a un volum de 0.5 ml amb aigua destil.lada.
- S'afegeix 4.2  $\mu\text{l}$  de 2% sodium deoxycholate.
- Es barreja fortament i es deixar incubar durant 15 min.
- S'afegeix 167  $\mu\text{l}$  de 24% TCA (trichloacetic acid), es barreja i es centrifuga a 10,000 g durant 10 min.
- S' elimina el sobrenadant amb una pipeta Pasteur. S'ha d'anar amb molta cura de no desfer el pellet.
- El pellet es dissol amb 3 ml de reactiu C, es barreja fortament i s'esperen 10 min.
- S'afegeixen 0.3 ml de reactiu D i després de 30 minuts es llegeix l'absortivitat en l'espectrofotòmetre a 750 nm.

La corba estandar i el blanc es preparen seguint el mateix procediment.

La quantitat de proteïna de cada mostra es calcula aplicant la fórmula descrita en l'apartat anterior.

### 3.3.3.- Mètode Bradford

Quantificació proteica segons el mètode Bradford 1976, basat en la unió directa del colorant a la proteïna.

#### Procediment

- Per fer la corba estandar, es preparen distintes concentracions de BSA 0.1 mg/ml, de 0, 3, 5, 10, 15, 20 i 25 µg/µl. A continuació s'afegeix aigua milli Q fins un volum de 0.8 ml.

De cadascuna de les mostres a quantificar, s'agafen entre 5-20 µl i es porten fins un volum de 0.8 ml amb aigua milli Q.

- S'afegeixen 0.2 ml de reactiu *Bio-Rad assay* a cadascun dels tubs i es llegeix l'absortivitat a 595 nm després d'un mínim de reacció de 5 min. i un màxim de 1 hora.

- Els µg/µl de proteïna es calculen aplicant la fórmula descrita a l'apartat 3.3.1.

### 3.4.- OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS.

#### 3.4.1.- Purificació de l'antigen.

L'antigen s'ha purificat a partir de gels SDS-poliacrilamida. Els antigens obtinguts per aquest mètode presenten una alta resposta immunogènica.

S'han separat les proteïnes de la fracció matriu nuclear d'hepatòcits 24 h regenerants post-hepatectomia parcial en gels del 6% SDS-poliacrilamida de mida 1.6mm x 25cm x 16cm, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.5.1. La quantitat de mostra carregada ha estat entre 1-2 mg.

Per detectar les proteïnes del gel, s'han tenyit aquests en una solució de Coomassie blue suau: 0.5 gr/l Coomassie blue R-250 en aigua destil.lada, i s'han destenyit amb aigua destil.lada.

S'ha tallat la banda corresponent a la proteïna que es vol purificar, en aquest cas ha estat una proteïna de 55 KDa.

La banda tallada es guarda congelada a -80°C o s'electroelueix directament per

tal de separar la proteïna del gel.

### 3.4.2.- Electroelució de proteïnes.

S'ha realitzat en un concentrador de mostres electroforètiques, ISCO.

L'electroelució es basa en eluir la proteïna de la banda de gel mitjançant el pas de la corrent a través del tampó electrolític. El tampó electrolític que s'ha utilitzat és el 50% del tampó electrolític de les electroforesi SDS-poliacrilamida. L'electroelució es realitza a 20 V i el temps es variable depenent del pes molecular de la proteïna que es vol eluir, en el cas de la proteïna de 55 KDa el temps d'electroelució ha estat en dues fases: una primera fase de 1 h, després de la qual s'ha recollit una alíquota de 200 µl de proteïna eluïda i una segona fase de 2 ó 3 h per deixar que s'acabi d'eluir tota la proteïna del gel.

### 3.4.3.- Procés d'immunització.

Després de comprovar la purificació i electroelució de la proteïna en gels SDS-poliacrilamida, s'ha procedit a l'obtenció d'anticossos immunitzant conills amb la proteïna electroeluída segons la següent pauta:

#### Preparació de l'antigen.

L'antigen s'injectarà al conill barrejat amb un altre compost, *Freund's adjuvant*, per tal d'estimular la resposta immune.

L'adjuvant és un estimulador no específic de la resposta immune. Hi han diferents tipus d'adjuvants però el més comú per treballs de recerca és *Freund's adjuvant*. Aquest consisteix en una emulsió formada per dos components: un component preparat amb olis no metabolitzables, que prevenent a l'antigen del procés de catabolisme ràpid i un segon component format per una barreja de bacteris atenuats (*Mycobacterium tuberculosis*), que estimularan la resposta immune no específica.

S'utilitzen dos tipus de *Freund's adjuvants*:

- 1- *Freund's adjuvant* complet (CFA).

Format pels dos components i amb el que es barrejarà l'antigen per la

primera injecció (injecció primària).

2- *Freund's adjuvant* incomplet (IFA).

Format només pel primer component descrit. Amb aquest es barrejarà l'antigen en les injeccions de record de la resposta immune (boosters).

L'antigen s'ha diluït en solució salina (PBS) i s'ha barrejat amb l'adjuvant a parts iguals (Ag + PBS : Adjuvant).

La dosi mínima d'antigen capaç d'induir resposta en els conills és entre 10-100 µg. La dosi recomanable, si l'antigen és una proteïna purificada soluble, és entre 0.5-1 mg.

Aquests valors són valors relatius, ja que la resposta i producció d'anticòs dependrà de factors com:

- la ruta d'injecció
- l'adjuvant utilitzat
- l'espècie on es produeix l'anticòs
- la naturalesa intrínseca de l'antigen



### **Procés d'immunització.**

El primer pas ha estat comprovar que el sèrum dels conills que es vol immunitzar no contenen IgGs que reaccionin específicament contra proteïnes de la mostra que es vol estudiar i contra les quals es volen obtenir els anticossos. Per tal motiu, una o dues setmanes abans d'immunitzar, s'ha extret sèrum dels conills i s'ha comprovat mitjançant immunotransferència de les mostres en estudi, que no reconeix bandes específiques. Aquest sèrum pre-immune, a part de servir com a control d'immunització, servirà com a control de reacció dels estudis bioquímics i immunocitoquímics que es realitzaran amb l'anticòs obtingut.

El següent esquema resumeix el procés d'immunització que s'ha portat ha terme utilitzant com antigen la proteïna de 55 KDa:

. Injecció primària (intramuscular)  
650 µl p55 (500 µg aprox.) + 350 µl PBS +  
1 ml CFA

↓ 2 setmanes

Primera injecció de record (subcutània múltiple)

400 µl p55 + 400 µl PBS + 800 µl IFA

↓ 2 setmanes

Segona injecció de record (subcutània múltiple)

400 µl p55 + 400 µl PBS + 800 µl IFA

↓ 10 dies

Sagnada 1 (*bleeding*)

20-40 ml

↓ 3 dies

Sagnada 2

↓ 3 dies

Sagnada 3

↓ 3 dies

Sagnada 4

↓ 2 setmanes

Sagnada 5

↓ 3 dies

Sagnada 6

↓ 3 dies

Sagnada 7

↓ 3 dies

Sagnada 8

Les sagnades s'han realitzat per via vena marginal de l'orella del conill i no s'ha extret més de 50 ml de sang en cadascuna de les sagnades.

La sang extreta s'ha recollit en vials de vidre i s'ha deixat a temperatura ambient durant 1 hora. S'ha després el coàgul de les parets del vial amb una pipeta Pasteur i s'ha deixat tota la nit a 4°C per tal d'obtenir el sèrum. Es recull el sèrum i es centrifuga a 10000 g durant 10 minuts a 4°C per eliminar precipitats.

Al sèrum obtingut s'afegeix 0.02% azida sòdica, per evitar contaminacions de bacteris o fongs, i es guarda a -20°C.

#### **3.4.4.- Purificació d'anticossos.**

S'han emprat diferents mètodes per purificar els anticossos policlonals obtinguts:

- 1- Purificació per columnes de prot A.
- 2- Purificació per afinitat.

##### **3.4.4.1.- Purificació per columnes de prot A.**

La proteïna A presenta grups específics que s'uneixen a les regions Fc de IgGs diferents i de distintes espècies. Així doncs, la utilització de la prot A per purificar anticossos dependrà del tipus de Igs que es vulguin purificar i de l'espècie que provenen.

Les IgGs de conill tenen gran afinitat per la prot A, per tant amb aquest mètode de purificació es seleccionaran les IgGs del sèrum eliminant altres proteïnes i molècules solubles que podrien interferir en els assajos.

La purificació s'ha realitzat seguint els següents passos:

- S'ajusta el pH del sèrum a 7.4 afegint 100 mM PBS pH 7.4.
- Es passa el sèrum per la columna de prot A, prèviament equilibrada amb PBS pH 7.4, a una velocitat molt baixa durant 4 hores en circuit tancat.

La columna de prot A uneix entre 10-20 mg d'anticòs per ml de volum de columna hidratada (una molècula de prot A uneix dues molècules d'anticòs). El sèrum conté aproximadament 10 mg de IgGs totals.

- Rentat de la columna passant un volum de PBS 10 vegades el volum de la columna.
- Eluir l'anticòs amb 100 mM glicina pH 3.0. L'eluit es recull en alíquotes de 500 µl i en els quals s'afegeix 50 µl de 1 M Tris pH 8.0 per neutralitzar el pH.

- Les fraccions que contenen l'anticòs s'identifiquen llegint l'absortivitat a 280 nm (1 OD = 0.8 mg/ml aprox.) o per immunotransferència de l'antigen amb el qual s'ha obtingut l'anticòs.

(Tots els passos s'han realitzat a 4°C).

#### **3.4.4.2.- Purificació per afinitat.**

Amb aquest mètode obtenim les IgGs del sèrum específiques contra l'antigen que interessa. El desavantatge és que el rendiment de la purificació és molt baix.

Les condicions òptimes per obtenir un gran rendiment serien: alta afinitat d'unió antigen/anticòs i fàcil elució de l'anticòs. Aquestes condicions es presenten poques vegades, ja que si la unió és de gran afinitat resulta molt difícil l'elució total de l'anticòs.

Per a la purificació de l'anticòs per afinitat amb l'antigen s'han emprat dos mètodes:

- 1- purificació per afinitat en filtres de nitrocel.lulosa.
- 2- purificació per cromatografia d'afinitat en columnes CNBr-Sepharose 4B.

#### **1- Purificació per afinitat en filtres de nitrocel.lulosa.**

Aquest mètode de purificació de l'anticòs per afinitat a l'antigen unit a filtre de nitrocel.lulosa és un mètode ràpid de purificació però s'obté l'anticòs molt diluït. Si el títol de l'anticòs no és massa alt es convenient al finalitzar la purificació concentrar l'anticòs.

Per la purificació s'ha procedit tal com es descriu a continuació:

- Unió de l'antigen a filtres de nitrocel.lulosa.

Aquest pas s'ha realitzat transferint la banda de proteïna purificada o antigen d'un gel al filtre de nitrocel.lulosa o cobrint directament un tros de filtre de nitrocel.lulosa amb la solució d'antigen durant uns 5 min i deixant-lo assecat posteriorment uns 10min a temperatura ambient.

Per la purificació de l'anticòs policlonals anti-p55, s'ha utilitzat com antigen la proteïna purificada p55.



- Rentat dels filtres amb PBS durant 10 min.
- Bloqueig dels llocs lliures d'antigen amb 2% llet en pols, PBS durant 20 min.
- Incubació amb el sèrum durant 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.
- Rentats amb PBS de 10 min x 3.
- Elució de l'anticòs amb 100 mM Glicina pH 3.0, utilitzant un volum mínim.
- Es recull la solució d'elució amb l'anticòs eluït i s'afegeix 10% 1M Tris pH 8.0 per neutralitzar el pH.

## **2- Purificació per cromatografia d'afinitat en columnes de *CNBr-Sepharose 4B*.**

La purificació de l'anticòs per afinitat a l'antigen unit a columnes se *Sepharose 4B* s'ha realitzat segons els següents passos:

### Acoblament de l'antigen a la columna *CNBr-Sepharose 4B*

La unió de la resina Sepharose 4B activada amb bromur de cianogen amb l'antigen és una unió covalent entre els grups -OH lliures de la resina i els grups -NH<sub>2</sub> de l'antigen.

- Hidratació resina. S'ha hidratat 1 gr de CNBr-Sepharose 4B amb 1mM HCl durant 15 min a temperatura ambient. (1 gr de resina equival a 3.5 ml de resina hidratada).
- Incubació d'acoblament. S'ha filtrat l'excés de HCl, s'ha afegit l'antigen, en aquest cas 4 ml de p55 purificada (3mg aprox.), i 15 ml de tampó d'acoblament:

0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3

0.5 M NaCl

S'ha deixat acoblant toïa la nit a 4°C amb agitació rotatòria suau.

(En general aquesta incubació d'acoblament es realitza amb 5-10 mg d'antigen per ml de resina).

- Filtració de la resina i rentats amb PBS.
- Bloqueig dels radicals lliures de la resina amb 15 ml 1 M etanolamina durant 2 h a temperatura ambient, amb agitació rotatòria suau.
- Rentats amb PBS de 10 min x 3.
- S'ha muntat la resina en una columna i s'ha deixat a 4°C a punt per la purificació de l'anticòs.

#### Tractament dels sèrum abans de purificar

El sèrum cru (sense cap tractament) es pot purificar directament per columnes d'afinitat, ajustant el pH d'aquest amb 1/10 Tris 1 M pH 7.4. Però, per tal d'eliminar proteïnes i molècules solubles del sèrum que interfereixen i disminueixen el rendiment de la purificació, s'ha pre-purificat el sèrum abans de purificar-lo per cromatografia d'afinitat.

S'han realitzat dos tipus de pre-purificació del sèrum cru:

- purificació per columna de prot A (tal com s'ha descrit anteriorment) o,
- purificació per precipitació amb sulfat amònic.

La precipitació amb sulfat amònic ha consistit en:

- Diluir 4 ml de sèrum amb 4 ml de PBS pH 7.4 i afegir gota a gota el mateix volum total (8 ml) de  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$  saturat pH 7.4.

S'ha deixat precipitant durant 30 min a 4°C

- Centrifugació a 10 000 rpm durant 20 min.
- Resuspensió del pellet amb 4 ml PBS (volum inicial de sèrum) i es torna a

precipitar afegint 4 ml de sulfat amònic.

- Centrifugació a 10 000 rpm durant 20 min.
- Resuspensió del pellet amb PBS i es dialitza enfront PBS pH 7.4 tota la nit a 4°C.
- Centrifugació durant 15 min a 10 000 rpm.
- Es recull el sobrenadant, que ja es podrà passar per la columna d'afinitat o guardar a -20°C.

#### Procés de purificació per cromatografia d'afinitat.

La purificació del sèrum anti-p55, pre-purificat o no, a través de la columna *CNBr-Sepharose 4B* amb l'antigen p55 acoblat, s'ha realitzat seguint els següent passos:

- Rentat de la columna *CNBr-Sepharose 4B/p55* amb PBS durant 30 min.
- S'ha passat el sèrum pre-purificat per columna de prot A o precipitat amb sulfat amònic per la columna d'afinitat a una velocitat molt baixa i constant amb l'ajut d'una bomba peristàtica, i en circuit tancat, durant 6 h a 4°C. Es fa voltar el sèrum unes 4 ó 5 vegades.
- Rentat de la columna amb PBS, un volum equivalent a 20 vegades el volum de la columna.
- Elució de l'anticòs amb 100 mM Glicina pH 3.0.
- L'eluït es recull en alíquotes de 500 µl, afegint a cadascuna de les alíquotes 50 µl de 1 M Tris pH 8.0 per tal de neutralitzar el pH.

(Tots els passos es realitzen a 4°C).

Les fraccions que contenen l'anticòs s'identifiquen utilitzant els mètodes descrits a l'apartat 3.4.4.1.

Les columnes d'afinitat es poden reutilitzar però no són molt estables. Per comprovar si l'acoblament de l'antigen a la columna persisteix en el moment de la reutilització s'ha emprat el següent mètode (*beads immuno assay*):

- S'han agafat 50 µl de resina de la columna d'afinitat (*CNBr-Sepharose 4B/p55*) i s'han col.locat en un eppendorf.
- S'ha bloquejat els radicals lliures amb 100 µl 1% BSA/PBS a temperatura ambient durant 30 min.
- Centrifugació amb la microfuga a 10 000 rpm durant 1 min.
- Resuspensió del pellet amb 100 µl del primer anticòs, en aquest cas el sèrum anti-p55 que es vol purificar, diluït 1/10 amb PBS, 1% BSA. Incubació durant 1 h a temperatura ambient amb agitació suau.
- Microcentrifugació a 10 000 rpm durant 1 min.

Es descarta el sobrenadant i es renta el pellet amb 1 ml de PBS/0.05% Tween-20, durant 1 min x 5.

- El pellet de l'últim rentat es resuspèn amb el segon anticòs: anti-rabbit conjugat amb peroxidasa, diluït 1/500 en PBS/1% BSA. S'incuba durant 1 h a temperatura ambient agitant-se.
- Microcentrifugació a 10 000 rpm durant 1 min i rentat del pellet amb 1 ml de PBS/0.05% Tween-20 durant 1 min x 9.
- El pellet de l'últim rentat s'incuba amb la solució DAB (apartat 3.6.) per revelar les unions.

Aquest procés es realitza per duplicat sense afegir el primer anticòs en una de les mostres per tal de tenir un control negatiu de la reacció antigen/anticòs.

### **3.5.- ELECTROFORESI DE PROTEINES**

#### **3.5.1.- Electroforesi en gels SDS-poliacrilamida.**

Per l'anàlisi electroforètic de proteïnes es preparen gels de poliactilamida d'acord amb la tècnica descrita per Laemmli en 1970.

Les plaques de gels són formades per dos tipus de gels:

- 1 - gel resolutiu o *resolving*.  
 2 - gel empaquetador o *stacking*.

El gel empaquetador es col.loca en la part superior, té una mida de porus gran que permet que les proteïnes es desplacin juntes a una velocitat similar fins al gel resolutiu. El gel resolutiu col.locat a la part inferior té una mida de porus més petit, que podem seleccionar, i ens separa les proteïnes d'acord el seu pes molecular.

Per preparar aquests gels utilitzem les següents solucions:

- solució 1: 0.75 M tris-HCl pH 8.8 a 20°C  
0.2 % SDS (Sodium dodecylsulfate)
- solució 2: acrilamida 30%  
N,N' metilen-bis acrilamida 0.8%
- solució 3: 0.25 m Tris-HCl pH 6.8 a 20°C  
0.2% SDS
- solució 4: Persulfat amònic 13%

Per prepara dues plaques electroforètiques (mini-gel 0.75mm x 8cm x 6cm) es fa d'acord el següent quadre:

	gel resolutiu					gel empaquetador
conc. final	6%	8%	10%	12%	15%	3.4%
solució 1 (ml)	4	4	4	4	4	-
solució 2 (ml)	1.6	2.2	2.7	3.2	4	0.225
solució 3 (ml)	-	-	-	-	-	0.975
H <sub>2</sub> O (ml)	2.4	1.8	1.3	0.8	-	0.775
TEMED (µl)	10	10	10	10	10	5
solució 4 (µl)	40	40	40	40	40	20
Total (ml)	8	8	8	8	8	2

Primer es realitza el gel resolutiu i un cop polimeritzat es carrega a sobre el gel empaquetador en el qual introduïm una pinta que definirà el pous on es carregaran les mostres. Les mostres es dilueixen amb una proporció 1:3 amb tampò de mostres i s'escalfen a 100°C durant 3 minuts abans de carregar-les al gel.

El tampò de mostres consta dels següents components:

- 0.125 M Tris-HCl pH 6.8
- 4% SDS
- 20% Glicerol
- 10% 2-B-Mercaptoetanol
- 0.006% Blau de Bromofenol (BPB)

L'electroforesi es fa córrer a un voltatge de 100V pel gel empaquetador i de 150v pel gel resolutiu, en el tampò electròlit format per:

- 0.025 M Tris
- 0.192 M Glicina
- 0.1% SDS

el pH de la barreja és de 8.3 a 20°C.

El volum de mostra que es carrega al gel depèn de la concentració de la mostra i de la concentració de mostra que interressi carregar per obtenir un bon anàlisi. Si les mostres són molt diluïdes és recomanable i en molts casos imprescindible concentrar les mostres abans de carregar-les al gel. En aquests casos les mostres s'han concentrat precipitant-les amb tricloracètic (TCA).

#### **Precipitació de mostres amb TCA:**

- Afegir la solució 100% TCA diluïda 1/10 al volum de mostra que es vol carregar.
- Es deixa precipitar durant 10 min i es centrifuga 10 min a 10000 rpm.
- Es resuspèn el pellet amb acetona-HCl (-20°C).
- Es torna a centrifugar 10 min a 10000 rpm.
- Es treu el sobrenadant i s'asseca el pellet mitjançant una suau corrent de

N<sub>2</sub>. - Es resuspèn el pellet amb un volum petit de H<sub>2</sub>O milli Q i s'afegeig el tampó de mostres.

### **3.5.2.- Electroforesi bidimensional (2D-page).**

El mètode utilitzat està basat en el descrit per O'Farrell (1975) amb les modificacions descrites posteriorment per J.E. Celis i R. Bravo (1984).

Amb la tècnica d'electroforesi bidimensional separem les proteïnes d'una barreja segons dues propietats independents de les proteïnes, el punt isoelectric (pI) i pes molecular (pM). Aquestes propietats combinades ens permeten identificar diferents proteïnes d'igual pes molecular o diferents isoformes d'una mateixa proteïna, que amb els gels convencionals d'una sola dimensió, descrits a l'apartat anterior, no és possible identificar.

Les electroforesi bidimensionals consten de dues parts:

#### **3.5.2.1.- Primera dimensió.**

Es separen les proteïnes en gels segons el seu punt isoelectric.

Hi han dos mètodes per separar les proteïnes segons el punt isoelectric i aquests són els que donen nom a tipus d'electroforesi bidimensional, el IEF (isoelectric focusing) i el NEPHGE (nonequilibrium pH gradient electrophoresis). La diferencia entre els dos és el rang de pH que analitzen.

##### **3.5.2.1.1.- IEF (*isoelectric focusing*) electroforesi**

S'utilitzen en l'estudi de proteïnes amb un rang de pH neutre o àcid (entre 4 i 7).

Les solucions necessàries per preparar els gels i les mostres de la 1<sup>a</sup> dimensió són les següents:

Solució de lisi

9,8 M Urea  
 2% (p/v) NP40  
 2% amfolits pH 7-9  
 100 mM DTT  
 es guarda a -80°C

Solució d'acrilamida

28.38% Acrilamida  
 1.62% bis-acrilamida  
 es guarda a 4°C.

Solució d'overlay

8 M Urea  
 1% amfolits pH 7-9  
 5% NP40  
 100 mM DTT  
 es guarda a -80°C.

Solució NP40

10% NP40 en H<sub>2</sub>O  
 es guarda a temp. amb.

Solució d'equilibrat

0.06 M Tris-HCl pH 6.8  
 2% SDS  
 100 mM DTT  
 10% Glicerol  
 es guarda a temp. amb.

Tampó de mostres

2% SDS  
 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 50 mM Tris-HCl pH 6.8  
 es guarda a temp. amb.

Tampó electròlit superior (-)

20 mM NaOH

Tampó electròlit inferior (+)

10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Preparació dels gels

Els gels s'han preparat en tubs de 15 cm de llarg i 6 mm de diàmetre. El gel pròpiament ocupa 13 cm de tub i a la part superior carregarem una sola mostra.



Per lo tant prepararem un nombre de gels equivalent al nombre de mostres que es volen analitzar. Per realitzar 8 gels preparem la següent solució:

12.36 gr d'urea  
2.93 ml de solució acrilamida  
4.5 ml de solució NP40  
4.5 ml d'H<sub>2</sub>O  
0.72 ml d'amfolits pH 5-7  
0.18 ml d'amfolits pH 3.5-10  
22.5 µl 10% persulfat amònic  
15 µl TEMED

Els amfolits utilitzats són de la casa LKB. Els amfolits de rang 3.5-10 donen un marge ampli de pH i els amfolits pH 5-7 reforcen el rang de pH més àcid. Les barreges d'amfolits i els rangs de pH que es reforcen poden ésser variables, depèn de les característiques de les proteïnes que interressi analitzar. Aquests dos amfolits s'han substituït, en alguns casos, pel de pH 3.5-9.5 (ref. 80-127-15) que ja ve reforçat comercialment en la zona de pH més àcid.

### Prerunning

Després de deixar polimeritzar els gels durant una hora es realitza un *prerunning* per tal d'enfocar els amfolits. Pel *prerunning* procedim de la següent manera:

- Carreguem a la part superior de cada tub 30 µl de tampó de lisi i sobre del tampó de lisi posem 30 µl de tampó overlay.
- Posem els tampons electròlits (el tampó superior el desgasifiquem durant uns 10 min abans de carregar-lo) i connectem l'elèctrode positiu a la cambra d'electròlit inferior i el negatiu a la cambra d'electròlit superior.
- Fem córrer els gels:

15 min a 200 V  
30 min a 300 V  
60 min a 400 V

- Traiem les solucions de la part superior dels gels, netegem amb aigua bidestil.lada i carreguem les mostres.

Preparació de les mostres

Les mostres es dilueixen en una proporció 1:1 amb tampó de mostres i s'escalfen 2 min a 100°C. Un cop bullides es tornen a diluir en una proporció 1:2 amb la solució de lisi, es carreguen als tubs i per tal de que la mostra no estigui en contacte directe amb el tampó electròlit superior s'afegeixen 30 µl de la solució d'overlay sobre cadascuna de les mostres.

Fem corre les mostres a 400 V durant 16 hores.

Les proteïnes bàsiques no queden ben enfocades en els gels IEF, ja que en general entren molt poc en aquest tipus de gels. Encara que s'utilitzin ampholits molt bàsics, l'extensió del gradient de pH bàsic és molt petita ja que en presència d'urea les regions bàsiques del gradient són inestables. A més a més les proteïnes bàsiques que entren al gels IEF formen normalment ratlles (no punts).

Per solucionar aquest problemes s'utilitzen els gels NEPGE en la primera dimensió.

**3.5.2.1.2.- NEPHGE (*nonequilibrium pH gradient electrophoresis*) electroforesi.**

S'utilitzen en l'estudi de proteïnes amb rang de pH entre 7 i 10.

Les principals diferències entre el NEPHGE i el IEF són que les mostres s'apliquen, en aquest cas, en l'extrem acídic del gel i el producte voltatge x temps és més petit que en els gels IEF. Sota aquestes condicions el gradient de pH no s'equilibra completament. Com a resultat, les proteïnes no s'electroenfoquen totalment en el seu pI, com en els gels IEF. De totes formes, la majoria de proteïnes en els gels NEPHGE es separen d'acord la seva diferent càrrega.

Els passos per realitzar un NEPHGE són essencialment els mateixos que per l'electroenfocament o IEF excepte en els següents aspectes:

- els amfolits utilitzats per preparar els gels de la primera dimensió són pH 7-10.
- els tampons electròlits es col.loquen al revés, el tampó superior (bàsic) es col.loca a la cubeta de la part inferior i el tampó inferior (àcid) es col.loca a la cubeta de la part superior. Els elèctrodes de la cubeta també es connecten al revés, l'ànode

(vermell) al càtode de la font d'alimentació (negre) i el càtode (negre) a l'ànode de la font d'alimentació (vermell).

- la primera dimensió es connecta 5 hores a 350 V.

### 3.5.2.- Segona dimensió.

Separades les proteïnes segons el seu punt isoelèctric, es separen en gels segons el pes molecular. Els gels que s'han utilitzat per separar les proteïnes segons el pes molecular han estat gels SDS-poliacrilamida descrits a l'apartat 3.4.1.

Acabada la primera dimensió, es treuen els gels dels tubs i es posen a incubar amb tampó d'equilibrat durant 30 min (1 h màxim). Els gels equilibrats es poden guardar a -80°C o seguir directament amb la segona dimensió. Si guardem els gels, els congelem amb neu carbònica/acetona abans de passar a -80°C.

La segona dimensió la realitzem en gels SDS-poliacrilamida que preparem tal com s'ha descrit en l'apartat 3.4.1. per gels de mida (12 cm x 16 cm x 1.6 mm). La diferència que presenten és que en el gel empaquetador no hi posem cap pinta ja que les mostres són, en aquest cas, gels cilíndrics (1ª dimensió). Els gels cilíndrics els fixem al gel empaquetador amb una solució d'agarosa (1% agarosa, 0.002% bromophenol blue en tampó d'equilibrat). El bromophenol blue d'aquesta solució ens servirà de front al corre el gel.

Es important no fixar el cilindre de la primera dimensió amb massa solució d'agarosa ja que un excés de SDS provinent d'aquesta solució provoca un comportament anormal de les proteïnes de baix pes molecular, apareixen spots difosos o dobles spots.

Durant els diferents passos del procés de gels bidimensionals es va perdent una certa quantitat de proteïna inicial. La principal pèrdua de proteïna es dona en la primera dimensió. En general, en els gels NEPHGE es perd entre un 70-75% de proteïna total de la barreja i en els IEF, entre un 25-30%. Aquesta pèrdua es deguda a les característiques d'aquests gels que no permeten la total entrada de proteïnes. Per aquesta raó es aconsellable la combinació dels dos mètodes IEF/NEPHGE en l'estudj de barreges de proteïnes.

### 3.5.3.- Mètodes directes de detecció de proteïnes

La detecció de proteïnes separades en gels unidimensional o bidimensional s'ha portat a terme utilitzant els mètodes següents:

#### 3.5.3.1.- Tinció amb Coomassie Blue

En la tinció dels gels amb Coomassie Blue s'han aplicat algunes variacions en el cas de gels unidimensionals o bidimensionals degut a la diferent composició dels mateixos i per millorar els resultats.

a) Tinció amb Coomassie Blue de gel unidimensionals:

Abans de la tinció en coomasie blue es recomana fixar les proteïnes amb un bany de àc. sulfosalicilic al 5% durant uns 20' seguit d'un altre, del mateix temps de durada, amb la solució destenyidora. Aquests passos són opcionals i s'obtenen els mateixos resultats utilitzant el següent mètode:

- Tinció durant 15' en una solució que conté:

0.25% Coomassie brilliant blue G-250  
45% Metanol  
45% H<sub>2</sub>O bidestil.lada  
10% Ac. acètic glacial.

- Passats el 15' s'extreu l'excés de colorant fent successius canvis amb la solució destenyidora:

5% Metanol  
7.5% Ac. acètic glacial  
87.5% H<sub>2</sub>O bidestil.lada

b) Tinció amb Coomassie Blue de gels bidimensionals (IEF/NEPHGE)

- Tinció durant 15 min en una solució que conté:

- 0.1% Coomassie brilliant blue G-250
- 25% Metanol
- 67.5% H<sub>2</sub>O bidestil.lada
- 7.5% Ac. àctic glacial.

- Passats els 15 min s'extreu l'excés de colorant fent successius canvis amb la solució destenyidora que està formada pels mateixos compostos i proporcions que la solució de tinció anterior excepte el compost Coomassie blue.

Una vegada destenyits els gels s'assequen entre paper de filtre i paper de celofà amb un assecador de gels Bio-Rad durant 30-60 minuts depenent del gruix i composició del gel.

La tinció amb Coomassie blue es pot combinar amb l'exposició fotogràfica, en el cas d'estudis de proteïnes marcades o fosforil.lades *in vitro* amb precursors radioactius.

### 3.5.3.2.- Tinció amb plata

La tinció amb plata ens detecta concentracions de proteïna fins 0.02 ng/mm en gels de 1 mm de gruix. Donada la gran sensibilitat del mètode s'han de tenir en compte les següents precaucions:

- Manipular el gel amb molta cura. No tocar mai el gel amb els dits.
- Els recipients d'incubació han d'estar molt nets i es recomanable que aquests siguin de vidre.
- Les incubacions amb les distintes solucions s'han de tractar amb agitació suau.

El procediment de tinció per min-gels (0.75mm x 8cm x 6cm) ha estat:

1- Pre-fixació del gel amb 40% metanol, 10% àcid acètic, en un volum de 200 ml durant 15 min x 2.

2- Fixació amb 10% etanol, 5% àcid acètic, en un volum de 200 ml, durant 7 min

x 2.

3- Incubació d'oxidació amb la solució oxidant:

2.5 gr  $K_2Cr_2O_7$   
 380  $\mu$ l  $H_3PO_4$  85%  
 250 ml  $H_2O$  mill Q  
 (es prepara 10 vegades concentrat i es guarda a 0°C)

La incubació es realitza amb 100 ml de la solució oxidant diluïda, durant 10 min.

4- Rentat amb aigua corrent durant 5 min.

5- Tinció amb la solució de plata:

5,1 gr  $AgNO_3$   
 250 ml  $H_2O$  milli Q  
 (es prepara 10 x conc. i es guarda a 0°C)

S'incuben 100 ml de la solució de plata durant 15 min.

6- Rentat amb  $H_2O$  durant 1 min.

7- Revelat amb la solució reveladora:

19.7 gr  $Na_2CO_3$   
 0.5 ml formalina 37%  
 1 l  $H_2O$  mill Q

Es realitza una primera incubació de 1-2 min i una segona fins que apareix la tinció. L'aparició de la tinció és progressiva i lenta, però quan apareix s'ha d'aturar ràpidament la reacció perquè incrementa molt de pressa.

8- S'atura la reacció amb 1% àcid acètic en  $H_2O$  milli Q.

Si els gels són grans (1.6mm x 18cm x 16cm) la durada i volum de les incubacions és el doble de la descrita pels passos del 1 al 5.

La tinció amb plata no es pot combinar amb l'exposició autoradiogràfica, ja que presenta un fenomen de pèrdua de senyal o *quenching*, donat per l'efecte de la plata residual en el gel.

### 3.5.3.3.- Fluorografia

Els gels de poliacrilamida en els que s'ha separat proteïnes marcades amb isòtops radioactius, aquestes es detecten exposant directament el gel, un cop sec, a plaques autoradiogràfiques.

Quan l'energia de radiació és baixa es pot incrementar mitjançant fluorografia. La fluorografia consisteix en la incorporació d'un compost de centelleig (normalment el PPO, 2,5-diphenyloxazole) que incrementa la producció de fotons a l'exposar-se a la radiació emesa pel isòtop (malgrat aquesta sigui baixa).

Els gels s'han tenyit amb coomassie blue abans de processar-se per fluorografia:

- Un cop destenyit el gel es renta amb H<sub>2</sub>O bidestil.lada i es submergeix en 100ml de DMSO (dimethyl sulphoxide), durant 30 min x 2.
- Incubació del gel en la solució PPO/DMSO (22.2 gr PPO en 100 ml DMSO) durant 2 hores.
- Es renta el gel en H<sub>2</sub>O bidestil.lada durant 30 min x 2.
- Es seca el gel i s'exposa a plaques autoradiogràfiques KODAK X-OMAT AR.

#### Revelat de plaques autoradiogràfiques:

- Es revela la placa autoradiografica en revelador AGFA G-150, durant 1-2 min (depenent del marcatge).
- S'atura el revelat amb el bany d'atur: àcid acètic al 5%, durant uns minuts
- Es fixa amb fixador AGFA G-350, durant 5 min.
- Es renta amb aigua corrent durant 20 min.





de saturar les unions inespecífiques que es podrien donar entre l'anticòs i altres antígens no específics.

6- Després del bloqueig es posa a incubar l'anticòs desitjat que reconeixerà l'antigen immobilitzat en filtre, diluït amb PBS durant 1 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. La dilució de l'anticòs i el temps d'incubació dependrà del títol de l'anticòs, variarem aquest paràmetres adaptant-los a les condicions més òptimes.

7- Rentem el filtre amb 2% de llet en pols/PBS tres vegades durant uns 10 min i realitzem una incubació de 1 h amb un segon anticòs que ens reconegui les IgGs de l'espècie on s'ha produït el primer anticòs específic.

Els segons anticossos utilitzats estan conjugats amb diferents compostos per tal d'ésser detectats posteriorment mitjançant reaccions colorimètriques o autoradiogràfiques, utilitzant els substrats adequats.

Els segons anticossos que s'han utilitzat han estat:

- a) IgGs de *swin anti-rabbit* o *anti-mouse* conjugats amb peroxidasa (dilució 1/500 amb PBS).
- b) IgGs de *goat anti-rabbit* o *anti-mouse* conjugats amb fofatasa alcalina ().
- c) proteïna A unida a I<sup>125</sup>. En aquest cas no es tracta pròpiament d'un segon anticòs, però s'usa degut a l'afinitat que presenta la proteïna A (de *Staphylococcus aureus*) per les distintes IgGs i d'espècies diferents.

La proteïna A s'ha marcat amb I<sup>125</sup> amb una activitat específica de 5-25 µCi/µg mitjançant Choramina T, seguint el mètode descrit per Markwell i Fox (1978) tal com es resumeix a continuació:

#### **Marcatge de proteïna A (46 KDa) amb Chloramina T:**

- Agafar 100 µg de prot. A en PBS.
- Afegir 0.5 mCi de NaI<sup>125</sup>
- Posar 5 µl Chlor-T (5ng/ml). Agitar suaument uns 20 segons.
- Parar la reacció amb 50 µl Na-metabisulfit (5mg/ml).
- Passar tot el cocktail per la columna G-25 medium gel-filtració.

### Preparació de la columna de gel filtració G-25:

- 3gr G-25 medium en 45 ml de tampó fosfat.
- Deixar inflar tota la nit a 4°C, 3 h a temperatura ambient o 1 h a 90°C.
- Muntar la columna equilibrant amb PBS.
- Passar 1% BSA en PBS aproximadament l'equivalent al volum buit, per bloquejar unions inespecífiques.
- Tornar a passar PBS i eluir amb aquest tampó.

8- Després d'incubar el segon anticòs durant 1h a temperatura ambient, retem amb PBS fent 3 canvis de 10 min.

9- Revelem el lloc d'unió de l'anticòs segons el compost amb que està conjugat:

- a) En el cas d'anticòs conjugats amb peroxidasa em utilitzat diferents substrats. Tots ells en revelen els llocs d'unió mitjançant una reacció colorimètrica, la diferència està amb la seva especificitat per la peroxidasa i amb la intensitat de reacció.

Els substrats utilitzats han estat:

- Diaminobenzidina (DAB). Es dissol amb aigua i s'ha utilitzat segons la següent solució de reacció: 500 µl DAB (2.5 mg/ml) + 50 ml PBS + 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El temps d'incubació del filtre de nitrocel·lulosa amb la solució de reacció és variable, depèn de l'afinitat, dilució i títol del primer anticòs en estudi. Per tant es deixa revelant fins que apareix el marcatge. La reacció s'atura amb PBS.

El DAB ha estat el substrat més utilitzat degut a que presenta gran afinitat per la peroxidasa i la reacció de fons (background) que s'obté és baixa.

- 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB). La solució de reacció està formada per: 30 ml tampó A + 10 ml tampó B + 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%.

\* Tampó A: 80 mg DOMS (diotilsulfosuccinat) + 20 mg TMB,

dissolts amb 10 ml d'etanol just abans d'utilitzar-se i en fosc.

- \* Tampó B: 24.3 ml citrat 91.4 mM + 27.7 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM pH 5.2 + 50 ml H<sub>2</sub>O.

Els tampons es preparen i es barregen just abans d'utilitzar-se. Igual que amb el DAB, el temps d'incubació és variable. La reacció s'atura amb aigua.

L'avantatge del TMB és que la reacció de fons és quasi nul·la, però la desavantatge és que la seva afinitat per la peroxidasa és més baixa. això fa que només s'utilitza en l'estudi d'anticossos molt específics i de gran afinitat per l'antigen.

- 4-chloro-1-naphthol. La solució de reacció és: 7.5 mg 4-chloro-1-naphthol dissolts en 2.5 ml metanol fred i a les fosques + 12.5 ml PBS + 12.5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El temps de reacció també és variable, l'avantatge del cloronaftol és que el temps d'incubació pot ésser molt llarg sense que apareixi-hi reacció de fons.

b) Els anticossos conjugats amb fosfatasa alcalina també els revelem mitjançant una reacció colorimètrica. La solució de reacció emprada ha estat:

- 66 µl NBT (nitroblue tetrazolium 50 mg/ml)  
33 µl BCIP (5-bromo,4-chloro-3 indonyl phosphate 50 mg/ml)  
en 10 ml de tampó AP.

- \* Tampó AP: 100 mM Tris HCl pH 9.5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

El procés de revelat amb aquest mètode és molt sensible i la intensitat del marcatge augmenta progressivament durant els temps de revelat. Per altra banda aquestes característiques poden ésser un inconvenient en l'estudi d'anticossos policlonals que donen algunes unions inespecífiques, ja que apareixen progressivament més intenses.

- c) Si s'utilitza prot A marcada amb  $^{125}$  detectem el marcatge de l'anticòs per autoradiografia.

Després dels últims rentats s'asseca el filtre de nitrocel.lulosa i s'exposa a una placa autoradiogràfica.

La unió de la proteïna A a les IgGs és més inespecífica que la utilització d'un segon anticòs. L'avantatge que confereix la utilització d'aquest mètode és que en el cas de que la senyal sigui molt baixa es pot deixar el filtre exposant-se un període de temps més llarg o al revés.

En els estudis de proteïnes per immunotransferència, fem córrer en les electroforesi de gels, paral.lelament a les mostres que ens interessin, marcadors de pes molecular. Aquests marcadors es transfereixen a filtres de nitrocel.lulosa en les mateixes condicions que les mostres fins el pas 4 del mètode descrit anteriorment. Després d'aquest pas el filtre de nitrocel.lulosa amb el marcador es tenyeix amb una solució d'Amido Black:

0.3% amido black

10% metanol

7% Ac. àcetic

i es destenyeix amb aigua bidestil.lada.

En el cas de marcadors de pes molecular pre-tenyits comercialment no es necessari aquest procés de tinció, ni separar el marcador de la resta de les mostres.

### **3.7.- IMMUNOPRECIPITACIÓ.**

### **3.8.- FOSFORIL.LACIÓ DE PROTEINES *IN VITRO*.**

S'ha utilitzat aquest mètode per detectar la fosforil.lació de proteïnes de la matriu nuclear *in vitro* mitjançant quinases, dependents de  $Ca^{++}$ -CaM, endògenes.

El mètode emprat està basat amb el descrit per J. MacManus i J.F. Whitfield en 1981.

Les mostres de matriu nuclear (100 µg) s'han pre-incubat durant 3 min a 37°C mab el medi d'incubació que conté:

50 mM Tris-HCl pH7.4  
1 mM dithiothreitol (DDT)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2 mM EGTA

en alguna de les mostres de matriu nuclear s'afegit al medi d'incubació, 5 mM CaCl<sub>2</sub> ó 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 2 µM Calmodulina ó 100 µM AMPc. En qualsevol dels casos el volum final ha d'ésser de 100 µl.

La reacció de fosforil.lació s'inicia a l'afegir 12 µM de ATP-P<sup>32</sup> (10 µl de 120 µM ATP-P<sup>32</sup>). Després de 7 min d'incubació a 37°C, la reacció s'atura afegint 1 ml TCA (tricloracètic) 8-10% en fred, durant 10 min.

Es centrifugen les mostres en una microfuga a 10 000 rpm durant 5 min, es renta el pellet amb 1 ml d'acetona freda i es torna a centrifugar durant 5 min. S'elimina el sobrenadant i la resta d'acetona s'evapora amb una suau corrent de N<sub>2</sub>.

El pellet es resuspèn amb H<sub>2</sub>O i es carrega a gels SDS-poliacrilamida o bidimensionals, prèviament preparats (apartat 3.5.1 i 2), per tal de detectar les proteïnes fosforil.lades. Els gels es tenyeixen amb coomassie blue, s'assequen i s'exposen a plaques autoradiogràfiques (apartat 3.5.3).

### 3.9.- MÈTODE DE IDENTIFICACIÓ DE RECEPTORS DE LA CALMODULINA (OVERLAY).

#### 3.9.1.- Marcatge de calmodulina amb I<sup>125</sup>.

Amb la finalitat d'identificar els receptors de la calmodulina mitjançant tècniques de *overlay*, purifiquem en primer lloc calmodulina segons el mètode descrit per-----  
-----.

La calmodulina purificada es marca amb I<sup>125</sup> utilitzant el mètode de marcatge descrit per Bolton and Hunter en 1973. Aquest mètode es basa en la transferència de I<sup>125</sup> conjugat amb un derivat ester de l'àcid propionic, altament reactiu en medi aquós, als grups amino de la proteïna.

El procediment seguit per marcar la calmodulina ha estat el següent:

- Abans del procés de iodació de la proteïna, s'evapora el solvent de l'ester marcat mitjançant una suau corrent de N<sub>2</sub>.
- A continuació, s'afegeixen 5 µl de proteïna diluïda en 10 µl de tampó 0.1 M Borat pH 8.5 al vial que conté el reactiu marcat una vegada evaporat el solvent. La barreja s'incuba durant 15 min a 00C.
- L'ester iodat s'hidrolitza ràpidament en medi aquós. La vida mitja d'aquest compost és de 9 min aproximadament en 0.1 M Borat ph 8.5. De 3 a 4 mols de l'ester marcat reaccionen per 1 mol de proteïna.
- La reacció s'atura afegint 500 µl de tampó:

0.2 M Glicina

0.1 M Borat pH 8.5

durant 5 min a 00C.

- La separació de la proteïna marcada amb I125 de la resta de productes de la reacció, conjugats de glicina i 3 (-4 hidrixifenil) propiònic, es realitza per cromatografia de gel filtració, utilitzant una resina Sephadex G-25 (gra fi). Per minimitzar la pèrdua de proteïna marcada, la columna de Sephadex G-25 s'equilibra i es bloqueja posteriorment amb:

0.05 M Tampó fosfat pH 7.5

0.25% (P/V) gelatina

abans de passar la barreja que conté la proteïna marcada que volem separar.

- La proteïna marcada es guarda congelada en alíquotes a -40°C.

### 3.9.2.- Identificació de receptors de la calmodulina.

La identificació dels receptors de la calmodulina s'ha realitzat d'acord amb el mètode descrit per O. Bachs i E. Carafoli (1987).

El procediment ha estat el següent:

1- Es prepara un gel de SDS-poliacrilamida i es fa una electroforesi de la mostra en la que es volen identificar els receptors de la calmodulina, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.4.1.

2- Un cop finalitzada l'electroforesi es realitza una tranferència del gel a filtre de nitrocel.lulosa tal com s'ha descrit en l'apartat 3.5. fins el pas 4.

3- El filtre de nitrocel.lulosa amb les proteïnes transferides es bloqueja amb 5% llet en pols/PBS, per tal de saturar totes les unions inespecífiques de la Calmodulina (CaM)-I<sup>125</sup> amb les proteïnes de la mostra.

4- Després de la saturació es renta el filtre amb PBS i a continuació s'afegeix la solució:

0.1% BSA/PBS

0.5 mM Ca<sup>++</sup>

CaM-I<sup>125</sup> (2x10<sup>6</sup> Ci per ml, aproximadament)

Com a control de la unió de la CaM-I<sup>125</sup> als seus receptors, s'incuba un altre filtre de nitrocel.lulosa amb les mateixes mostres i condicions amb la solució:

0.1% BSA/PBS

2 mM EGTA

CaM-I<sup>125</sup> (igual concentració que la solució de Ca<sup>++</sup>)

Aquestes solucions s'incuben durant 4 hores a temperatura ambient.

La unió de la CaM als seus receptors està modulada per Calci, per aquesta raó s'utilitza un quelant del calci, com l'EGTA, per obtenir un bon control de les unions específiques.

5- Es renten els filtres dues vegades amb PBS/0.5 mM Ca<sup>++</sup> o PBS/2 mM EGTA,

durant 10 min a temperatura ambient.

6- Per últim es fa un rentat amb PBS, sense  $\text{Ca}^{++}$  o EGTA, de 15 min.

7- Rentats el filtros, s'assequen i s'exposen a plaques autoradiogràfiques KODAK X-OMAT-AR.

### **3.10.- MÈTODE D'IDENTIFICACIÓ DE PROTEINES ACCEPTORES D'ADN.**

La identificació de proteïnes acceptores d'ADn s'ha realitzat segons es descriu a continuació:

#### Solucions

Solució PT: 50 mM NaCl  
2 mM Na-EDTA  
4 M Urea  
0.1 mM DTT (dithiothreitol)  
10 mM Tris-HCl pH 7.0

Solució T: 50 mM NaCl  
2 mM Na-EDTA  
0.1 mM DTT  
10 mM tris-HCl pH 7.0

Solució B: 1 mM Na-EDTA  
10 mM Tris-HCl pH 7.0  
0.02% BSA  
0.02% Ficoll  
0.02% PVP (polyvinylpyrrolidone)  
50 mM NaCl



### Procediment

- Es realitza un gel SDS-poliacrilamida amb les mostres en les quals volem identificar proteïnes receptores d'ADN, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.5.1.
- Incubació pre-transferència del gel amb el tampó PT durant 3 hores ( si els gels són mini-gels, el temps es redueix a la meitat).  
Aquesta incubació serveix per facilitar la renaturalització de les proteïnes.
- Transferenciá del gel a filtre de nitrocel.lulosa tal com s'ha descrit a l'apartat 3.6., utilitzant com a tampó de transferència el tampó T. La transferència es realitza durant tota la nit a 20 V i a 4°C.
- Bloqueig d'unions inespecífiques amb el tampó B o amb 2% llet en pols/PBS. Aquesta saturació es realitza durant 30 min a temperatura ambient.
- Incubació d'unió o *binding*.  
Per detectar la unió de l'ADN a les proteïnes acceptores s'ha emprat ADN de salmó marcat amb p<sup>32</sup>. La reacció d'unió té lloc incubant 10<sup>6</sup> cpm ADN-p<sup>32</sup> en tampó B, durant 1 hora a temperatura ambient.
- Rentats del filtre amb tampó B durant 10 min x 2 i un últim rentat amb PBS durant 10 min.
- Un cop rentat, s'asseca i s'exposa a una placa autoradiogràfica, que es revelarà passat el temps d'exposició adequat.

### **3.11.- ANÀLISI DE SEQÜENCIA D'AMINOÀCIDS**

Aquest mètode s'ha emprat per a obtenir seqüències parcials d'aminoàcids d'una proteïna purificada.

#### Procediment

- La proteïna purificada tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4.1. es separa en un gel

de 8% SDS-poliacrilamida i es transfereix a una membrana Immobilon (PVDF, 0.45 µm. Millipore).

- Es talla la banda del filtre que correspon a la proteïna purificada i es digereix amb bromur de cianògen (CNBr) com es descriu a continuació:

- la banda de filtre tallada es submergida en 70% àcid fòrmic amb un excés de unes 200 vegades de CNBr respecte a la proteïna (M/M).

- aquesta digestió té lloc sota una atmosfera de N<sub>2</sub> i a les fosques, durant 24 hores.

- s'agafa la solució de digestió i es concentra fins obtenir 50 µl mitjançant evaporació amb una suau corrent de N<sub>2</sub>.

- s'afegeix aigua fins 1 ml i es torna a concentrar evaporant amb una corrent de N<sub>2</sub>. Aquest pas es repeteix quatre vegades.

- Finalment la digestió es resuspèn en 0.1% trifluoracètic (TFA) en aigua, i s'injecta a la unitat HPLC, Applied Biosystems 130A. Es fa corre un gradient lineal entre 100% A (0.1% TFA en H<sub>2</sub>O) i 100% B (70% acetonitrile, 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O) en 50 min.

- Els pics de pèptids eluïts, detectats per absortivitat U.V. a 214 nm, es col.loquen directament en discos de fibra de vidre per a la seqüenciació.

- La seqüenciació s'ha realitzat en un aeqüenciador de proteïnes Applied Biosystems 470A i utilitzant una línia de detecció 120A PTH.

Tots els productes utilitzats per a la seqüenciació han estat de la casa Applied Biosystems.

### 3.12.- MAPATGE PEPTÍDIC EN GELS SDS-POLIACRILAMIDA

El mapa peptídic de les proteïnes purificades que s'han estudiat s'ha basat en el mètode descrit per Cleveland D.W. i al.(1977) amb algunes modificacions.

Aquest mètode permet comparar l'estructura primària de les proteïnes.

Consisteix en la digestió parcial d'una proteïna mitjançant un enzim proteolític, en

aquest cas la proteasa V8 (proteasa de *Staphylococcus aureus*, que talla específicament les unions entre pèptids per l'extrem carboxi terminal de l'àcid glutàmic), i l'anàlisi dels productes obtinguts en electroforesi de gels SDS-poliacrilamida.

S'ha emprat per discernir possibles diferències entre distintes proteïnes amb igual mobilitat electroforètica.

### Procediment

Es digereixen entre 15 i 20 µg de proteïna purificada amb 2 µl de proteasa V8 (1 mg/ml), en un bany a 37°C.

La reacció de digestió, s'ha aturat a diferents temps per obtenir distints mapes peptídics de les mateixes proteïnes. La reacció s'atura traient les mostres de 37°C i afegint tampó de mostres.

Les mostres digerides es carreguen directament a gels SDS-poliacrilamida i es fan córrer tal com s'ha descrit a l'apartat 3.5.1.

Com a control de reacció es carrega paral·lelament a les mostres, 2 µl de proteasa V8, tractada sota les mateixes condicions d'incubació que la resta de mostres. Amb aquest control obtindrem els pèptids provinents de la proteasa V8.

S'han realitzat dos tipus de detecció i anàlisi dels pèptids obtinguts:

- Tinció amb coomassie blue o plata dels gels després de l'electroforesi, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4.3.
- Immunotransferència dels gels a filtres de nitrocel·lulosa i utilització d'anticossos contra les proteïnes purificades estudiades en el mapatge peptídic, seguint el mètode de immunotransferència descrit en l'apartat 3.6.

amb el primer mètode comparem els pèptids obtinguts i amb el segon analitzem la semblança dels pèptids i la seva afinitat pels anticossos emprats.

### **3.13.- IMMUNOCITOQÍMICA PER MICROSCOPIA ÒPTICA.**

Els mètodes de localització de components cel·lulars emprats tant per microscopia òptica com electrònica, es basen en dos criteris bàsics:

- El material biològic ha d'ésser fixat per tal d'obtenir una bona preservació de la

ultraestructura i aconseguir la immobilització de les macromolècules.

- Després de la fixació, aquestes macromolècules han de poder ésser reconegudes i accessibles pel sistema de marcatge que s'empri.

### **3.13.1.- Immunocitoquímica de teixit hepàtic.**

Els mètodes utilitzats en els estudis immunocitoquímics de teixit hepàtic s'han classificat, inicialment, segons el processament de les mostres.

3.13.1.1.- Perfusió *in vivo* amb paraformaldehid i pre-inclusió amb parafina del teixit.

3.13.1.2.- Congelació del teixit i post-fixació.

L'elecció de la metodologia emprada pel processament de les mostres per a la detecció d'un antigen, està en funció de nombroses variables, com són:

- preservació de l'antigenicitat.
- penetració i accessibilitat de l'anticòs.
- quantitat d'antigen present en la mostra.
- grau de consistència tissular.
- tipus o modalitat d'anàlisi a realitzar.
- rapidesa en l'obtenció de resultats.

#### **3.13.1.1.- Perfusió *in vivo* amb paraformaldehid i pre-inclusió amb parafina.**

Amb la fixació per perfusió *in vivo* i la inclusió amb parafina obtenim una alta conservació de l'estructura del teixit. Per altra banda aquest mètode afecta l'antigenicitat de la mostra degut als passos de deshidratació i inclusió a altes temperatures (55-60°C).

El procés utilitzat ha estat el següent:

- Fixació per perfusió *in vivo* del fetge s'ha realitzat via vena porta segons el

mètode descrit per Wisse (1969), amb les modificacions descrites en la tesi de J. Serratosà. Com a fixador s'ha utilitzat 3% paraformaldehid dissolt amb PBS. El fixador el preparem abans d'ésser utilitzat, dissolent el paraformaldehid amb un volum petit d'aigua i escalfant per sota de 60°C. Un cop dissolt s'afegeix el volum adequat de PBS (10 vegades concentrat), s'acaba d'ajustar el volum amb aigua i el pH a 7.4 amb NaOH. Es convenient filtrar-lo i refredar-lo a 4°C abans d'ésser usat.

El fetge un cop fixat presenta una consistència dura i un color blanquinós.

- Després de perfundir a un flux constant de 7 ml/min i un volum de fixador de 300-400 ml, s'extrau el fetge i es talla en blocs de 0.5 cm<sup>3</sup>.

- Es deixen les mostres 4h més en el mateix fixador a 4°C i es renten amb PBS 30 min realitzant tres canvis.

- El trossos de fetge, una vegada fixats i rentats, es processen per la seva inclusió en parafina seguint aquests passos:

- \* alcohol etílic 70%, 1 hora.
- \* alcohol etílic 90%, 1 hora.
- \* alcohol etílic 100%, durant dues incubacions de 1 hora.
- \* tolué 100%, durant dues incubacions de 30 min.
- \* parafina (a 58°C) durant dues incubacions de 30 min.
- \* parafina (en estufa al buit a 58°C) durant dues incubacions de 45 min.

Les mostres s'han inclòs en parafina a temperatura ambient, per tal d'obtenir els blocs. Una vegada la parafina s'ha solidificat, es renten els blocs amb aigua freda per accelerar l'enduriment.

La incubació de les mostres en parafina en l'estufa al buit, és convenient realitzar-la ja que s'aconsegueix un grau de penetració de la parafina més elevat i evita la formació de bombolles d'aire entre les mostres i l'emulsió d'inclusió.

A partir del blocs de parafina obtinguts, s'han realitzat talls de gruix comprés entre 4 i 6 µm, mitjançant un microtom de tipus Minot de la casa Leitz. Els talls s'han muntat sobre portaobjectes, rentats prèviament amb 20% àcid nítric, aigua i finalment gelatinats amb la solució:

- 2.5 gr gelatina
- 0.5 gr sulfat de crom i potasi (*chrome alum*)
- 500 ml H<sub>2</sub>O destil.lada
- (deixar refredar i filtrar abans d'utilitzar)

La gelatinació es pot substituir per un recobriment dels portaobjectes amb 0.1% de poly(L-lysine).

Els talls histològics muntats sobre portaobjectes poden ésser guardats a 4°C o utilitzats directament per mètodes immunocitoquímics.

Els mètodes immunocitoquímics emprats han estat:

- 1- Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).
- 2- Immunoperoxidasa indirecta.

L'elecció dels mètodes de marcatge immunocitoquímic depèn de cadascun dels casos. Existeixen nombrosos factors a tenir en compte:

- la rapidesa amb la que es vol obtenir els resultats. Els mètodes directes o indirectes són més ràpids que els de pont (PAP).
- l'estabilitat del marcatge. Els mètodes immunoenzimàtics donen lloc a complexos estables, que no donen els fluorocroms , degut al seu temps d'excitació limitat.
- sensibilitat del mètode. Els indirectes són més sensibles que els directes, i la utilització de fluorocroms més que els enzimàtics.

### **1- Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).**

En aquest mètode el segon anticòs no està marcat, únicament serveix de pont per un tercer anticòs que porta el marcatge.

El segon anticòs és específic contra les immunoglobulines de l'espècie en la qual s'ha obtingut el primer anticòs. El tercer anticòs consisteix en el complex soluble PAP, obtingut en la mateixa espècie que l'anticòs primari. El complex PAP únicament s'unirà amb el fragment Fab lliure del segon anticòs.

El mètode PAP incrementa enormement la sensibilitat, donat que cada complex

presenta una mitja de 3 molècules de peroxidasa (6 molècules de peroxidasa per cada anticòs primari), i l'especificitat, ja que l'augment del nombre de passos fins la detecció del marcatge disminueix la probabilitat d'unions no específiques.

El procés seguit ha estat:

1- Desparafinació i rehidratació del teixit, tal com es descriu a continuació:

- \* xilè pur, durant 3-4 min.
- \* xilè pur, durant 3-4 min.
- \* 100% etanol, durant 10 min dues vegades.
- \* 90% etanol, durant 10 min.
- \* 70% etanol, durant 10 min.
- \* 30% etanol, durant 10 min.
- \* PBS, durant 10 min.

2- Bloqueig de la peroxidasa endògena, amb 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS, durant 30 min.

3- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

4- Bloqueig d'unions no específiques amb el tampó:

- 10 mM Tris-HCl
- 5 mM EDTA
- 0.25% gelatina
- 0.05% Tween-20
- 150 mM NaCl

durant 30 min.

5- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

6- Bloqueig amb sèrum normal de l'espècie en que s'ha produït el segon anticòs, per evitar la unió d'aquest amb el teixit.

S'ha utilitzat sèrum normal de porc (*swim*) *anti-rabbit* o *anti-mouse*, diluït 1/10 ó 1/20 en PBS i s'ha incubat 20min.

7- Incubació amb el primer anticòs diluït en PBS, durant tota la nit a 4°C.

8- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

9- Incubació amb el segon anticòs (pont) no marcat. S'ha utilitzat IgGs de *swim anti-rabbit* o *anti-mouse* diluït 1/100 en PBS, i s'ha incubat 1 hora a temperatura ambient.

10- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

11- Incubació amb el complex PAP. S'ha utilitzat PAP *anti-rabbit* o *anti-mouse* diluït 1/100 en PBS, durant 1 hora a temperatura ambient.

12- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

13- Revelat del marcatge amb DAB (diaminobenzidine):

500 µl DAB (2.5 mg/ml)

50 ml PBS

50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

controlant el temps de revelat, observant la reacció al microscopi.

14- Aturada de la reacció de revelat amb PBS, 10 min x 2.

15- Deshidratació i muntatge.

Aquest pas, es realitza en el cas d'utilitzar-se un medi de muntatge hiposoluble com la resina DPX. L'avantatge d'aquests tipus de medis és que són permanents.

La deshidratació s'ha realitzat seguint el procés invers que s'ha descrit en el pas 1 d'aquest mètode.

Un cop els talls deshidratats es munten amb DPX.

16- Observació al microscopi. L'observació pot ésser immediata, però la resolució del marcatge no és nítida fins passades 24 h de muntatge, temps necessari per a la completa polimerització del DPX.

Els microscopis òptics emprats han estat Leitz Diaplan i Zeiss Axioplan. En ambdós microscopis s'han realitzat fotografies de les preparacions.



## 2- Immunoperoxidasa indirecta.

Aquest mètode consisteix en aplicar un segon anticòs conjugat amb peroxidasa com a marcador.

El procés utilitzat ha estat exactament el mateix que el PAP, però substituint els passos 9,10 i 11 per un sol pas:

- Incubació amb el segon anticòs, IgGs de *swim anti rabbit o anti mouse* conjugades amb peroxidasa.

Aquest mètode és més ràpid que l'anterior però la sensibilitat del marcatge és menor.

### 3.13.1.2.- Congelació del teixit i post-fixació.

La congelació ràpida del teixit és el procediment que millor preserva l'antigenicitat de la mostra. Es un procés ràpid, però la conservació de l'estructura del teixit és menor que l'obtinguda amb la inclusió en resines.

Els processos immunocitoquímics emprats amb el mètode de congelació, han estat de post-fixació de les seccions i marcatges indirectes amb segons anticossos conjugats amb peroxidasa o fluorocroms. Els fluorocroms han estat fluoresceïna isotiocianat (FITC) o tetramil rodhamina isotiocianat (TRITC). L'espectre d'emissió i excitació del FITC presenta un màxim als 500 nm de longitud d'ona i d'ona una coloració verda. El TRITC presenta un màxim al voltant dels 600 nm i dona una coloració vermella.

L'avantatge dels mètodes fluorescents és la seva gran sensibilitat i poder de resolució en el microscopi òptic. No obstant, la immunofluorescència no és una tècnica quantitativa. Per tal propòsit és millor la utilització de peroxidasa.

El protocol que s'ha seguit ha estat:

1- Extracció del fetge, obtenció de seccions entre 0.5-1 cm<sup>3</sup> i congelació ràpida en nitrogen líquid o neu carbònica.

2- Obtenció de talls entre 4-5 µm, mitjançant un criostat Reichert-Jung (model 2700)

3- Els talls obtinguts es munten sobre portes gelatinats, tal com s'ha descrit an l'apartat 3.13.1.1.

4- Deixar els portaobjectes amb els talls a temperatura ambient durant 10 min, per assegurar l'adhesió.

5- Fixació. S'han realitzat diferents tipus de fixació:

- fixació amb 1-3% paraformaldehid en PBS, durant 30 min. a temperatura ambient.
- fixació amb metanol 100%, durant 3-4 min a -20°C.
- fixació acetona:metanol (1:1), durant 3-4 min a -20°C.
- NO fixació del teixit.

6- Rentats amb PBS, de 10 min x 3.

7\*- Bloqueig de la peroxidasa endògena amb 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS durant 30 min a temperatura ambient.

\* es realitza en el cas d'utilitzar un segon anticòs conjugat amb peroxidasa.

8\*- Bloqueig dels grups aldehid amb NaBH<sub>4</sub> (mg/ml) en PBS o, Gly 50 mM en PBS, o clorur amònic 50 mM en PBS, durant 30 min.

\* es realitza si s'utilitza paraformaldehid com a fixador i un segon anticòs marcat amb fluorocroms. Els grups aldehid presenten unions, en el nucli cel.lular, que poden donar fluorescència endògena.

9- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

10- Bloqueig d'unions no específiques donades pel segon anticòs, amb sèrum normal de l'espècie on s'ha produït el segon anticòs. Es dilueix 1/10 ó 1/20 en PBS i s'incuba durant 20 min. a temperatura ambient.

11- Incubació amb el primer anticòs diluït en PBS, durant 1 hora a temperatura ambient.

12- Rentats en PBS, de, 10 min x 3.

13- Incubació amb el segon anticòs. S'han utilitzat segons anticossos marcat amb peroxidasa o fluorocroms (FITC/TRITC):

- IgGs de *swim anti-rabbit o anti-mouse* conjugats amb peroxidasa, diluïts 1/50 ó 1/60 en PBS.
- IgGs de *goat o swim anti rabbit o anti-mouse* conjugats amb FITC o TRITC, diluïts 1/60 ó 1/100 en PBS.

La incubació s'ha fet de 1 hora a temperatura ambient.

14- Rentats en PBS, de 10 min x 3.

15- Revelat i muntatge.

Les mostres marcades amb peroxidasa s'han revelat amb DAB i s'han muntat, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.13.1.1., mètode 1. En el cas de les mostres marcades amb fluorocroms es passa directament al muntatge amb H<sub>2</sub>O:Glicerol (1:1) + 1 mg/ml de p-phenilendiamina. El compost p-phenilendiamina allarga el temps d'excitació i ajuda a mantenir la fluorescència del marcatge.

16- Observació al microscopi òptic Leitz Diaplan o Zeiss Axioplan i realització de fotografies.

### **3.13.2.- Immunocitoquímica de nuclis aïllats.**

Pels estudis immunocitoquímics de nuclis aïllats es parteix de nuclis purificats, d'hepatòcis de rates normals o 24 regenerants post-hepatectomia parcial, segons el mètode descrit a l'apartat 3.2.1.1.

A partir dels nuclis aïllats s'ha procedit tal com s'indica a continuació:

- S'ha agafat una gota de suspensió nuclear i s'ha extés amb molta cura sobre un portaobjectes i s'ha deixat assecar a temperatura ambient durant uns minuts.

Es marca un cercle amb una punta de diamant per tal de definir la superfície de nuclis en la qual es realitzaran les incubacions.

- Fixació amb acetona a -20°C durant 3-4 min.

- Rentats amb PBS durant 10 min x 2.

A partir d'aquest punt fins al final, el procés ha estat el mateix que s'ha descrit a l'apartat 3.13.1.1. (a partir del pas 5).

### **3.12.3.- Immunocitoquímica de cèl.lules en cultiu.**

Pels estudis immunocitoquímics de cèl.lules en cultiu el procés ha estat bàsicament el mateix (fixació, bloqueig, marcatges immunocitoquímics...) que amb el teixit hepàtic. La diferència ha estat en el processament inicial de la mostra.

Els mètodes de marcatge immunocitoquímics han estat indirectes.

El protocol utilitzat consta dels següents passos:

1- Es posen a créixer cèl.lules sincronitzades o no sobre cubres de vidre o plaques de petri de 35 mm.

2- Les cèl.lules adherides al cubre senceres o després de purificar nuclis o matriu nuclear, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.2.2.2., es renten amb PBS, durant 2-3 minuts.

3- El següent pas és la fixació. S'han emprat diferents fixadors:

- 4% paraformaldehid diluït en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient o,

- Metanol 100% a -20°C durant 3-4 minuts o,

- Acetona/Metanol (1:1) a -20°C durant 3-4 minuts.

4- Fixades les cèl.lules es renten amb PBS durant 5 minuts x 3.

5- Permeabilització de les membranes cel.lulars. Aquest pas és requerit sempre que es fixi amb paraformaldehid. No és necessari si la fixació es realitza amb metanol, ja que aquest permeabilitza a la vegada que fixa, però és convenient, si es fan estudis d'immunolocalització d'antígens nuclears. En aquest cas la utilització de metanol no és suficient per permeabilitzar la membrana nuclear.

La permeabilització la fem amb 0.5 % Triton x-100 diluït en PBS, durant 5 minuts.

6- Rentem amb PBS fent 3 canvis de 5 minuts.

7<sup>o</sup>- Bloqueig de la peroxidasa endògena.

Incubem durant 30 minuts amb 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 ml PBS.

\* Aquest pas es realitza en el cas d'utilitzar el segon anticòs conjugat amb peroxidasa.

8<sup>o</sup>- Bloqueig dels grups aldehyd amb NaBH<sub>4</sub> (1 mg/ml) diluït en PBS, o Gly 50 mM o clorur amònic 50 mM, durant 10 minuts.

\* Es realitza aquest pas en el cas de fixar amb paraformaldehyd i utilitzar posteriorment un segon anticòs conjugat amb un fluorocrom. Els grups aldehyds poden donar fluorescència endògena.

9- Rentats amb PBS, de 5 minuts x 3.

10- Incubació amb el primer anticòs.

Abans de la incubació amb el primer anticòs podem bloquejar les cèl.lules, per evitar unions no específiques que ens donarien *background* o marcatge de fons amb: 0.1 % BSA/PBS ó 2% llet en pols/PBS ó 0.5% BSA/0.2% gelatina/PBS.

Si el títol de l'anticòs és molt alt i l'afinitat per l'antigen molt específica, el bloqueig de les unions no específiques no és crític.

Incubem el primer anticòs a la dilució adequada amb PBS, durant 1 hora a temperatura ambient.

11- Rentats amb PBS, de 5 min x 3.

12- Incubació amb el segon anticòs.

S'han utilitzat dos tipus de segons anticòs: conjugats amb peroxidasa i conjugats amb fluorocroms (FITC/TRITC).

Tant en el cas dels anticòs conjugats amb peroxidasa com conjugats amb fluorocrom, s'han diluït 1/60 ó 1/100 amb PBS i s'han incubat durant 1 hora a temperatura ambient.

13- Rentats amb PBS, de 5 min x 3.

14- Muntatge.

Les mostres marcades amb peroxidasa s'han muntat amb H<sub>2</sub>O:Glicerol (1:9). Les

mostres marcades amb fluorescència s'han muntat amb el mateix medi anterior però afegint 1 mg/ml de p-phenilendiamine.

#### 15- Observació al microscopi òptic i realització de fotografies.

Algunes de les preparacions en les que s'han utilitzat fluorocroms també s'han analitzat amb el microscopi confocal, CSLM (*confocal scanning laser microscope*). El microscopi confocal analitza el marcatge de la preparació en successius plans de 0.5-1  $\mu\text{m}$  de gruix. Donant finalment, una reconstrucció tridimensional del marcatge analitzat. Aquests tipus d'anàlisi ens permeten discernir la localització exacta d'alguns antigens però amb una resolució baixa. Un exemple és el cas d'estudis de marcatges nuclears en cèl.lules de cultiu, on a vegades no queda clar si es tracta de marcatges externs a la membrana nuclear o interns. Aquest mètode permet resoldre-ho.

L'observació amb el CSLM i l'anàlisi en 3-dimensions s'ha fet segons el mètode descrit per Oud i al. (1989).

En cèl.lules de cultiu també s'han utilitzat tècniques immunocitoquímiques de doble marcatge, que consisteixen en:

- Utilitzar 2 primers anticossos produïts en espècies distintes (en el nostre cas, un ha estat policlonal i l'altre monoclonal).

La incubació amb els dos anticossos pot ésser simultània o consecutiva, depèn de la tendència entre els dos anticossos a donar reacció creuada entre ells.

- Després dels rentats amb PBS, s'utilitzen 2 segons anticossos cadascun dels quals reconeixerà una sola de les espècies dels anticossos primaris emprats. Aquests segons anticossos estan conjugats amb distins marcadors, normalment un amb FITC i l'altre amb TRITC. La incubació amb els segons anticossos sol ésser simultània, durant 1 hora a temperatura ambient.

### 3.14.- IMMUNOCITOQUÍMICA PER MICROSCOPIA ELECTRÒNICA.

#### 3.14.1.- Immocitoquímica de teixit hepàtic.

S'han utilitzat dos mètodes per l'estudi estructural de localització d'antígens:

3.14.1.1.- Post-inclusió en Lowicryl-4KM.

3.14.1.2.- Crioultramicrotomia.

En ambdós mètodes el marcador immunocitoquímic ha estat l'or col.loïdal (marcador metàl·lic electrodens), conjugat a prot. A o anticossos secundaris. La mida de les partícules d'or col.loïdal és variable, normalment s'utilitzen mides entre 1-10 nm. S'ha de tenir en compte que la densitat del marcatge incrementa quan la mida de les partícules decreix.

#### 3.14.1.1.- Post-inclusió en Lowicryl-4KM.

El Lowicryl és el medi comercial d'inclusió acrílica que consisteix en, metacrilats hidrofílics i hidroxietils creuats per un glicol alifàtic dimetacrilat. Aquesta resina plàstica té un grau de mobilitat que permet que el procés d'infiltració es realitzi a baixes temperatures (-20°C). La polimerització es dona per exposició de la resina a llum ultraviolada i a -20°C. No obstant, també és possible la polimerització a +60°C (com en el cas d'altres resines convencionals), encara que no és recomanable per la detecció immunocitoquímica, degut a l'efecte que les altes temperatures poden tenir sobre l'antigenicitat.

El mètode de post-inclusió en Lowicryl de les mostres hepàtiques s'ha realitzat segons el mètode descrit per J. Roth i al (1981), seguint els següents passos:

- Fixació per perfusió *in vivo* tal com s'ha descrit a l'apartat 3.11.1.1., però utilitzant com a fixador: 3% paraformaldehid + 0.1% gluteraldehid en 0.05 M PBS.
- S'extrau el fetge un cop fixat i es fan seccions de mida compresa entre 0.5-1 mm<sup>3</sup>.
- Es renten les mostres en PBS fent 3 canvis de 15 minuts i s'incuben en NH<sub>4</sub>Cl 50

mM en PBS, durant 20 minuts x 3.

- Es torna a rentar amb PBS, 2 canvis de 10 min. a 4°C.

- Deshidratació de les mostres seguint el passos següents:

- \* alcohol 30%, durant 30 min a 0°C.
- \* alcohol 50%, durant 1 hora a -20°C.
- \* alcohol 70%, durant 1 hora a -20°C.
- \* alcohol 95%, durant 1 hora a -20°C.
- \* alcohol 100%, durant 1 hora x 2 a -20°C.

- Inclusió en Lowicryl-4KM.

El procés d'inclusió és un procés d'infiltració progressiu. La resina de inclusió consisteix en tres components: el crosslinker, el monomer i l'iniciador.

A partir d'aquests components es prepara la barreja següent:

4 gr crosslinker A  
26 gr Monomer B  
o.15 gr Iniciador C

En la preparació de la barreja cal tenir les següents precaucions:

- S'han d'emprar guants, doncs el Lowicryl pot provocar èczema.
- Evitar inhalar els vapors. Preparar la barreja sota una campana extractora.
- S'ha de pesar el crosslinker i el monomer i agitar-los amb nitrogen gasós. El nitrogen barreja la resina i preveu la incorporació d'oxigen, el qual inhibeix la polimerització.
- Pesar l'iniciador i repetir l'operació anterior fins que els components estàn completament dissolts.

El procés de infiltració és un procés progressiu que s'ha realitzat segons la següent pauta de incubació:

- \* Lowicryl (barreja)/ alcohol 100% (1:1), durant 1 hora a -20°C.
- \* Lowicryl / alcohol 100% (3:1), durant 1 hora a -20°C.
- \* Lowicryl 100%, durant 1 hora a -20°C.



- \* Lowicryl 100%, durant tota una nit a -20°C.
- \* Lowicryl 100% (acabat de preparar), durant 5-7 hores a -20°C.

- Polimerització del Lowicryl.

Es transfereixen les mostres a càpsules de gelatina amb resina pre-refredada a -20°C. Les càpsules han d'omplir-se al màxim per evitar l'efecte inhibidor de l'oxigen.

Es tanquen les càpsules i es deixen 30 min a -20°C per tal d'equilibrar la temperatura. Passats els 30 min, s'exposen les càpsules a llum U.V. (360 nm), durant 24 h a -20°C.

Després de l'exposició de llum U.V., es treuen a temperatura ambient i es deixen 2-3 dies per finalitzar la polimerització.

- Obtenció de seccions ultrafines de les mostres.

A partir dels blocs o càpsules de Lowicryl, s'han realitzat seccions ultrafines de gruix de 60 nm, utilitzant un ultramicrotom Reichert ultracut. El gruix de les seccions es mesura pel color d'interferència del tall. Els talls que s'han utilitzat presentaven un color daurat o argentat.

La microtomia dels blocs de Lowicryl no presenta gaires particularitats respecte a la microtomia d'altres resines llevat que, en ser altament hidrofílica, s'ha d'evitar que la piràmide es mulli amb l'aigua del receptacle de la ganiveta. Això pot aconseguir-se mantenint el nivell d'aigua del receptacle una mica per sota del normal.

Per poder realitzar els talls s'han utilitzat ganivetes de vidre confeccionades amb una màquina (LKB) dissenyada per tal propòsit.

Els talls obtinguts s'han muntat en reixetes de níquel de 200 mesh, prèviament recobertes amb una pel·lícula de FORMVAR i carbó vaporitzat mitjançant un evaporador HITACHI, HUS-46B.

Una vegada muntats en les reixetes, els talls s'han processat per immunocitoquímica seguint els passos següents:

1- Bloqueig per evitar les unions no específiques amb 1% ovoalbumina en TBS durant 15min. TBS:10 mM Tris-HCL pH 7.6, 0.9% NaCL.

Les incubacions s'han realitzat, col·locant la reixeta en la que s'han muntat els talls invertida sobre una gota de la solució emprada en cadascun dels passos.

2- Incubació amb el primer anticòs. L'anticòs s'ha diluït en PBS, i s'han incubat durant tota la nit a 4°C. La dilució de l'anticòs dependrà de l'anticòs que s'estudia, igual que en els mètodes emprats per microscopia òptica. Però, per un mateix anticòs la dilució emprada per ME sol ésser, en general, més alta que per MO.

3- Rentats sobre gotes de TBS, 2 vegades i un rentat continu efectuat amb una xeringa de 20 ml de TBS, sostenint la reixeta amb unes pinces.

4- Incubació amb prot A conjugada amb partícules d'or col·loïdal de 10 nm. S'ha diluït l'anticòs 1/100 en TBS, durant 2 hores a temperatura ambient.

5- Rentats successius sobre gotes de les solucions següents:

- TBS + 0.01% Tween-20, 3 vegades.
- TBS, 3 vegades.
- Aigua destil·lada, 3 vegades.

6- Un cop rentades les reixetes s'assequen sobre paper de filtre durant 30 min.

7- Contrastat de les seccions amb citrat de plom segons Reynolds (1963).

Les solucions utilitzades són:

\* Acetat d'Uranil: solució acetat d'uranil saturada en 75% etanol. Es filtra abans d'utilitzar-se. Es prepara fresca cada vegada.

\* Reynolds citrat de plom: 1.33 gr citrat de plom  $[Pb(NO_3)_2]$   
1.76 gr citrat sòdic  $[Na_3(C_6H_5O_7)2H_2O]$   
es dissolen els compostos en 30 ml d'aigua destil·lada bullida i s'agita durant 1 min. Es deixa reposar durant 30 min. El precipitat que es forma s'elimina afegint 8 ml de NaOH (lliure de carbonats). S'ajusta la solució fins 50 ml amb aigua destil·lada. Aquesta solució es pot guardar a 4°C en un flascó negre.

El procés de contrastat ha estat el següent:

- Incubació amb la solució d'acetat d'uranil durant 1 hora a les fosques i

temperatura ambient.

- Rentat de les reixetes amb aigua destil.lada.
- Assecat sobre paper de filtre.
- Incubació amb la solució Reynolds de citrat de plom, durant 5-10 min. Aquesta incubació es realitza dins d'una càpsula de petri, que conté en la seva base paper de filtre humit amb 0.02 M NaOH, sobre d'aquest parafilm o una placa de cera on es posaran les gotes de la solució i les reixetes.
- Rentar amb aigua destil.lada i assecar sobre paper de filtre.

#### 8- Observació al microscopi electrònic.

les reixetes amb els talls secs s'han observat al microscopi electrònic de transmissió PHILIPS EM-301, a partir del qual s'han realitzat les plaques fotogràfiques.

#### 3.1.1.2.- Crioultramicrotomia.

La deshidratació i la inclusió en resines presenta, en molts casos, una reducció de l'antigenicitat i disminueix l'accessibilitat dels antígens pels marcadors.

Les tècniques de immunocrioultramicrotomia es presenten com una alternativa a aquests problemes. No es deshidrata la mostra durant tot el procés i no presenta medi d'inclusió, quedant els antígens accessibles pels marcadors per les tres dimensions.

La immnocytoquímica en crioultramicrotomia s'ha realitzat seguint el mètode descrit per P.M.P. Van Bergen en Henegouwen (1989).

Per l'obtenció i processament de les mostres per ultramicrotomia s'han seguit els següents passos:

- Fixació per perfusió *in vivo*, amb el fixador 3% paraformaldehid + 0.5% gluteraldehid en PBS. Tal com s'ha descrit en l'apartat 3.11.1.
- Extracció del fetge i obtenció de seccions de teixit de mida compresa entre 1-2 mm<sup>3</sup>.
- Rentats amb PBS, de 10 min x 3.

- Inclusió en 5% gelatina en PBS, a 37°C durant 30 min. Aquesta inclusió es realitza escampant els trossos de teixit, separats uns dels altres, en una placa de petri amb un volum de solució d'inclusió que cobreixi totalment les mostres.

La inclusió en gelatina millora el seccionament de les mostres, l'adhesió de les seccions a les reixetes, funciona com a suport mecànic i ajuda a la preservació ultraestructural del teixit.

- Solidificació de la gelatina, refredant la placa de petri sobre gel.

- Retallat de les peces de teixit de la gelatina.

- Fixació amb el mateix fixador inicial.

- Rentat amb PBS, de 15 min x 3.

- Incubació amb Sacarosa 1M en PBS, a 4°C durant 1 hora o fins que les peces de teixit no surin.

- Incubació amb 1.15 M Sacarosa + 10% PVP (polyvinylpyrrolidone) en PBS, durant tota una nit (temps mínim) a 4°C.

El PVP, facilitarà l'extensió dels talls durant el procés de descongelació d'aquests.

- Congelació ràpida de les peces de teixit en nitrogen líquid.

Les peces de teixit es congelen col.locades directament sobre el suport metàl·lic de mostres del ultracriotom.

Les incubacions realitzades des de la fixació del teixit fins la congelació ens serveixen per preservar el teixit de la formació de cristalls en el procés de congelació.

- Obtenció de seccions ultrafines.

A partir de les mostres congelades es realitzen seccions ultrafines de mida compresa entre 60-70 nm, utilitzant un ultramicrotom Reichert ultracut. En aquest cas, el color que ens indica el gruix apropiat de les seccions és entre daurat i un blau-verdós.

L'ultramicrotom presenta un gradient de temperatura que va des de -150°C dels dipòsits de nitrogen líquid, fins a -50°C de la mostra.

Les seccions no s'agafen amb les reixetes com en el cas dels ultramicrotoms normals, ja que no s'utilitza càpsula d'aigua per dipositar les seccions tallades. Les seccions es dipositen sobre la part posterior de la ganiveta i s'agafen amb gotes de Sacarosa 2.3 M que es col.loquen sobre les reixetes.

Les ganivetes utilitzades són també de vidre i confeccionades en el mateix aparell que s'ha descrit a l'apartat a). L'única diferència és que no formen un angle de 90°o sinó de 93°.

Els talls sobre les reixetes es processen per immunocitoquímica seguint el següent protocol:

1- Rentat de les reixetes amb PBS, durant 10 min x 3.

Tots el passos s'han realitzat posant les reixetes invertides sobre gotes de la solució emprada en cadascun dels casos.

2- Bloqueig dels grups aldehyd amb 50 mM glicina/PBS ó 50 mM lisina/PBS ó 50 mM clorur amònic ó 1mg/ml NaBCl<sub>4</sub>, durant 20 min a temperatura ambient.

3- Rentats en PBS, de 5 min x 3.

4- Bloqueig d'unions no específiques amb PBG:

0.5% BSA  
0.2% gelatina  
en PBS

durant 20 min a temperatura ambient.

5- Incubació amb el primer anticòs diluït amb PBG, durant 2 hores a temperatura ambient.

6- Rentats amb PBG, de 5 min x 3.

7- Incubació amb el segon anticòs, IgGs de *goat anti-rabbit o anti-mouse*, conjugat amb partícules d'or col.loidal de 1 nm, durant 2 hores a temperatura ambient.

Amb la utilització de partícules d'or de 1nm s'augmenta la penetració del marcador

en el teixit i per tant s'incrementa el marcatge.

8- Rentats en PBG, de 5 min x 3, i un últim rentat amb PBS durant 5 min.

9- Fixació de la unió dels anticossos, amb 1% gluteraldehid en PBS durant 30 min.

10- Rentats en PBS, de 5 min x 3, i 3 rentats més de 5 min amb H<sub>2</sub>O milli Q.

11- Amplificació amb plata amb la solució amplificadora, formada per la barreja dels següent components:

a) 6ml 33% goma aràbica en H<sub>2</sub>O milli Q.

b) 1 ml tampó citrat (2.55 gr àc. cítric, 2.35 gr citrat sòdic·2H<sub>2</sub>O, en 10 ml H<sub>2</sub>O milli Q).

c) 1.5 ml hydroquinone (85 mg hydroquinone en 1,5 ml H<sub>2</sub>O milli Q).

d) 1.5 ml lactat de plata (11 mg lactat de plata en 1.5 ml H<sub>2</sub>O milli Q).

aquests quatre components es barregen successivament en l'ordre que s'han descrit.

Les preparacions es recobreixen amb la solució amplificadora i es col.loquen immediatament a les fosques en un bany a 26°C, durant 20-25 min.

12- Rentats amb aigua milli Q, de 5 min x 6.

Aquests rentats són importants, per tal de reduir al màxim la presència de ions de les seccions, ja que l'acetat d'uranil precipita quan la força iònica és molt alta.

13- Reacció de substitució i contrast amb la solució:

1.1% Tylose MH300 (metil cel.lulosa)

0.4% Acetat d'uranil (acídic)

La reacció es realitza durant 10 min a 4°C. Acabada la reacció, es treu la solució en excés de la reixeta posant-la verticalment sobre paper de filtre, de forma que quedi només una fina pel.lícula.

La metil cel.lulosa substitueix l'aigua del teixit per l'observació al ME.

14- Deixar les reixetes uns minuts a temperatura ambient i observació al ME.

### 3.14.2.- Immunocitoquímica de cèl.lules en cultiu.

El mètode immunocitoquímic emprat en cèl.lules de cultiu ha estat el mateix que l'emprat en teixit hepàtic, immunocitoquímica indirecta amb marcadors conjugats amb or col·loïdal. Les tècniques que es descriuen es basen en els diferents tractaments i processaments de les mostres:

- Crioultramicrotomia.
- Pre-inclusió de cèl.lules subfraccionades *in situ*.

#### 3.14.2.1.- Crioultramicrotomia.

S'ha desenvolupat aquesta tècnica seguint els següents passos:

- Es posen a creixer cèl.lules sincronitzades o no, en flascons de cultiu tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1.3. i 3.1.4.
- Es treu el medi de cultiu i es renten les cèl.lules en PBS.
- Fixació amb 0.25% gluteraldehid, 3% paraformaldehid en PBS, durant 30 min a temperatura ambient.
- Rentats en PBS, de 5 min x 3.
- Bloqueig dels grups aldehid amb 50 mM Glicina en PBS, durant 10 min x 2.
- Es desprenen les cèl.lules del flascó de cultiu, afegint 40 ml de PBS (per flascons de 250 ml de capacitat) i raspant les cèl.lules, amb molta cura, amb una espàtula de rascat (*scrape cells*).
- Homogenització de les cèl.lules per desfer o evitar la formació d'agregats, mitjançant una pipeta pasteur.
- Centrifugació a 600 g, durant 5-10 min, en tubs cònics de 50 ml.

- Resuspensió de les cèl.lules amb un volum petit (no gaire més gran que el volum que ocupa el pellet) de 5% gelatina en PBS a 37°C. S'incuben durant 10 min a 37°C.
  - Centrifugació a 37°C durant 1 min a 100 g.
  - Es treu el sobrenadant i es solidifica el pellet en gel.
  - Fixació del pellet a temperatura ambient amb el mateix fixador inicial, durant 15 min.
  - S'extreu el pellet del tub cònic i es talla a trossos entre 1-2 mm<sup>3</sup>.
  - Incubació en 1 M sacarosa en PBS a 4°C, fins que el trossos no surin.
  - Incubació en 1.5 M sacarosa, 10% PVP en PBS, durant tota la nit a 4°C (temps mínim).
  - Congelació i obtenció de talls ultrafins.
- A partir d'aquest punt els passos han estat els mateixos que els descrits en l'apartat 3.14.1.2.

### **3.14.2.2.- Pre-inclusió de cèl.lules subfraccionades *insitu*.**

Aquest mètode s'ha desenvolupat per l'estudi ultraestructural d'antígens en subfraccions cel.lulars, nuclis i matriu nuclear, obtingudes sense despendre les cèl.lules de la superfície de creixement.

La tècnica utilitzada s'ha realitzat seguint els següent passos:

- Es parteix de cèl.lules en cultiu adherides a portes especials de polièster (aguanten deshidratacions, i inclusions a altes temperatures), en les que es realitzen les extraccions o subfraccionaments descrits en l'apartat 3.2.2.2. per tal d'obtenir nuclis i matriu nuclear.
- Fixació dels nuclis i/o matriu nuclear amb 0.25% gluteraldehid en PBS, durant 10 min.



- Es renten els portes amb PBS durant 10 min x 3.
- Bloqueig dels grups aldehid amb NaBH<sub>4</sub> (mg/ml) en PBS durant 10 min.
- Rentats en PBG, de 5 min x 3.
- Incubació amb el primer anticòs diluït en PBG, durant 2 hores a temperatura ambient.
- Rentats amb PBG, de 5 min x 3.
- Incubació amb el segon anticòs, *goat anti-mouse o anti-rabbit*, conjugat amb or col.loïdal de 1 ó 5 nm. Diluït 1/100 en PBG i incubat durant 2 hores a temperatura ambient.
- Rentats amb PBG, de 5min x 3, i 3 rentats més amb PBS de 5 min.
- Post-fixació amb 1% gluteraldehid en PBS, de 10-20 min.
- Rentats en PBS, de 5 min x 3 i 6 rentats més de 5 min amb H<sub>2</sub>O milli Q.
- Amplificació amb plata, tal com s'ha descrit en el pas 9 de l'apartat 3.14.1.2.
- Deshidratació en 70% etanol durant 10 min.
- Pre-contrastat amb 1% acetat d'uranil en 70% etanol durant 30 min.
- Inclusió.

La tècnica d'inclusió utilitzada ha estat la descrita per la resina Epoxi araldita (Durcupan ACM Fluka) segons el mètode de J.M Polak i al. 1985.

Els portes de poliester abans de la inclusió, s'han tallat de forma exacta als motllos de inclusió.

- Obtenció de talls.
- Contrastat amb acetat d'uranil i citrat de plom (descrit a pas 7 de l'apartat 3.14.1.1.).
- Observació al microscopi.

### 3.15.- AUTORADIGRAFIA CEL.LULAR.

Aquest mètode ens permet identificar les cèl.lules que estan en fase de síntesi de ADN. Ens ha servit per correlacionar estudis de localització d'antígens específics (immunohistoquímica) amb la síntesi d'ADN (autoradiografia).

#### 3.15.1.-Incorporació del precursor radioactiu.

Per poder mesurar la radioactivitat específica del ADN, s'ha subministrat als animals una injecció de timidina tritiada per via intraperitoneal a raó de 0.5 Ci (activitat específica de 5 Ci/mM; Amersham) per gram de pes corporal.

Les rates han estat injectades 1 hora abans d'ésser sacrificades. Passada l'hora de incorporació, s'ha processat el fetge tal com s'ha descrit en l'apartat 3.13.1.1. fins el pas de muntatge dels talls. Es a dir, s'han processat les seccions per mètodes immunohistòquímics i abans del muntatge per la visualització al microscopi s'ha realitzat el procés autoradiogràfic.

### **3.15.2.- Procés autoradigràfic.**

Per realitzar l'autoradiografia del talls obtinguts s'ha seguit el mètode descrit per Baserga i Malamud (1969).

#### **3.15.2.1.- Emulsionat dels talls.**

Els tall han estat submergits en un bany d'emulsió líquida per autoradiografia (KODAK NTB-3) i s'han deixat assecar de forma que quedi una fina pel·lícula d'emulsió.

El procés d'emulsionat es realitza en una cambra fosca seguint els següents passos:

- Lliquació de la quantitat d'emulsió nuclear requerida, col.locant-la en un recipient al bany maria a una temperatura constant entre 40 i 45°C, durant aproximadament 15 min.
- Agitació de l'emulsió amb una vareta de plàstic amb molta cura, per tal de no deteriorar els cristalls de plata que la formen.
- Quan l'emulsió adquireix el grau de fluïdesa òptim, es submergeixen els portaobjectes que contenen les seccions de teixit.
- Els portaobjectes emulsionats es deixen assecar completament (de 20 a 30 min) a temperatura ambient, col.locant-los en un suport adequat de forma que quedin en posició vertical.
- Un cop secs s'han guardat en caixes opaques en les que s'ha col.locat un agent dessecant (CaSO<sub>4</sub>). Les caixes segellades per preservar l'emulsió de la llum, es guarden a 4°C durant els temps d'exposició, fins el moment del revelat.

### 3.15.2.2.- Revelat i fixat.

Passat el temps d'exposició, s'ha procedit al revelat dels autoradiogrames dins de la cambra fosca amb un filtre de llum vermella, seguint els següents passos:

- Revelat de les seccions emulsionades durant 5 min en revelador KodaK D-19 a 20°C.
  - Rentat amb aigua destil.lada.
  - Fixació durant 8 min amb el fixador Kodak F-5 diluït 1:1 en aigua.
  - Rentat amb aigua destil.lada, dues vegades de 5 min.
- Arribat a aquest punt, les preparacions es continuaran processant segons el procés de muntatge descrit en l'apartat 3.13.1.1.

### 3.16.-REVELAT DE NEGATIUS I REALITZACIÓ DE FOTOGRAFIES.

Tant els negatius obtinguts a partir del microscopi òptic com electrònic, s'han revelat seguint el següent procés:

- 1- Revelat amb revelador Rodinal *especial* diluït (1:75) amb aigua, durant 11 min a 20°C.
- 2- Aturada del revelat amb aigua corrent a temperatura ambient durant 10 segons.
- 3- Fixació amb fixador ràpid Agfa G-350, durant 10 min.
- 4- Rentat amb aigua corrent durant 15 min, dos rentat amb aigua destil.lada de 1 min i un últim rentat amb aigua destil.lada amb una mica de detergent.
- 5- Assecat a temperatura ambient.

A partir dels negatius obtinguts, s'han realitzat ampliacions en paper fotogràfic AGFA politenitzats brillants.

El procés d'ampliació s'ha realitzat en una ampliadora Durst, model LABORATOR,S4. Aquest procés ha consistit en:

- Projecció del negatiu sobre paper fotogràfic, de l'ampliadora. El temps d'exposició s'ha regulat mitjançant els diafragmes de l'ampliadora i el temporitzador. En cada cas ha variat segons les característiques del negatiu (contrast, lluminositat).
- Revelat amb revelador EUKOBRON diluït 1:9, durant 1-2 min.
- Bany d'atur del revelat amb solució d'àcid acètic al 5% durant uns minuts.
- Fixat amb fixador ràpid AGEFIX diluït 1:7 durant 5 min.
- Rentat amb aigua corrent durant 20 min.

Els augments totals de la fotografia es poden calcular com augments en negatiu x augments ampliació, posant una reixeta de mesurament.