

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**Estudi de les alteracions en la funció hepàtica
provocades per la sialoadenectomia en el
ratolí.**

OLGA SÁNCHEZ GARCÍA

Barcelona, 2006

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Programa de Doctorat en Biomedicina, Bienni 1999-2001

MEMÒRIA PER OPTAR AL TÍTOL DE DOCTORA PER LA UB
PRESENTADA PER

OLGA SÁNCHEZ GARCÍA

L'interessada,

Olga Sánchez García

Vist-i-plau dels directors

Dra. Maria Soley i Farrés
Professora titular de Bioquímica
i Biologia Molecular
Departament de Bioquímica
I Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Dr. Ignasi Ramírez i Sunyer
Professor titular de Bioquímica
i Biologia Molecular
Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Finalitzada la feina, és moment de mirar enrere i fer balanç. El treball al laboratori ha estat una experiència inoblidable, plena de molts bons moments. I tot recordant aquests moments és inevitable no pensar en les persones que els van fer possibles: gràcies a tots.

Començant pels meus directors: l'Ignasi i la Maria. Gràcies per la confiança que vau dipositar en mi des del principi, pel vostre ajut incondicional i per mostrar-me que només hi ha una manera de fer ciència: amb molta il·lusió i molta paciència. Us desitjo molta sort en futurs projectes que iniciu.

Gràcies també a la Júlia Peinado, a la Dolores López i al Miquel Llobera, pel vostre interès i el vostre ajut al llarg del tots aquests anys. I al Xavier Remesar gràcies pels seus comentaris irònics, tan oportuns en alguns moments.

Gràcies a la Mercè Durfort per permetre'm la utilització de les instal·lacions del departament de Biologia Cel·lular Animal i Vegetal, de la Facultat de Biologia, per a la realització dels meus estudis histològics i als tècnics d'aquell departament per ajudar-me quan va ser necessari. Igualment voldria agrair als membres dels Serveis Científico-Tècnics de la UB la seva col·laboració i l'ajut ofert per a la realització de les fotografies que es presenten en aquesta memòria.

Gràcies a tots els companys que hem patit "la febre de l'estrès". La tesis no només és una experiència professional sinó també emocional: ha estat un plaer compartir el dia a dia amb tots vosaltres.

Als ex-membres d'EGF: gràcies a la Rosa i al Salva, pels dies tan divertits compartits al laboratori; al Miguel, "el hombre sin edad y sin hambre", gracias por tu sentido del humor ... y tus conocimientos informáticos; a la Irma moltes gràcies pel teu optimisme, tan important en determinats moments, i al Ramón, gracias por ser tan buena gente, tan comprensivo y tan, tan divertido.

A la que fue mi guía inicial en el laboratorio y un gran descubrimiento fuera de la universidad, la MariPau: gracias por demostrarme que "si quieres, puedes" y que lo más importante són las personas. Ah! Y también gracias por esa gran capacidad de sorprender al personal.

Gràcies a l'Elena, l'Albert, la Míriam i el Genis, per aconseguir reviure l'esperit científic a EGF durant un temps i ser uns grans companys. Als meus incondicionals: "EGF-FOREVER": a la superwoman, Meri, gràcies pel teu interès constant i els consells lingüístics; i al Jordi, "el noi de l'Escala", gràcies pels comentaris divertits, els ànims "perfosos", i gràcies sobretot per la paciència i l'ajut que m'has ofert en aquesta última fase. I abans de sortir del laboratori, moltes gràcies als meus petits col·laboradors d'ulls vermells, principals protagonistes d'aquesta aventura i els quals han permès la realització d'aquests treball.

I sense deixar de banda "l'estrès", gràcies als companys d'LPL: als que hi van ser només un temps com la Núria Parramón, el Ferran, el José Terencio, el José i la Gemma; al que hi era, hi és i hi serà, el David i als que hi són actualment com l'Albert Casanovas, la Marta, la Eva, la Núria, el Guillem i el Rafa. Gràcies pels dinars, pels cafès i totes les xerrades compartides.

Dins del departament m'agradaria donar les gràcies a les ja "doctores": Neus, Yolanda, Sònia, Míriam, Vanesa i Marta, per les experiències compartides. Al personal no investigador: la Vane y la Mónica, las dos técnicos más majas de SantaCo, i a la Raquel, la Pili, el Toni i la Georgina, pel

vostre ajut amb els petits problemes (tècnics i burocràtics) apareguts dia a dia. I també gràcies a tot el personal de l'estabulari de la Facultat de Biologia: al Jordi, al Pedro, al Toni, a l'Isabel i sobretot a l'Amanda, per la teva gran amabilitat, simpatia i paciència.

Gràcias a las dos compañeras de Tai-chí y miembros honoríficos de "Café-terapia's Club". A Natalia, gracias por ese espíritu rebelde, y a Ana, gracias por esos grandes consejos y esa madurez. Este tándem explosivo ha conseguido animar y hacer mucho más amena la ardua tarea de la escritura.

Gracias a mis otras niñas. A l'Olga, moltíssimes gràcies per tants bons moments en comú, per la teva infinita comprensió i per compartir amb mi un dels moments més importants de la teva vida. Ets increïble. A la Yoli, gracias por esa sordera tan divertida, esos comentarios corrosivos y por los consejos tan acertados. Eres un solete. Y a Magda, gracias por ser tan franca, por darle ese toque tan especial a todo y estar siempre dispuesta a escuchar con una sonrisa.

Gràcies al Jordi per animar-me a seguir sempre les meves intuïcions. Gracias a Pablo y Ana, por el apoyo y interés durante todo este tiempo. Y al resto de comensales de las reuniones badaloninas gracias por crear ese universo paralelo donde va bien aterrizar de vez en cuando. Y gracias también a Juncal y Xavi por las cenas, las pelis, las charlas compartidas y por hacerme sentir siempre tan cómoda.

Un agradecimiento muy, muy especial para mi familia. Empezando por mis padres: gracias por darme todo vuestro apoyo y confianza en esta aventura, aunque no supieseis del todo lo que hacía, por enseñarme a superarme a mi misma día a día y darme siempre tanto cariño. Soy como soy gracias a vosotros. A Samuel gracias por ser una persona tan generosa, tan dispuesta a todo por los demás y enseñarme que en ocasiones hay que arriesgarse, que la vida es muy corta. Te mereces todo lo mejor. A Mónica, gracias por demostrarme que siempre hay que seguir adelante y por apoyarme incondicionalmente. También gracias a mi segunda mami por esas mañanas de risas y tertulias sin fin, y ese cariño tan especial que me demuestras. A Miguel gracias por esa excentricidad tan tuya, ser un fantástico cuenta-cuentos y ser tan real y divino a la vez. Y como no, a mi Isa, gracias por escucharme en tantas y tantas ocasiones, tener siempre dispuesta "la frase" y sobretodo gracias por no dejarme caer en ningún momento. Os quiero muchísimo a todos.

Y finalmente a Víctor: gracias por enseñarme que vale la pena abrir la caja de Pandora sin miedo a las consecuencias. Gracias por lo compartido y conseguir que todo tenga sentido.

*“I went to the woods because
I wanted to live deliberately.
I wanted to live deep
and suck out all the marrow of life!
To put to rout all that was not life!
And not,
when I came to die,
discover that I had not lived”*

From D.P.S.

*“La más larga caminata comienza con un paso”
Proverbio indú.*

*Este trabajo está dedicado a una pequeña gran persona
que, sin saberlo,
me devolvió la paz una soleada tarde de marzo.*

Para Izan.

Índex

ÍNDEX GENERAL.

| | |
|--|------------|
| Abreviatures | <i>vii</i> |
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1. EL FETGE: ESTRUCTURA I FUNCIONALITAT BÀSICA | 3 |
| 1.2. EL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGF) | 6 |
| 1.2.1. Característiques generals: descobriment, estructura molecular i família | 6 |
| 1.2.2. Síntesi i distribució | 7 |
| 1.2.3. Receptor de EGF (EGFR, ErbB1) | 10 |
| 1.2.3.1. Família del ErbB | 10 |
| 1.2.3.2. Estructura d'ErbB1 | 12 |
| 1.2.3.3. Distribució tissular dels ErbB | 12 |
| 1.2.3.4. Transducció de la senyal | 15 |
| 1.2.4. Efectes biològics de l'EGF | 18 |
| 1.2.4.1. Efectes de l'EGF en el fetge | 20 |
| 1.3. L'EGF I L'ESTRÈS | 22 |
| 1.3.1. Concepte d'estrès | 22 |
| 1.3.2. Estímuls estressants | 24 |
| 1.3.3. Organització funcional dels eixos implicats en la resposta a l'estrès | 25 |
| 1.3.3.1. Activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) | 26 |
| 1.3.3.2. Activació del sistema nerviós simpàtic (SNS) | 28 |
| 1.3.4. Efecte de les catecolamines i de l'estrès sobre la secreció d'EGF | 30 |
| 1.3.5. Efecte de l'EGF sobre les accions de les catecolamines | 30 |
| 1.3.5.1. Efectes metabòlics | 31 |
| 1.3.5.2. Efectes cardiovasculars | 32 |
| 1.3.5.3. Efectes sobre el dany cel·lular provocat per les catecolamines | 33 |
| 1.4. MODELS EXPERIMENTALS PER A L'ESTUDI DE L'ESTRÈS I L'ACCIÓ DE L'EGF | 34 |
| 1.4.1. Estrès social | 34 |
| 1.4.1.1. Paradigma intrús-resident: la confrontació entre mascles | 36 |
| 1.4.1.2. Conseqüències fisiològiques i patològiques de l'estrès social agut | 37 |
| 1.4.1.3. Habitució a l'estrès social | 39 |
| 1.4.2. Estrès produït per la injecció d'endotoxina bacteriana | 40 |
| 1.4.2.1. Reconeixement de l'LPS i transducció de la senyal: inducció de citocines inflamatòries | 42 |
| 1.4.2.2. Evolució de la resposta inflamatòria i mecanismes de retroinhibició generades pel sistema nerviós central | 45 |
| 1.4.2.3. Lesions tissulars induïdes per l'administració d'endotoxina bacteriana | 49 |
| 2. OBJECTIUS | 53 |
| 3. MATERIALS I MÈTODES | 57 |
| 3.1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ | 59 |
| 3.2. MODELS EXPERIMENTALS | 60 |
| 3.2.1. Un model d'estrès social: confrontació entre mascles | 60 |
| 3.2.1.1. Estudi de les alteracions durant la confrontació entre mascles | 60 |
| 3.2.1.2. Estudi de la recuperació després de la confrontació entre mascles | 61 |
| 3.2.1.3. Habitució a l'estrès provocat per la confrontació entre mascles | 61 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1.4. Estudi de l'EGF sobre les lesions hepàtiques produïdes per la confrontació entre mascles | 62 |
| 3.2.2. Un model d'estrès físic-immune: injecció d'endotoxina bacteriana (LPS) | 65 |
| 3.2.2.1. Estudi preliminar: dosi letal 50 | 66 |
| 3.2.2.2. Estudi preliminar d'hepatotoxicitat: dosi-resposta | 67 |
| 3.2.2.3. Evolució temporal dels marcadors de lesió hepàtica | 67 |
| 3.2.2.4. Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència dels animals tractats amb endotoxina bacteriana | 68 |
| 3.2.2.5. Alteracions provocades per la sialoadenectomia en la resposta a l'endotoxina bacteriana | 68 |
| 3.2.2.6. Modifica l'EGF l'efecte hepatotòxic de l'endotoxina bacteriana? | 69 |
| 3.2.3. Un model de fetge perfós: efecte de la infusió d'endotoxina bacteriana | 69 |
| | |
| 3.3. EXTRACCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES | 73 |
| | |
| 3.4. QUANTIFICACIÓ D'EGF A TEIXITS: GLÀNDULES SUBMAXIL·LARS (SMG) I FETGE | 75 |
| | |
| 3.5. QUANTIFICACIÓ D'EGF A PLASMA | 80 |
| | |
| 3.6. QUANTIFICACIÓ DE GLUCOSA PLASMÀTICA | 82 |
| | |
| 3.7. QUANTIFICACIÓ DE GLICOGEN HEPÀTIC | 84 |
| | |
| 3.8. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN PLASMA I MEDI DE PERFUSIÓ | 86 |
| 3.8.1. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH) | 86 |
| 3.8.2. Determinació de l'activitat α -hidroxibutirat deshidrogenasa (α -HBDH) | 89 |
| 3.8.3. Determinació de l'activitat creatina cinasa (CK) | 93 |
| 3.8.4. Determinació de l'activitat aspartat transaminasa (AST) | 95 |
| 3.8.5. Determinació de l'activitat alanina transaminasa (ALT) | 98 |
| | |
| 3.9. DETERMINACIÓ DE CITOCINES | 102 |
| 3.9.1. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) | 102 |
| 3.9.2. Interleucina 1 β (IL-1 β) | 105 |
| 3.9.3. Interleucina 6 (IL-6) | 107 |
| 3.9.4. Interleucina 10 (IL-10) | 110 |
| | |
| 3.10. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA (MPO) | 113 |
| | |
| 3.11. QUANTIFICACIÓ DE CORTICOSTERONA PLASMÀTICA | 115 |
| | |
| 3.12. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES PER A MICROSCOPIA ÒPTICA | 120 |
| | |
| 3.13. TINCIÓ AMB HEMATOXILINA-EOSINA DE MOSTRES HISTOLÒGIQUES INCLOSES EN PARAFINA | 122 |
| | |
| 3.14. QUANTIFICACIÓ DE DANY DE MOSTRES HISTOLÒGIQUES INCLOSES EN PARAFINA | 123 |
| | |
| 3.15. DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'IgGs DE CONILL | 125 |
| 3.15.1. Detecció per Western Blot | 125 |
| 3.15.2. Quantificació per ELISA | 131 |

| | |
|---|------------|
| 3.16. QUANTIFICACIÓ D'ENDOTOXINA EN MOSTRES DE PLASMA..... | 133 |
| 3.17. ANÀLISI ESTADÍSTICA | 135 |
| 4. RESULTATS..... | 139 |
| 4.1. PRIMERA PART. Un model d'estrès social: confrontació entre mascles | 141 |
| 4.1.1. EXPERIMENT I.- Estudi de les alteracions durant la confrontació entre mascles | 144 |
| 4.1.2. EXPERIMENT II.- Estudi de la recuperació després de la confrontació entre mascles..... | 150 |
| 4.1.3. EXPERIMENT III.- Habitució a l'estrès provocat per la confrontació entre mascles..... | 155 |
| 4.2. SEGONA PART. Estudi de l'acció de l'EGF sobre les lesions hepàtiques produïdes per la confrontació entre mascles | 159 |
| 4.2.1. EXPERIMENT IV.- Sialoadenectomia | 161 |
| 4.2.2. EXPERIMENT V.- Anticossos anti-EGF..... | 165 |
| 4.2.3. EXPERIMENT VI.- Tirfostina AG-1478..... | 169 |
| 4.3. TERCERA PART. Un model d'estrès físic-immune: injecció d'endotoxina bacteriana (LPS)..... | 173 |
| 4.3.1. EXPERIMENT VII.- Estudi preliminar: dosi letal 50 | 175 |
| 4.3.2. EXPERIMENT VIII.- Estudi preliminar d'hepatotoxicitat: dosi-resposta | 176 |
| 4.3.3. EXPERIMENT IX.- Evolució temporal dels marcadors de lesió hepàtica..... | 177 |
| 4.3.4. EXPERIMENT X.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència dels animals tractats amb endotoxina bacteriana..... | 181 |
| 4.3.5. EXPERIMENT XI.- Alteracions provocades per la sialoadenectomia en la resposta a la injecció d'endotoxina bacteriana..... | 182 |
| 4.3.6. EXPERIMENT XII.- Modifica l'EGF l'efecte hepatotòxic de l'endotoxina bacteriana?..... | 189 |
| 4.4. QUARTA PART. Estudi de l'efecte de la sialoadenectomia sobre la producció de citocines pel fetge perfòs..... | 193 |
| 4.4.1. Posta a punt del mètode de perfusió de fetge de ratolí: assajos preliminars | 195 |
| 4.4.2. Perfusió de fetges d'animals sialoadenectomitzats | 197 |
| 4.4.2.1. Secreció basal..... | 197 |
| 4.4.2.2. Resposta a l'endotoxina | 200 |
| 5. DISCUSSIÓ..... | 209 |
| 5.1. LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES: UN MODEL D'ESTRÈS | 211 |
| 5.2. LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES PROVOCA LESIONS HEPÀTIQUES | 216 |
| 5.3. LES LESIONS HEPÀTIQUES PRODUÏDES PER LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES SÓN INDEPENDENTS DE LA SECRECIÓ D'EGF | 219 |
| 5.4. LA SIALOADENECTOMIA PRÈVIA, PERÒ NO L'ADMINISTRACIÓ AGUDA D'EGF, ALTERA LA RESPOSTA A L'ENDOTOXINA BACTERIANA | 223 |
| 6. CONCLUSIONS | 231 |

7. BIBLIOGRAFIA 235

ÍNDIX DE FIGURES.

| | |
|--|-----|
| 1.1. Esquema representatiu dels diferents tipus cel·lulars presents al fetge..... | 4 |
| 1.2. Estructura del lobulet clàssic i del lobulet portal (A). Representació gràfica del sentit de la circulació sanguínia dins del sinusoides hepàtic (B)..... | 5 |
| 1.3. Seqüència d'aminoàcids (A) i estructura molecular (B) de l'EGF de ratolí..... | 6 |
| 1.4. Estructura dels receptors de la família dels ErbBs i els seus lligands..... | 11 |
| 1.5. Esquema reduït de les vies de transducció de senyal a través de l'EGFR..... | 16 |
| 1.6. Anatomia funcional de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA)..... | 28 |
| 1.7. Anatomia funcional del sistema nerviós simpàtic (SNS)..... | 29 |
| 1.8. Diagrama esquemàtic de la transducció de senyal originada per l'LPS per a la generació de citocines..... | 44 |
| 1.9. Representació gràfica de la relació existent entre el sistema immune i el sistema nerviós central..... | 49 |
| 4.1. Estrès per confrontació: paràmetres corporals..... | 144 |
| 4.2. Estrès per confrontació: paràmetres indicadors d'estrès..... | 145 |
| 4.3. Estrès per confrontació: citocines proinflamàtores en plasma..... | 146 |
| 4.4. Estrès per confrontació: activitats enzimàtiques en plasma..... | 147 |
| 4.5. Estrès per confrontació: concentració d'EGF..... | 148 |
| 4.6. Especificitat de l'ELISA..... | 149 |
| 4.7. Recuperació del glicogen hepàtic..... | 150 |
| 4.8. Recuperació de les activitats enzimàtiques en plasma..... | 151 |
| 4.9. Recuperació de la concentració d'EGF..... | 152 |
| 4.10. Activitat mieloperoxidasa (MPO) en fetge després de la confrontació..... | 153 |
| 4.11. Evidències morfològiques de lesions necròtiques en fetges provinents de ratolins sotmesos a estrès per confrontació..... | 154 |
| 4.12. Quantificació del grau d'afectació del fetge després de la confrontació..... | 155 |
| 4.13. Habitució a l'estrès per confrontació: paràmetres indicadors d'estrès..... | 156 |
| 4.14. Activitats enzimàtiques en plasma en l'habitució a l'estrès per confrontació..... | 157 |
| 4.15. Concentració d'EGF en l'habitució a l'estrès per confrontació..... | 158 |
| 4.16. Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: paràmetres sensibles a l'estrès..... | 162 |
| 4.17. Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: activitats enzimàtiques en plasma..... | 163 |
| 4.18. Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: concentració d'EGF..... | 164 |
| 4.19. Efecte de la injecció d'anticossos anti-EGF sobre les activitats enzimàtiques al plasma després de la confrontació..... | 166 |
| 4.20. Presència de les IgGs de conill al plasma dels animals injectats amb anticossos anti-EGF després de la confrontació..... | 167 |
| 4.21. Efecte de la injecció d'anticossos anti-EGF sobre la concentració d'EGF després de la confrontació..... | 168 |
| 4.22. Efecte de l'AG-1478 sobre els paràmetres sensibles a l'estrès durant la confrontació..... | 170 |
| 4.23. Efecte de l'EG-1478 sobre la concentració d'EGF durant la confrontació..... | 171 |
| 4.24. Efecte de l'AG-1478 sobre les activitats enzimàtiques en plasma durant la confrontació..... | 172 |
| 4.25. Efecte de l'LPS sobre la supervivència dels ratolins..... | 176 |
| 4.26. Alteracions provocades per l'LPS: paràmetres metabòlics (A) i activitats enzimàtiques al plasma (B)..... | 177 |
| 4.27. Paràmetres metabòlics després de la injecció de LPS..... | 178 |
| 4.28. Activitats enzimàtiques en plasma i activitat mieloperoxidasa (MPO) a fetge després de la injecció de LPS..... | 179 |
| 4.29. Concentració d'EGF després de la injecció de LPS..... | 180 |

| | |
|---|-----|
| 4.30. Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència a l'endotoxina..... | 182 |
| 4.31. Cinètica de desaparició de LPS en animals sialoadenectomitzats..... | 183 |
| 4.32. Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: glicèmia i glicogen hepàtic..... | 184 |
| 4.33. Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors plasmàtics de lesions cel·lulars..... | 185 |
| 4.34. Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors hepàtics de lesions cel·lulars..... | 186 |
| 4.35. Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: citocines i corticosterona plasmàtiques..... | 187 |
| 4.36. Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: EGF en plasma i teixits.. | 188 |
| 4.37. Efecte de l'EGF i de l'AG-1478 sobre la resposta a l'endotoxina: paràmetres metabòlics..... | 190 |
| 4.38. Efecte de l'EGF i de l'AG-1478 sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors de dany hepàtic..... | 191 |
| 4.39. Efecte de l'LPS sobre l'alliberament de LDH i citocines al fetge perfós..... | 196 |
| 4.40. Secreció de TNF- α i IL-6 pel fetge perfós en condicions basals..... | 198 |
| 4.41. Secreció de IL-1 β i IL-10 pel fetge perfós en condicions basals..... | 199 |
| 4.42. Secreció de LDH pel fetge perfós en condicions basals..... | 200 |
| 4.43. Efecte de l'LPS sobre la secreció de TNF- α i IL-6..... | 201 |
| 4.44. Efecte de l'LPS sobre la secreció de IL-1 β i IL-10..... | 202 |
| 4.45. Efecte de l'LPS sobre la secreció de LDH..... | 203 |
| 4.46. Representació gràfica de les correlacions existents entre les citocines secretades pel fetge perfós: TNF- α - IL-1 β , TNF- α -IL-6 i IL-1 β - IL-10..... | 205 |
| 4.47. Representació gràfica de l'ajust del valor de LDH obtingut i el valor estimat de LDH (eLDH) en funció de les diferents citocines secretades pel fetge perfós..... | 206 |
| 5.1. Esquema representatiu de la resposta inflamatòria generada per l'endotoxina bacteriana o LPS..... | 230 |

ÍNDIX DE TAULES.

| | |
|---|-----|
| 1.1. Concentració d'EGF en teixits i fluïds de ratolí..... | 10 |
| 1.2. Expressió dels ErbB a diferents òrgans i teixits humans..... | 13 |
| 1.3. Resposta a diferents estímuls estressants de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA), sistema medul·lo-adrenal (SMA) i els nervis simpàtics (NS)..... | 26 |
| 4.1. Activitats enzimàtiques en plasma de ratolins injectats amb dimetilsulfòxid (DMSO) a diferents concentracions..... | 169 |
| 4.2. Citocines i LDH alliberades pels fetges perfosos en condicions basals..... | 204 |
| 4.3. Citocines i DLH alliberades pels fetges estimulats amb LPS..... | 204 |
| 4.4. Rectes de regressió obtingudes de l'anàlisi de les correlacions entre les diferents citocines..... | 204 |
| 4.5. Rectes de regressió i suma de quadrats residual (SQR) obtingudes d'estimar el valor (eLDH) en funció de les diferents citocines secretades pel fetge perfós..... | 205 |
| 4.6. Valors de T ₅₀ , K, Max i min de les corbes d'alliberació de cadascun dels paràmetres mesurats en fetge perfós..... | 207 |

Abreviatures

| | |
|--------------|---|
| A | Adrenalina |
| AbD | Aigua bidestil·lada |
| AC | Adenilat ciclase |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropa o corticotropina |
| AD | Aigua destil·lada |
| ALT | Alanina transaminasa |
| AMPc | AMP cíclic |
| AR | Amfiregulina |
| ARIA | Receptor inductor d'activitat acetilcolina |
| ARL | Aigua reactiva per LAL |
| AST | Aspartat transaminasa |
| AVP | Arginina vasopressina |
| Bcl-2 | Cèl·lules B de limfoma/leucèmia-2 |
| BSA | Albúmina sèrica bovina |
| BTC | Betacel·lulina |
| CK | Creatina cinasa |
| CREBP | Proteïna d'unió a l'element de resposta a l'AMPc |
| CRF-R1 | Receptor de CRF o CRH |
| CRH | Hormona alliberadora de corticotropina |
| DAG | Diacilglicerol |
| D-GalN | D-galactosamina |
| DMSO | Dimetilsulfòxid |
| DTT | Ditionitritol |
| E | Epinefrina |
| EGF | Factor de creixement epidèrmic |
| EGFR | Receptor d'EGF |
| EPG | Epigen |
| EPR | Epiregulina |
| ErbB | Receptors dels membres de la família de l'EGF |
| ERK | Cinasa regulada extracel·lularment |
| FSH | Hormona estimulant dels fol·licles |
| G-6-P | Glucosa 6-fosfat |
| G-6-PDH | glucosa 6-fosfat deshidrogenasa |
| GAP | Proteïna activadora de GTPases |
| GGF | Factor de creixement glial |
| GOT | Glutamat oxalacetat transaminasa |
| GPT | Glutamat piruvat transaminasa |
| Grb2 | Proteïna associada als receptors de factors de creixement-2 |
| HB-EGF | Factor de creixement epidèrmic semblant a EGF i unit a heparina |
| HDL | Lipoproteïna d'alta densitat |
| HER | Receptor d'EGF |
| HK | Hexocinasa |
| HPA | (Eix) Hipotàl·lem-pituitària-adrenal |
| HRG | Heregulina |
| HSL | Lipasa sensible a hormones |
| HTAB | Bromur d'hexadeciltrimetilamoni |
| ICAM-1 | Molècula d'adhesió intercel·lular 1 |
| ICE | Enzim conversor de la IL-1 β |
| IFN | Interferons |
| I κ B | Proteïna inhibidora de NF- κ B |

| | |
|------------------|--|
| IKK | Cinasa de I κ B |
| IL-1/6/10 | Interleucines |
| IL-1R1/2 | Receptors de IL-1 |
| IL-1R-AcP | Proteïna accessòria del receptor de IL-1 |
| IL-6R | Receptor de IL-6 |
| iNOS | Isoforma induïble de la òxid nítric sintasa |
| IP/ip | Intraperitoneal |
| IP ₃ | Inositol trifosfat |
| IRAK-1/2 | Cinasa ½ associada al receptor de IL-1 |
| IV/iv | Intravenós/osa |
| LAL | Lisat d'amebòcits de <i>Limulus</i> |
| LBP | Proteïna d'unió a lipopolisacàrid |
| LC | <i>Locus ceruleus</i> |
| LDH | Lactat deshidrogenasa |
| LDL | Lipoproteïna de baixa densitat |
| LET-23 | Receptor de <i>Caenorhabditis elegans</i> homòleg a l'EGFR |
| LH | Hormona luteilitzant |
| LIN-3 | Lligand de <i>Caenorhabditis elegans</i> homòleg a l'EGF |
| LPS | Lipopolisacàrid |
| MAL | Proteïna adaptadora semblant a MyD88 |
| MEK | Cinasa de MAPK/ERK |
| MHC-II | Complexe de histocompatibilitat classe II |
| MPO | Mieloperoxidasa |
| MTP | PBS amb llet desnatada i tween-20 |
| MyD88 | Factor 88 de diferenciació mioide |
| NA | Noradrenalina |
| NDF | Factor diferenciador de Neu |
| NE | Norepinefrina |
| NFG | Factor de creixement nerviós |
| NF-kB | Factor nuclear kB |
| NIK | Cinasa inductora de NF-kB |
| NK | (Cèl·lules) citocida natural |
| NO | Òxid nítric |
| NRG | Neuregulina |
| NS | Nervis simpàtics |
| OS | Animals amb operació simulada |
| p38MAPK | Proteïna cinasa activada per mitògens p38 |
| PBS | Solució salina tamponada amb fosfats |
| PGEs | Prostaglandines |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3-cinasa |
| PIP ₂ | Fosfatidil inositol bisfosfat |
| PKA | Proteïna cinasa A |
| PKC | Proteïna cinasa C |
| PLC- β | Fosfolipasa C- β |
| PLC- γ | Fosfolipasa C- γ |
| POMC | Pro-opiomelanocortina |
| PRA-MTP | MTP amb plasma de rata desproteïnit |
| PSA | Persulfat amònic |
| PVN | Nucli paraventricular |
| SAPK | Proteïnes cinases activades per l'estrès |
| SC/sc | Subcutani/ània |

| | |
|----------------|---|
| SDS | Docecilsulfat sòdic |
| Shc | Homòleg a Src i col·làgena |
| SIALO | Animals sialoadenectomitzats |
| SMA | (Sistema nerviós) Simpàtic medul·lo-adrenal |
| SMG | Glàndules submaxil·lars |
| SNC | Sistema nerviós central |
| SNS | Sistema nerviós simpàtic |
| SNX-1 | Nexina de classificació-1 |
| STAT | Transductor de senyal i activador de transcripció |
| TAK-1 | Cinasa 1 activada pel factor de creixement transformant |
| TEA | Trietanolamina |
| TEMED | N, N, N', N' tetrametiletilediamina |
| TGF- α | Factor de creixement transformant α |
| TIR | Receptor d'IL-1 semblant a <i>Toll</i> |
| TIRAP | Proteïna adaptadora que conté domini TIR |
| TLR-4/2 | Receptor 4/2 semblant a <i>Toll</i> |
| TNFR1/2 | Receptors de TNF- α |
| TNF- α | Factor de necrosi tumoral α |
| TRAF-6 | Factor 6 associat al receptor de TNF |
| VCAM-1 | Molècules d'adhesió a cèl·lules vascular |
| VLDL | Lipoproteïna de molt alta densitat |
| VP | Vasopressina |
| Vs | <i>versus</i> |
| ZPR-1 | Proteïna d'unió a zinc |
| α -HBDH | α -hidroxibutirat deshidrogenasa |

Introducció

1.1. EL FETGE: ESTRUCTURA I FUNCIONALITAT BÀSICA.

El fetge és un òrgan de vital importància per a la supervivència de l'organisme. És molt versàtil i realitza múltiples i molt variades funcions: es troba implicat en el metabolisme de carbohidrats, proteïnes i lípids, i també realitza funcions detoxificans (de toxines i fàrmacs) i immunològiques, entre d'altres.

El fetge es troba situat a la cavitat abdominal i es desenvolupa com una evaginació de l'intestí prim (*Wheater i col., 1987*). A l'igual que succeeix amb altres òrgans es format per diferents tipus de cèl·lules que interaccionen entre si i amb la matriu extracel·lular. És aquesta interacció la que permet mantenir l'estructura hepàtica normal i el funcionament harmònic de les cèl·lules. Els tipus cel·lulars residents al fetge són 4 (figura 1.1): hepatòcits, cèl·lules de Kupffer, cèl·lules estelades i cèl·lules endotelials.

Les cèl·lules majoritàries del fetge són els hepatòcits. Aquestes estan disposades en fileres radials orientades cap a uns espais plens de sang anomenats sinusoides. Segons la seva localització dins del lobulet hepàtic manifesten diferents propietats estructurals, histoquímiques i bioquímiques. La sang està separada de la superfície dels hepatòcits per una capa de cèl·lules endotelials aplanades separades entre elles per uns petits orificis. Aquestes presenten receptors per a la endocitosi de substàncies com LDL i també produeixen mediadors vasoactius (endotelina-1) i citocines. Entre aquests dos tipus cel·lulars es troba situat l'anomenat espai de Disse. Gràcies als petits orificis de la capa endotelial és possible l'intercanvi de molècules entre l'espai de *Disse* i el torrent circulatori (*Alberts i col., 1992; Ham i Corak, 1988*).

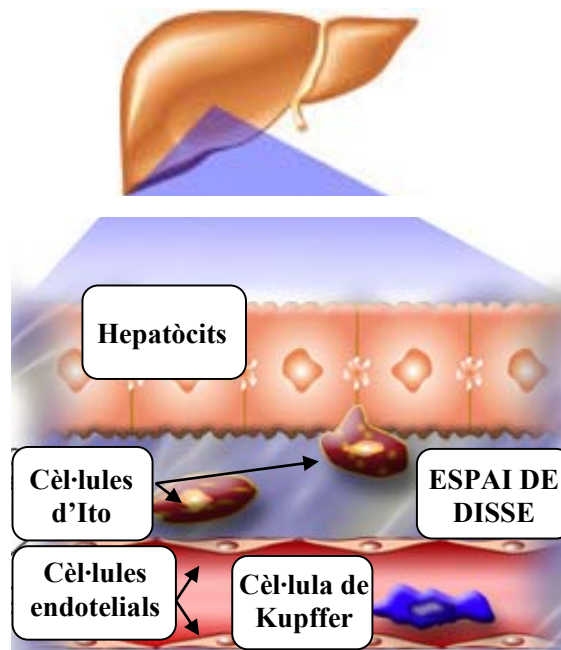


Figura 1.1.- Esquema representatiu dels diferents tipus cel·lulars presents al fetge. Les cèl·lules de Kupffer es troben situades a l'interior del sinusoides hepàtic, mentre que les cèl·lules d'Ito es troben a l'espai de Disse. Procedent de w.w.w.saludhoy.com.

A banda de les ja esmentades, al fetge també trobem les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules estelades o cèl·lules d'Ito. Les cèl·lules de Kupffer, derivades dels monòcits, són els macròfags residents i es troben situades a la paret sinusoidal. Es creu que són cèl·lules migratòries perquè no estableixen unions intercel·lulars amb les cèl·lules veïnes. Finalment les cèl·lules estelades, situades a l'espai de Disse, són les que emmagatzemen vitamina A i segreguen diferents factors de creixement (*Alberts i col., 1992; Ham i Corak, 1988*).

Els hepatòcits es troben organitzats constituint unes estructures anomenades lobulets tal i com s'observa a la figura 1.2 pannel A. El lobulet hepàtic clàssic té forma hexagonal, es troba organitzat en torn a una vena central i a cada cantonada d'aquest hexàgon podem veure una branca de la vena porta, una de l'artèria hepàtica i una del conducte hepàtic biliar juntament amb el conducte limfàtic. Aquesta estructura s'observa clarament en un tall transversal de fetge de porc en canvi és molt difícil de veure en el ratolí. Però també existeix una altra manera de definir el lobulet si considerem el conducte biliar com el lloc on es buida la secreció i al voltant es situa el

parènquima hepàtic. Així es descriu l'anomenat lobulet hepàtic portal, l'ús del qual resulta més útil en certes situacions patològiques (*Wheater i col., 1987; Ham i Corak, 1988*).

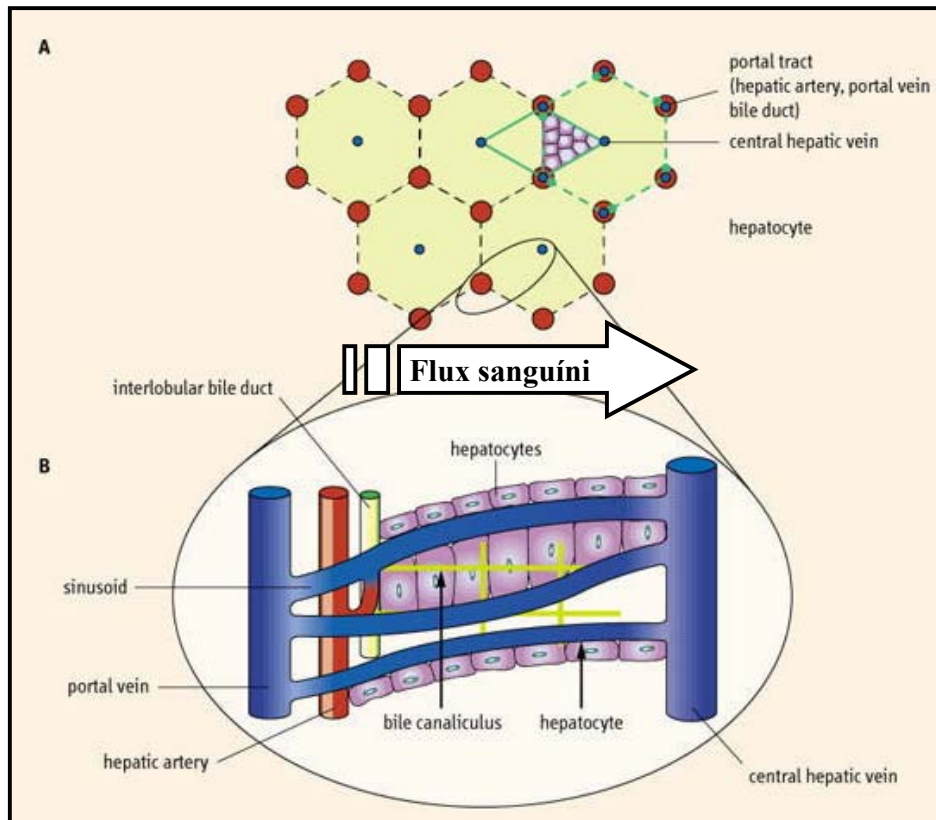


Figura 1.2.- Estructura del lobulet clàssic i del lobulet portal (A). Representació gràfica del sentit de la circulació sanguínia dins del sinusoides hepàtic (B). Procedent de <http://bioweb.uv.es>.

Una característica molt singular del fetge és que té una doble vascularització, ja que rep sang oxigenada de les artèries hepàtiques (dreta i esquerra) i sang rica en nutrients a través de la vena porta. La sang surt del fetge per les venes hepàtiques, situades a la part posterior de l'òrgan, que buiden el seu contingut a la vena cava inferior (*Leslie i col., 1997*) (Figura 1.2 pannell B).

El fetge està involucrat en l'homeòstasi de la glucosa. Els hepatòcits són les cèl·lules que, per unitat de pes, acumulen més glicogen. A partir d'aquests, o per la síntesi *de novo* (gliconeogènesi), el fetge pot alliberar glucosa cap a la sang. Té també funcions molt destacades en el metabolisme lipídic. És el responsable de la formació de cossos cetònics i d'algunes lipoproteïnes com VLDL i HDL. Sintetitza albúmina i altres proteïnes, moltes d'elles essencials per a la

coagulació de la sang (protrombina i fibrinogen); elabora la bilis i emmagatzema vitamines (A, del complex vitamínic B i D) i a més s'encarrega de la detoxificació de fàrmacs i de compostos tòxics de l'organisme (*Jungermann i Katz, 1989*). També realitza funcions secretores ja que actua com a glàndula exocrina (segregant bilis cap al duodè) i com a glàndula endocrina (segregant hormones i proteïnes) (*Ham i Corak, 1988*).

1.2. EL FACTOR DE CREIXEMENT EPIDÈRMIC (EGF).

1.2.1 Característiques generals: descobriment, estructura molecular i família.

L'EGF fou descobert de forma casual per Stanley Cohen l'any 1960 (*Cohen, 1960*) durant la purificació del Factor de Creixement Nerviós (NGF) a partir de les glàndules submaxil·lars de ratolí. Va observar que injeccions diàries de certes fraccions d'extractes glandulars a ratolins nounats produïen canvis en el desenvolupament no atribuïbles al NGF: es produïa una obertura prematura de les parpelles i una erupció avançada dels incisius. Dos anys després d'aquest descobriment, s'aïllà i es purificà l'EGF de les glàndules submaxil·lars de ratolí mascle (*Cohen, 1962*). Va ser anomenat Factor de Creixement Epidèrmic (EGF) perquè produïa un increment del gruix i queratinització de l'epidermis en teixits tractats de ratolí (*Cohen i Elliot, 1963*).

L'EGF de ratolí és un polipèptid no glicosilat de cadena simple constituït per 53 aminoàcids (Figura 1.3) amb un pes molecular de 6 kDa (*Taylor i col., 1970*), el qual té una gran termoestabilitat i una elevada resistència a la digestió per tripsina, quimiotripsina i pepsina. La seva estructura conté 3 ponts disulfur intramoleculars que determinen la seva estructura terciària i necessaris per a la seva activitat biològica (*Taylor i col., 1972*).

A.

Asn Ser Tyr Pro Gly Cys Pro Ser Ser Tyr Asp Gly
Tyr Cys Leu Asn Gly Gly Val Cys Met His Ile Glu
Ser Leu Asp Ser Tyr Thr Cys Asn Cys Val Ile Gly
Tyr Ser Gly Asp Arg Cys Gln Thr Arg Asp Leu
Arg Trp Trp Glu Leu Arg

B.



Figura 1.3.- Seqüència d'aminoàcids (A) i estructura molecular (B) de l'EGF de ratolí. Obtinguda de Swiss-Prot

Encara que l'EGF més ben descrit és el de ratolí també s'ha descrit que el gen de l'EGF en humans, anomenat inicialment urogastrona, es troba localitzat al cromosoma 4 i consisteix en un complex de 24 exons separats per regions no codificants (*Bell i col., 1986*).

El Factor de Creixement Epidèrmic (EGF) pertany a una família de proteïnes amb un elevat grau d'homologia, anomenada família de l'EGF, las quals actuen com a lligands de la família dels receptors de l'EGF (*Riese i Stern, 1998*). Els membres d'aquesta família són: el mateix EGF, el factor de creixement transformant α (TGF- α), el factor de creixement epidèrmic semblant a l'EGF i amb afinitat per l'heparina (HB-EGF), l'amfíregulina (AR), l'epiregulina (EPR), la betacelul.lina (BTC), les 4 neuregulines (NRG-1, NRG-2, NRG-3 i NRG-4) i el recentment descobert epigen (EPG) (*Kochupurakkal i col., 2005*). La NRG-1 és també coneguda com a factor diferenciador de Neu (NDF), heregulina (HRG), receptor inductor d'activitat acetilcolina (ARIA) i factor de creixement glial (GGF) (*Dreux i col, 2006*).

1.2.2. Síntesi i distribució.

L'EGF de ratolí és sintetitzat en forma d'un precursor constituït per 1217 aminoàcís anomenat prepro-EGF (*Gray i col., 1983*), aquest precursor és especialment abundant a les glàndules submaxil.lars i al ronyó. La seqüència del precursor que correspon a l'EGF madur està situat aprop de l'extrem C-terminal (residus 971-1023) i l'EGF s'allibera d'aquest precursor gràcies a l'acció d'una endopeptidasa arginino-específica. A més aquest prepro-EGF conté un domini hidrofòbic, necessari pel seu ancoratge a la membrana (*Mroczkowski i col., 1989*). Una altra característica d'aquest precursor és que, a més de l'EGF pròpiament dit, dins la seva seqüència conté 8 estructures del tipus "EGF-like", la funció de les quals es va especular que podria ser la d'interaccionar amb altres receptors o lligands (*Appella i col., 1988*).

Les glàndules submaxil.lars són el principal lloc de síntesi, emmagatzematge i secreció d'EGF en els ratolins. La síntesi té lloc més concretament en les cèl.lules granuloses dels túbuls contornejats, on també se sintetitzen altres pèptids biològicament actius com l'NGF i la renina (*Fisher i Lakshmanan, 1990*). En humans la concentració d'EGF, o urogastrona, a les glàndules salivars és molt inferior, i sembla ser que les glàndules paròtides serien les principals encarregades de la seva secreció (*Thesleff i col., 1988*).

Els factors que regulen el contingut d'EGF a les glàndules submaxil·lars són molts i molt diversos, entre ells trobem l'edat (les concentracions d'EGF són molt inferiors a nounats) i el sexe (les hormones sexuals influencien en la concentració d'EGF, ja que la testosterona fa augmentar la seva síntesi)(*Lakshamanan, 1986*). S'ha descrit també l'existència d'un ritme circadiari en el ratolí pel qual els nivells d'EGF a glàndules submaxil·lars assoleixen uns nivells màxims a les 20:00 hores (*Siminoski i col., 1993*). Altres hormones, a banda de les ja esmentades, com són la insulina i les hormones tiroïdals fan augmentar la síntesi i secreció d'EGF (*Kasayama i col., 1989a; Kasayama i col., 1989b; Kasayama i col., 1996*). Un important esment mereixen les catecolamines, ja que els estímuls del tipus α_1 -adrenèrgics produeixen una ràpida secreció de l'EGF des de les glàndules submaxil·lars, que va a parar majoritàriament a la saliva (secreció exocrina), tot i que una fracció va a parar directament a la sang (secreció endocrina) (*Byyny i col., 1974; Tuomela, 1990*). En condicions basals trobem unes concentracions d'EGF a saliva de 150 nM, en canvi, la concentració a plasma és molt menor, al voltant de 0.2 nM (*Grau i col., 1994*). De la mateixa manera que existeix un clar dimorfisme sexual pel que fa a la producció d'EGF a les glàndules submaxil·lars, les concentracions basals d'EGF a plasma també es diferencien clarament, sent molt més baixos als ratolins femella: 0.04 nM (*Grau i col., 1994*).

En el fetge la concentració d'EGF va augmentant al llarg del desenvolupament. Els experiments realitzats per Mullhaupt i col·laboradors (*Mullhaupt i col., 1994*) van demostrar que els hepatòcits contenen RNAm de l'EGF, indicant així que aquest òrgan pot constituir un altre lloc de síntesi. Tant l'EGF administrat de forma exògena com l'alliberat de les glàndules submaxil·lars després d'un estímul α_1 -adrenèrgic, desapareixen ràpidament del plasma, i el fetge és el principal responsable d'aquest aclariment. En aquest procés en deriva un petit percentatge cap a la bilis (*Hilarie i col., 1983; Burwen i col., 1984*), on la concentració aproximada d'EGF és de gairebé 30 nM (*Grau i col., 1994*). De nou existeix un elevat dimorfisme sexual pel que fa a la quantitat d'EGF emmagatzemat en aquest fluid, ja que als ratolins femella les concentracions assoleixen només uns nivells 5.5 vegades menor. L'origen d'aquest EGF no és únicament la síntesi endògena per part del fetge (*Rall i col., 1985*), sinó que, en part, procedeix del captat directament de la circulació sanguínia (*Grau i col., 1994*).

En el ratolí el ronyó és considerat un lloc de síntesi, ja que es detecten grans quantitats d'RNAm del seu precursor, però no de reserva perquè l'EGF és ràpidament excretat a l'orina (*Rall i col., 1985*). Aquesta secreció es produeix per l'activació de receptors β -adrenèrgics que es troben localitzats en el ronyó (*Olsen i col., 1985*). A l'orina la concentració d'EGF és molt elevada (prop

de 100 nM) (*Grau i col., 1994; Marti i col., 1989*) i s'ha calculat que 1 mL d'orina conté la mateixa quantitat d'EGF que 100 parelles de ronyons adults (*Perheentupa i col., 1985*). Cal dir que aquest òrgan també contribueix a l'aclariment plasmàtic d'EGF, per tant una petita part de l'EGF excretat a l'orina prové també d'aquesta funció (*Tuomela, 1990*). Contràriament al descrit anteriorment en glàndules submaxil·lars, la concentració d'EGF al ronyó és una mica més elevada a femelles (*Perheentupa i col., 1985*).

En ratolins nounats les concentracions d'EGF a les glàndules submaxil·lars són molt baixes, ja que augmenten amb l'edat tal i com s'ha indicat anteriorment, i és la llet materna, amb la seva elevada concentració d'EGF, la que supliria les necessitats d'aquest nounat, per tal que es produeixi el correcte desenvolupament del seu tracte gastrointestinal (*Fisher i Lakshmanan, 1990*). La concentració d'EGF a la llet de ratolí és pròxima a 50 nM (*Marti i col., 1989*). Amb experiments realitzats amb animals sialoadenectomitzats (els quals han patit una operació quirúrgica consistent en l'extracció de les glàndules submaxil·lars), no van disminuir les concentracions a la llet de les femelles, indicant que existeix, doncs, una producció local per part de les glàndules mamàries (*Grueters i col., 1985*).

També al tracte gastrointestinal trobem EGF: pàncreas, estómac, intestí (amb un gradient pròxim-distal), còlon, i també als diferents fluïds que en deriven com el suc gàstric, pancreàtic o duodenal (*Fisher i Lakshmanan, 1990; Marti i col., 1989*). Les glàndules de Brunner localitzades en la submucosa del duodé proximal, són juntament amb les glàndules submaxil·lars i ronyó, un lloc de síntesi força important.

Altres teixits on es pot trobar EGF són la glàndula tiroides, els testicles, el cervell, els pulmons, a les glàndules llagrimals, pituitària i adrenals (*Fisher i Lakshmanan, 1990; Marti i col., 1989*), però sempre en concentracions molt més baixes. Alguns llocs són de síntesi, encara que molt menys importants que els anteriorment descrits, i altres, en canvi, reben l'EGF procedent de la circulació.

A la taula 1.1 es troben representades de forma resumida les concentracions d'EGF determinades a diferents teixits i fluïds del ratolí.

Taula 1.1.- Concentració d'EGF en teixits i fluïds de ratolí

| | |
|------------------|-------------|
| SMG (nmol/g) | |
| Nounats | 0.19 ± 0.04 |
| Femelles adultes | 5 ± 1 |
| Mascles adults | 141 ± 7 |
| Fetge (pmol/g) | 53 ± 5 |
| Ronyó (pmol/g) | 54 ± 4 |
| Plasma (nM) | 0.17 ± 0.04 |
| Bilis (nM) | 28 ± 17 |
| Orina (nM) | 83 ± 26 |

Tret de Grau i col.laboradors (*Grau i col., 1994*).

1.2.3. Receptor de EGF (EGFR, ErbB1).

1.2.3.1. Família dels ErbB.

El receptor de l'EGF (EGFR, també anomenat HER i més comunament ErbB1) pertany a la família de receptors anomenada família dels ErbB, de la qual també en són membres: ErbB2 (també anomenat Neu, HER-2), ErbB3 (HER-3) i ErbB4 (HER-4) (*Yarden i Sliwkowski, 2001; Holbro i Hynes, 2004*). Els 4 membres d'aquesta família tenen un elevat grau d'homologia i es caracteritzen per compartir una arquitectura molecular comú, representada a la figura 1.4. Els membres d'aquesta família quan s'activen dimeritzen i poden formar 4 homodimers i 6 heterodimers, per tant es poden constituir fins a 10 combinacions diferents entre ells.

La família dels ErbB ha evolucionat des de la combinació més senzilla de lligand-receptor fins a un complex sistema de 4 receptors i un elevat nombre de lligands. Al nemàtode *Caenorhabditis elegans*, només existeix LET-23 (l'homòleg de EGFR) i un únic lligand LIN-3, i són necessaris durant el desenvolupament de la vulva (*Chang i Sternberg, 1999*). En *Drosophila melanogaster*, el sistema ErbB ja és una mica més complexe i està format per 5 lligands i un únic receptor, DER, necessaris durant la oogènesi, la embriogènesi i també en la proliferació i diferenciació dels discs imaginats (*Reich i Shilo, 2002*). En vertebrats superiors existeix una elevada complexitat en la senyalització que es produeix entre els membres de la família de l'EGF i els membres de la família ErbB, ja que un únic receptor pot activar-se per diferents membres de la família de l'EGF i també una mateixa proteïna de la família de l'EGF pot activar a diferents

receptors (*Riese i Stern, 1998; Roskoski, 2004; Rowinski, 2004*). L'EGF, el TGF- α , AR i EPG només s'uneixen i activen ErbB1. Per la seva banda les neuregulines s'uneixen ErbB3 i ErbB4. La resta de membres de la família de l'EGF, és a dir, l'HB-EGF, la BTC i l'EPR poden unir-se tant a ErbB1 com a ErbB4. ErbB2 (anomenat "receptor orfe") no uneix directament cap lligand però dimeritza amb els altres ErbB (*Dreux i col., 2006*). A la figura 1.4 es troba representada gràficament la relació que s'estableix entre les diferents membres de la família de l'EGF i els membres de la família dels ErbB.

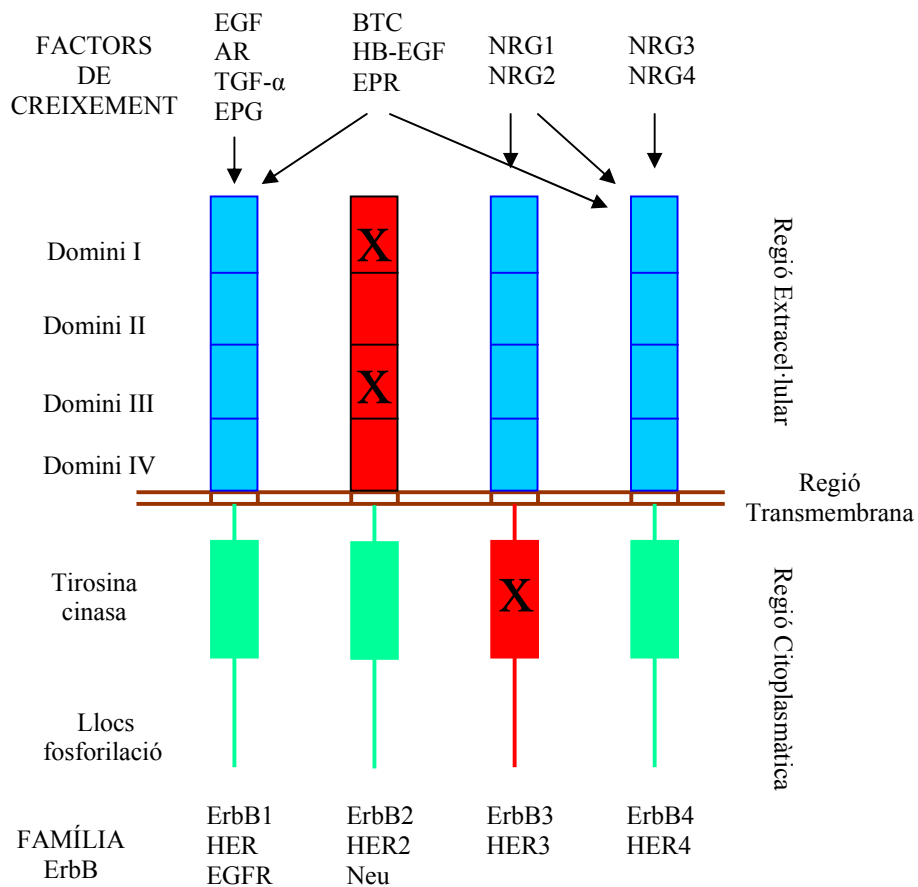


Figura 1.4.- Estructura dels receptors de la família dels ErbBs i els seus lligands. El receptor consisteix en tres regions: una regió extracel·lular d'unió al lligand, una regió transmembrana i una regió citoplasmàtica amb un domini amb activitat tirosina-cinasa. El domini de unió a lligand inactiu a ErbB2 i el domini cinasa inactiu de ErbB3 està indicat com X. (EGF, Factor de Creixement Epidèrmic; AR, amfíregulina; TGF- α , Factor de Creixement Transformant α ; BTC, betacel·lulina; HB-EGF, Factor de Creixement Epidèrmic unit a heparina; EPR, epiregulina; NRG, neuregulines; EPG, epigen). Adaptat de Roskoski (*Roskoski, 2004*) i Dreux i col·laboradors (*Dreux i col., 2006*).

1.2.3.2. Estructura d'ErbB1.

El receptor de l'EGF és una glicoproteïna transmembrana amb un pes molecular aproximat de 170.000 i està constituït per una única cadena polipeptídica de 1186 aminoàcids (Ullrich i col., 1984). Estructuralment el receptor de l'EGF es troba dividit en 4 parts: **(a)** una extracel·lular caracteritzada per la presència de dues regions riques en cisteïna (Carpenter i Zendegui, 1986) entre els quals s'ha identificat la zona d'unió a l'EGF (Lax i col., 1988; Lax i col., 1989); **(b)** una hidrofòbica formada per 23 aminoàcids que s'extén per la membrana cel·lular, la integritat de la qual seria essencial per a la correcta transducció de senyal; **(c)** una de juxtamembrana, implicada en la modulació de les funcions del receptor, ja que en aquesta zona es troben la Thr654, diana per a la proteïna cinasa-C (PKC) i la Thr669, la fosforilació dels quals inhibeixen l'activitat cinasa del receptor (Countaway i col., 1992); i finalment, **(d)** una regió citoplasmàtica, dividida en dues regions, una de les quals conté el domini catalític, domini tirosina-cinasa, i a l'extrem carboxiterminal es troben localitzats diferents llocs d'autofosforilació: Y-992, Y-1068, Y-1086, Y-1148 i Y-1173. L'autofosforilació dóna lloc a un canvi conformacional en el domini tirosina-cinasa que permet una millor accessibilitat dels substrats al receptor ja que es produeix una obertura de la conformació del receptor (Ullrich i Schlessinger, 1990; Ferguson i col., 2003).

Per la seva banda la regió extracel·lular es subdivideix en 4 dominis (I-IV) segons el model proposat per Ullrich i Schlessinger l'any 1990 (Ullrich i Schlessinger, 1990). El domini I és el domini amino-terminal, els II i IV són els dos dominis rics en residus de cisteïna, i el domini III, estaria situat entre els dos anteriors. Estudis recents han confirmat la importància dels dominis I i III per a la unió del lligand (Ogiso i col., 2002). La estructura inactiva del EGFR està caracteritzada per una interacció intramolecular entre els dominis II i IV envoltant el "braç de dimerització" responsable de la interacció receptor-receptor. Així es manté ErbB1 en una conformació tancada per la qual els dominis I i III estan apartats (Ferguson i col., 2003).

1.2.3.3. Distribució tissular dels ErbB.

La importància dels ErbB durant el desenvolupament queda demostrada amb l'anàlisi de ratolins modificats genèticament, de fet la manca de qualsevol dels ErbB resulta letal (Olayioye i col., 2000). Més específicament, la manca de ErbB1 provoca la mort durant la fase embrionària o perinatal i els animals mostren anormalitats a múltiples òrgans com el cervell, el pulmó, el tracte

gastrointestinal i la pell (Miettinen i col., 1995). Els *Knock Out* per ErbB2 moren durant la gestació degut a una malformació de les trabècules al cor (Lee i col., 1995), fenotip compartit pels *knockout* de ErbB4 (Gassmann i col., 1995). En el cas de ErbB3 els ratolins moren durant la gestació per la deficient formació de les vàlvules cardíaques (Erickson i col., 1997).

Taula 1.2.- Expressió dels ErbB a diferents òrgans i teixits humans.

| | ErbB1 ^a | ErbB2 ^b | ErbB3 ^c | ErbB4 ^d |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Estómac | - | + | ++ | ++ |
| Fegte | ++ | - | ++ | ++ |
| Pàncrees (acinus) | ++ | - | - | + |
| Ronyó (glomerul) | - | + | - | - |
| Bronquis | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Cor | ND | - | + | ++ |
| Cortex adrenal | - | - | +++ | ++ |
| Medul·la adrenal | - | - | + | + |
| Cervell | - | - | +++ | + |
| Testicles | - | - | ++ | + |
| Ovaris | - | + | ++ | + |
| Epidermis | ++ | ++ | ++ | ++ |

Els teixits van ser puntuats amb una escala semiquantitativa basada en la intensitat del marcatge: negatiu (-); suauement positiu (+); moderadament positiu (++); fortament positiu (+++); no determinat (ND).

a, descrit per Damjanov i col·laboradors (Damjanov i col., 1986)

b, descrit per Press i col·laboradors (Press i col., 1990)

c, descrit per Pringent i col·laboradors (Pringent i col., 1992)

d, descrit per Srinivasan i col·laboradors (Srinivasan i col., 1998)

A l'organisme adult els receptors ErbB s'expressen en una gran varietat de teixits d'origen epitelial, mesenquimal i neuronal, on desenvolupen un paper fonamental en processos de desenvolupament, proliferació i diferenciació (Simon, 2000; Olayioye i col., 2000). Estudis immunohistoquímics d'expressió de proteïnes realitzats en teixits humans d'individus adults mostren com aquests receptors estan àmpliament distribuïts a l'organisme: al tracte gastrointestinal, urinari i respiratori, al sistema circulatori, endocrí, nerviós i reproductiu, i també a la pell. A la taula 1.2 es troba representada, de forma reduïda, l'expressió dels quatre membres de la família dels ErbB a diferents òrgans i teixits humans. La presència principal de uns o altres receptors als diferents teixits determinarà el tipus de senyal que es generarà, ja que cada receptor, no només difereix en el lligand que el reconeix, sinó també pels senyals intracel·lulars que genera (veure apartat 1.2.3.4.).

Al ratolí la majoria dels teixits expressen EGFR, entre altres: ronyó, intestí, cervell, tiroides, etc, on l'expressió d'aquest receptor oscil·la entre 40.000-100.000 per cèl·lula (*Carpenter i Cohen, 1979*), però és al fetge on es concentren de forma més important, fins a 400.000 molècules/cel. (*Carpenter i Wahl, 1990*), encara que altres autors augmenten aquesta xifra fins 3.000.000 molècules/cel. (*Soley i Hollenberg, 1987*). El fet que expressi elevats nivells d'aquest receptor indica la elevada importància de la senyalització a través de ErbB1 en les funcions normals d'aquest òrgan. Tot i això, la senyalització a través de l'EGFR no és necessària per a la correcta organogènesi del fetge tal i com quedava demostrat pel desenvolupament normal dels fetges de ratolins EGF-R/null (*Threadgill i col., 1995; Miettinen i col., 1995*). Recentment ha estat descrit a rata que durant la fase embrionària i neonatal s'expressa a fetge ErbB2 (*Carver i col., 2002*), que desapareix posteriorment, ja que a hepatòcits de rata adult només s'expressen ErbB1 i ErbB3 (*Carver i col., 1996; Carver i col., 1997*), indicant que l'ErbB2 seria molt important per al creixement i desenvolupament d'aquest òrgan.

Degut al fet que tots aquests receptors, i particularment ErbB1 i ErbB2, estan implicats en el procés de proliferació cel·lular i freqüentment estan sobreexpressats i/o mutats en diversos tipus de càncer, s'han convertit en una diana per a l'estudi i tractament d'aquesta malaltia (*Danielsen i Maihle, 2002; Herbst, 2004; Boulougouris i Elder, 2002; Jaumaat i Giaccone, 2003*). Actualment es coneix que el primer membre de la família, ErbB1, es troba sobreexpressat a molts i diversos tipus de càncer com en alguns càncer de mama, de prostata, de bufeta, de ronyó, de pulmó, a més de trobar-se a tumors cerebrals i de genoll (*Blume-Jensen i Hunter, 2001; Salomón i col., 1995; Yarden i Sliwkowski, 2001*). Del segon membre de la família ErbB2 està descrit que es troba sobreexpressat també a alguns càncer de mama i de pulmó, i a d'altres com el de colon, de cervix, d'endometri, d'esòfag i de pàncreas (*Blume-Jensen i Hunter, 2001; Salomón i col., 1995; Yarden i Sliwkowski, 2001*). Tot i que existeixen pocs estudis que caracteritzin ErbB3 i ErbB4 en càncer humà, s'ha descrit que ErbB3 es troba sobreexpressat a alguns càncer de mama, colon, prostata i estómac (*Blume-Jensen i Hunter, 2001; Salomón i col., 1995; Yarden i Sliwkowski, 2001*), mentre que l'últim membre d'aquesta família de receptors, ErbB4, només es troba sobreexpressat a alguns càncer de mama i als tumors de les cèl·lules granulars de l'ovari (*Yarden i Sliwkowski, 2001*).

A partir d'aquests coneixements s'han desenvolupat noves estratègies terapèutiques per al tractament d'aquestes malalties, i són bàsicament dues: **(a)** l'ús d'anticossos monoclonals dirigits al domini extracel·lular d'unió al lligand, així s'inhibeix la unió del lligand i en molts casos

s'indueix l'endocitosi del receptor (disminuïnt d'aquesta manera el nombre de receptors); o (b) l'ús de petites molècules que competeixen amb l'ATP per la unió al domini cinasa, així es bloqueja l'activació del receptor i la posterior transducció de la senyal (Rowinsky, 2004; Holbro i Hynes, 2004). Dins del grup d'anticossos desenvolupats podem destacar dos que han demostrat una elevada eficàcia i són el Cetuximab (C255 o Erbitux), que s'uneix a ErbB1, i l'Herceptina (Trastuzumab o rhumMAb 4D5), que s'uneix a ErbB2 (Yarden i Sliwkowski, 2001; Rowinsky, 2004). En quan a les molècules sintetitzades per inhibir els ErbB podem destacar dos quinazolines: el Erlotinip (Tarceva o OSI 774) i el Gefinitip (Iressa o ZD1839), el qual es troba clínicament més avançat, tots dos desenvolupats contra ErbB1 (Jaumaat i Giaccone, 2003; Roskoski, 2004).

1.2.3.4. Transducció de la senyal.

En unir EGF, el receptor dimeritza i s'autofosforila en residus tirosina específics a l'extrem carboxiterminal que serveixen com a lloc d'anclatge per proteïnes efectores (Olayioye i col., 2000; Yarden i Sliwkowski, 2001). Aquestes interaccions del receptor d'EGF amb les proteïnes efectores, són el punt de partida per diferents cascades de transducció de senyal (representades a la figura 1.5), les més importants de les quals són:

- i. Activació directa de la fosfolipasa- $C\gamma$ (PLC- γ), la qual genera inositol-1, 4, 5-trisfosfat (IP3), que permet la mobilització de calci des del reticle endoplasmàtic, i diacilglicerol (DAG) que juntament amb el calci activaran la proteïna cinasa-C (PKC) que dóna lloc als efectes mitogènics (Raper i col., 1987).

- ii. Activació directa de la cascada de les MAP-cinases (la via de transducció més important): la proteïna adaptadora Grb2 unida al receptor activat de l'EGF, atrau a la proteïna Sos cap a la membrana plasmàtica (Li i col., 1993) on activen a la proteïna Ras pel bescanvi de GDP per GTP. Posteriorment Ras s'uneix a la Ser/Thr-cinasa Raf-1 activant finalment la cascada de les MAP-cinases (proteïnes activadores de la mitogènesi o proteïnes cinases associades a microtúbuls) (Davis, 1993). Shc també podria unir-se a Grb2 a l'inici de la cascada de senyalització. Aquesta proteïna conté uns dominis anomenats CH1 i CH2 (dominis homòlegs a col.làgen) que indicarien una via de transducció diferent de Ras (Bonfini i col., 1996).

iii. Activació indirecta de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), quan heterodimeritza amb ErbB3 i ErbB4. La subunitat reguladora, p85, s'associa a aquests receptors, però no a ErbB1, i activarà així a la subunitat catalítica, p110 (Olayioye i col., 2000).

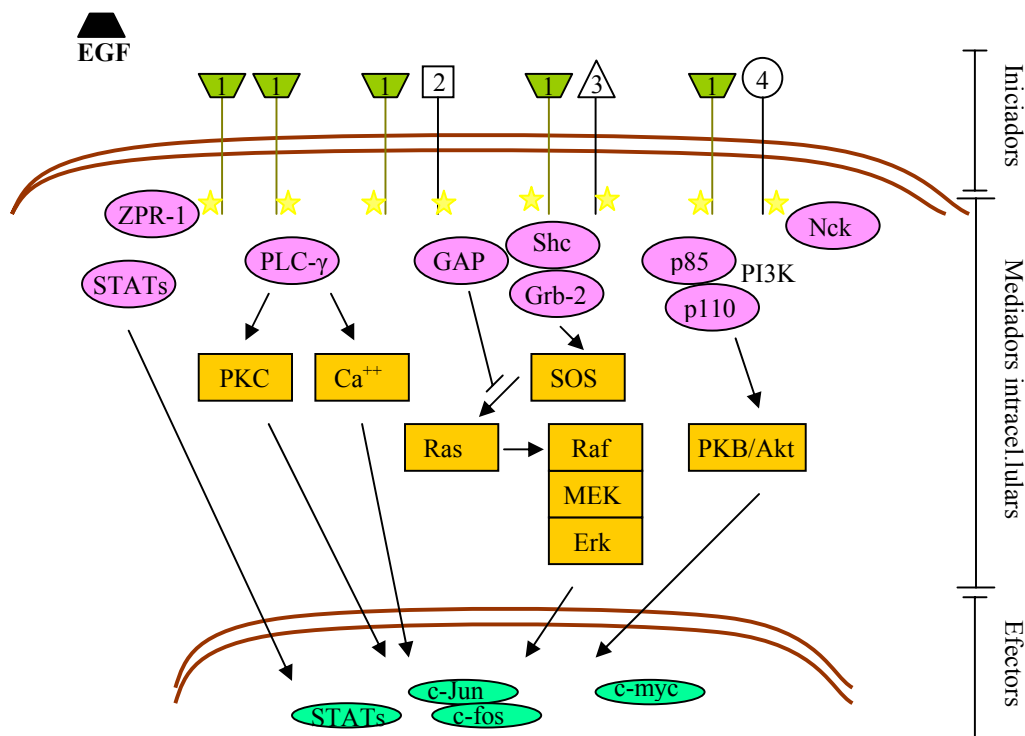


Figura 1.5.- Esquema reduït de les vies de transducció de senyal a través de l'EGFR. La unió de l'EGF al seu receptor, ErbB1, provoca la formació de homodímers o heterodímers amb altres membres de la família (ErbB2, ErbB3 i ErbB4), i la transducció de senyal a través de diferents proteïnes cap al nucli. Adaptat de Jorinssen i col·laboradors (Jorinssen i col., 2003) i Holbro i Hynes (Holbro i Hynes, 2004).

A banda d'aquestes cascades, existeixen algunes proteïnes que es troben associades directament al EGFR quan aquest està inactiu, i només són activades o translocades a una altra localització cel·lular quan uneix el seu lligand. Aquest és el cas de la proteïna ZPR-1 (*zinc-binding protein*) (Galcheva-Gargova i col., 1996) i els factors de transcripció STAT (Olayioye i col., 1999; Xia i col., 2002;).

L'associació entre les regions tirosina fosforilades i les proteïnes efectores, proteïnes adaptadores o enzims, té lloc a través de dominis SH2 (homòleg a Src-2), d'uns 100 aminoàcids (Songyang i col., 1993) o a través dels dominis SH3 (60-85 aminoàcids), que reconeixen seqüències

curtes i riques en prolina (*Kuriyan i Cowburn, 1997*). En determinats casos, la unió de les proteïnes al receptor, via SH2, dóna lloc a la fosforilació i a un canvi conformacional d'aquestes proteïnes (GAP i PLC- γ). Però per altres proteïnes que no tenen domini catalític (Grb2, p85, Nck i Shc) funcionen com a adaptadors que permeten la interacció entre el receptor activat i els altres intermediaris, a través de dominis SH2 i SH3 (*Schlessinger, 2000; Yarden i Sliwkowski, 2001; Holbro i Hynes, 2004*).

La unió de l'EGF al seu receptor inicia per una banda la transducció de senyal pel citoplasma i també el tràfic del receptor que el relocalitza a la superfície cel·lular i dins del compartiments intracel·lulars. Els EGFRs estan localitzats a uns microdominis de membrana plasmàtica que s'anomenen caveoles (*Smart i col., 1999*). S'ha estimat que la quantitat de EGFR a les caveoles representa d'un 40 a un 60% del total de la població present a la membrana (*Mineo i col., 1999*). Un cop uneix l'EGF, es produeix una migració dels receptors cap a unes zones riques en clatrina on es produeix una ràpida internalització del receptor a través de vesícules recobertes (*Sorkin i Waters, 1993; Carpenter, 2000*). Després de la internalització els complexos van a parar a endosomes primaris. Durant el tràfic pel compartiment endosomal els receptors poden reciclar-se cap a la superfície o dirigir-se cap als endosomes tardans i lisosomes, on tant l'EGF com el receptor són proteolíticament degradats (*Sorkin i Waters, 1993; Carpenter, 2000*). Aquest fet explica la forta disminució d'ErbB1 en la superfície cel·lular després de la unió del lligand, que no s'observa a altres ErbB (*Olayioye i col., 2000*).

Per al procés de internalització d'ErbB1 es requereixen proteïnes amb activitat tirosina-cinasa a l'interior cel·lular que interaccionen amb determinades seqüències del receptor (*Schlessinger, 2003*), com l'AP-2 (de proteïna adaptadora), que és un complex proteic associat a la clatrina de la membrana plasmàtica. Per a la unió a l'AP-2 i posterior internalització és necessari que l'EGFR estigui autofosforilat, per aquest motiu la tirfostina AG-1478 (inhibidor específic de l'activitat tirosina-cinasa de l'ErbB1) pot bloquejar totalment aquest procés (*Carpenter, 2000*). Posteriorment una altra proteïna és l'encarregada de dirigir EGFR cap als lisosomes: la SNX-1 (*sorting nexin-1*) (*Dikic, 2003*).

Tot i que la transducció de la senyal comença a nivell de la superfície cel·lular, aquest fenomen no queda restringit a aquest compartiment ja que existeixen evidències de que a través dels receptors situats al compartiment endosomal també té lloc la transducció de la senyal (*Baass i col., 1995; Sorkin, 2001*).

El receptor d'EGF no forma únicament homodímers EGFR-EGFR, sinó que també es formen heterodímers entre el receptor de l'EGF i membres de la mateixa família (*Riese i Stern, 1998*). Aquest fet és important perquè la cascada de senyalització activada pels diferents dímers és diferent. Per exemple, ErbB1-ErbB2 s'associen a un senyal més fort que al provocat per ErbB1-ErbB1 (*Grans-Porta i col., 1997*). I encara que els 4 membres de ErbB tenen potencial per estimular la cascada de cinases Raf-MEK-ERK (*Jorinssen i col., 2003; Citri i col., 2003; Carpenter, 2003*), en canvi la fosfolipasa-C γ (PLC- γ) s'uneix només a ErbB1, mentre que p85 (subunitat reguladora de la PI3K) s'uneix a fosfotirosines específiques de ErbB3 i ErbB4. Degut al fet que les diferents línees cel·lulars expressen almenys 3 dels 4 tipus de receptors, implicaria una competició entre els receptors per a la formació dels diferents dímers (*Tzahar i col., 1996*).

1.2.4. Efectes biològics de l'EGF.

L'EGF, en tant que és un factor de creixement, el principal efecte que produeix és la inducció o estimulació de la proliferació cel·lular; però a banda d'aquest, actua també sobre una gran varietat de processos fisiològics i metabòlics que poden estar o no relacionats amb la seva acció mitogènica. En aquest apartat només farem una breu referència als efectes biològics més ben descrits per l'EGF sobre l'organisme, però en parlarem de forma més extensa dels efectes de l'EGF sobre el fetge.

Els diferents efectes provocats per l'EGF són de vital importància no només a l'animal adult, sinó també durant el període de gestació, ja que una deficiència d'EGF durant aquest període incrementa el percentatge d'avortaments (*Tsutsumi i Oka, 1987*) i també s'ha descrit que l'administració d'EGF a rates gestants provoca una acceleració en el creixement del fetus (*Jansson i Skarland, 1990*). A més els experiments realitzats amb animals *Knock Out* per EGFR, dirigits a l'estudi més acurat de la funció d'aquest receptor (*Hom i col., 1998; Sebastian i col., 1998*), han mostrat la importància de l'EGF durant l'etapa neonatal, ja que els animals moren poc després del naixement.

S'han descrit nombrosos efectes de l'EGF a diferents teixits i òrgans. Els primers efectes biològics coneguts de l'acció de l'EGF es van descriure a l'**epidermis**, ja que induïa l'obertura prematura de les parpelles i l'erupció avançada dels incisius en ratolins nous. Aquest fet era conseqüència d'un increment del gruix i de la queratinització de l'epidermis (*Cohen, 1962*;

Cohen i Elliot, 1963). Posteriorment a l'animal adult s'ha descrit que l'EGF intervé en el manteniment del gruix de l'epidermis (*Tsutsumi i col. 1987*) així podria tenir un paper terapèutic per a la cicatrització de les ferides. En humans, l'EGF que s'allibera des de les plaquetes després de que es produeixi una ferida produeix un augment de la divisió cel·lular i síntesi de DNA, migració cel·lular, increment de la deposició de matriu extracel·lular i síntesi de col·làgena, etc, dirigides totes aquestes respostes al tancament de la ferida (*Bennett i Schultz, 1993*). Recentment s'ha descrit que l'ús terapèutic de gels amb EGF poden prevenir la formació anormal de col·làgena a les ferides, tenint així un efecte beneficiós per a la seva correcta cicatrització (*Babul i col., 2004*).

En el **tracte digestiu**, s'ha descrit un efecte citoprotector de l'EGF. Influeix en el desenvolupament, maduració, citoprotecció, i regulació de les secrecions del tracte gastrointestinal (*Fisher i Lakshmanan, 1990*). A nivell de jejú s'ha demostrat, mitjançant estudis realitzats en ratolí i en conill, que l'EGF contribueix a la regulació del transport intestinal ja que incrementa l'absorció de l'aigua, Na⁺, Cl⁻ i glucosa (*Bird i col., 1994*). La funció citoprotectora és la més ben definida de l'EGF al tracte digestiu. L'anàlisi d'animals sialoadenectomitzats permet observar com incrementa la susceptibilitat de la mucosa a lesions induïdes per HCl, etanol, aspirines, sals biliars i per l'estrès, i com es retarden el tancament de les úlceres (*Allen i col., 1993*). En rates s'ha descrit que l'estrès provoca un alliberament de l'EGF per la qual causa aquest factor és més abundant en la llum gàstrica (*Konturek i col., 1991*); així inhibiria la secreció àcida gàstrica, estimularia la proliferació de la mucosa i la protegiria de possibles ulceracions.

En el **teixit adipós blanc** s'ha demostrat que l'EGF exerceix un efecte dual, ja que per una banda estimula la proliferació i bloqueja la diferenciació dels preadipòcits en cultiu (*Serrero, 1987*) i "in vivo" (*Serrero i Mills, 1991*), mentre que en adipòcits diferenciats, aquest factor de creixement promou l'acumulació de lípids. Aquest últim efecte és degut a que l'EGF, a l'igual que la insulina, augmenta l'activitat acetilCoA-carboxilasa, estimula la lipogènesi (*Haystead i Hardie, 1986*), i, per altra banda, interfereix la resposta lipolítica de les catecolamines (*Tebar i col., 1993*; *Tebar i col., 1996*).

S'han descrit altres efectes provocats per l'EGF, a banda dels anteriorment detallats. L'EGF pot actuar directament sobre el **sistema nerviós central (SNC)** ja que a la glàndula pituïtària produeix un increment de la secreció de l'hormona luteilitzant (LH), de l'adrenocorticotropina (ACTH) i de prolactina (*Luger i col., 1988*), i en glàndules adrenals estimula la síntesi de cortisol (*Carpenter i Walh, 1990*). A més actua com a factor de supervivència per les

neurones del sistema nerviós central (*Plata-Salaman, 1991; Mazzoni i Kenigsberg, 1992*). Per altra banda, també han estat descrits importants efectes de l'EGF a nivell de l'**aparell reproductor**. Sobre el sistema reproductor masculí s'ha observat que a les cèl·lules de Leydig "in vitro" l'EGF estimula la producció de testosterona (*Syed i col., 1991*).

L'EGF pot afectar al **comportament** natural desenvolupat per animals nocturns com els hámsters i els ratolins. Kramer i col·laboradors (*Kramer i col., 2001*) van observar que l'EGF bloquejava l'activitat locomotora (*running-wheel activity*). Aquest bloqueig també era produït pel TGF- α , mostrant així la rellevància dels lligands de ErbB1 sobre aquest tipus de comportament. Però recentment s'ha descrit que aquest mateix efecte pot ser produït per un altre membre de la família de l'EGF, la neuregulina-1 (NRG-1) (*Snodgrass-Belt i col., 2005*), indicant que les respostes comportamentals no són controlades exclusivament pels lligands de ErbB1, sinó que la regulació és molt més complexa.

1.2.4.1. Efectes de l'EGF en el fetge.

Molt importants són els efectes que l'EGF produeix en el fetge on té un considerable efecte mitogènic i on també participa de la regulació de diferents vies metabòliques.

L'EGF estimula la síntesi de DNA i la proliferació d'hepatòcits adults i de nounats "in vitro", i provoca hipertròfia i hiperplàsia en fetges de rata "in vivo" (*Marti i col., 1989*). En estudis realitzats amb nounats de conill, l'administració d'EGF fa incrementar el pes del fetge, el contingut de DNA i la concentració de proteïnes; augmenta el flux biliar i l'excreció de sals bilials (*Opleta i col., 1987*). El potent efecte mitogènic de seguida va portar a investigar la participació de l'EGF en la regeneració hepàtica.

La regeneració hepàtica és un procés molt ben coordinat en el qual participen citocines (*Selzner i col., 2003*), comitògens i factors de creixement (*Fausto i col., 1995*). L'estudi dels esdeveniments que tenen lloc després de la pèrdua de massa hepàtica provocada per l'hepatectomia parcial ha permès identificar dues fases (*Fausto, 2000*): (1) la transició dels hepatòcits quiescents cap a l'activació del cicle cel·lular (*priming*), i (2) la progressió cap al punt de restricció de la fase G1 del cicle. La fase de *priming* estaria sota el control de les citocines i la segona estaria governada pels factors de creixement, entre ells l'EGF. Però anteriorment ja havia estat descrita la importància de l'EGF com a senyal actiu durant l'entrada de la cèl·lula en G1 (*Michalopoulos, 1990*). Després

d'una hepatectomia parcial els EGFR s'activen i disminueix el nombre de receptors a la membrana molt ràpidament (*Rubin i col., 1982*), l'EGF actuaria en aquestes etapes inicials, i posteriorment actuaria un altre lligand com el TGF- α (*Michalopoulos i DeFrances, 1997*).

Noguchi i col·laboradors van descriure que després d'una hepatectomia parcial augmenten els nivells d'EGF en plasma i disminueixen en les glàndules submaxil·lars (*Noguchi i col., 1991*). Els responsables d'aquest increment al torrent circulatori poden ser: la secreció per part de la glàndula (provocada per l'adrenalina alliberada per la intervenció), i la pròpia pèrdua de massa hepàtica (impedint, en part, la seva eliminació de plasma). Aquests mateixos autors van observar com la sialoadenectomia retardava el pic de síntesi de DNA després de l'hepatectomia parcial fins a les 24 hores. Però l'EGF que actua a fetge no només prové de la secreció endocrina de les glàndules submaxil·lars, també ha estat descrita una certa activitat paracrina de l'EGF al fetge (*Mullhaupt i col., 1994*), ja que es detecta la síntesi de RNAm d'EGF i del seu pèptid en aquest teixit després d'una hepatectomia parcial. El fetge regenerant reté 3 vegades més EGF que un fetge control, disminueix el transport i la degradació lisosomal; i també incrementa el percentatge de complexos EGF-receptor que deriven cap al nucli (*Raper i col., 1987*).

Estudis recents han mostrat com altres lligands de ErbB1 com l'HB-EGF (*Kiso i col., 2003*) i l'amfíregulina (*Berasain i col., 2005*) intervenen també en les fases inicials de la regeneració hepàtica. Aquesta redundància en l'actuació dels diferents factors de creixement resulta una garantia per a una correcta regeneració hepàtica davant la possible manca de qualsevol d'ells. Així queda demostrat als ratolins TGF- α /null en els quals es detecta un augment compensatori de l'EGF després d'una hepatectomia parcial (*Russell i col., 1996*).

Entre els efectes metabòlics provocats per l'EGF podem destacar que aquest factor de creixement activa la gliconeogènesi d'una forma ràpida i transitòria tant en fetges perfosos (*Rashed i Patel, 1991*) com en hepatòcits aïllats de ratolins dejunats (*Soley i Hollenberg, 1987*) i de rates dejunades (*Soler i Soley, 1993*), requerint la presència de calci. La transitorietat d'aquest efecte és degut a que l'EGF, de forma contrària a les catecolamines, no activa la lipòlisi endògena en els hepatòcits d'animals dejunats necessària per tal que existeixi una assequibilitat d'àcids grassos endògens que permetin l'efecte continuat de la gliconeogènesi (*Soler i Soley, 1993*). Els estudis amplis i complexos de Soler (*Soler, 1991*) porten a la conclusió que els efectes de l'EGF sobre la gliconeogènesi no tenen tant sentit metabòlic (aport de glucosa a la sang) com estan relacionats amb el conjunt d'efectes de l'EGF en els hepatòcits, especialment els mitogènics.

Per altra banda també afecta al metabolisme del glicogen ja que estudis realitzats en hepatòcits aïllats de rata (*Quintana i col., 1995*) i ratolí (*Grau i col., 1996*) indiquen que l'EGF té un efecte glicogenolític. Grau i col·laboradors van demostrar que aquest efecte era produït per un augment de l'activitat de la glicogen fosforilasa a, com a conseqüència d'un increment de la concentració de calci a l'interior de la cèl.lula (*Grau i col., 1996*); en contrast amb l'acció produïda per les clàssiques hormones glicogenolítiques (adrenalina i glucagó), l'EGF no inhibeix la glucòlisi, sinó que, contràriament, incrementa el flux glicolític per una major assequibilitat de la glucosa-6-fosfat (G-6-P) (*Quintana i col., 1995*). Aquest efecte glicogenolític s'observa també "in vivo" (*Grau i col., 1996*).

S'ha observat que l'EGF estimula la via de les pentoses fosfat en hepatòcits aïllats de rata, mitjançant l'activació de l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G-6-PDH) (*Conricode i Ochs, 1990*), creant-se així les riboses fosfat necessàries per a la síntesi de DNA i també poder reductor per a la síntesi d'àcids grassos (necessaris per formar els fosfolípids de les membranes). En hepatòcits aïllats l'EGF estimula la síntesi dels àcids grassos, a través d'un increment de la fosforilació de l'acetilCoA-carboxilasa (*Holland i Hardie, 1985*). També incrementa la fosforilació d'un altre enzim d'aquesta mateixa via, com és l'ATP citrat-liasa.

Igual que els efectes de l'EGF sobre la gliconeogènesi, els estudis de Quintana (*Quintana i col., 1995*) i Grau (*Grau, 1996*) en el nostre laboratori, així com els d'altres laboratoris, en relació a l'efecte de l'EGF sobre el metabolisme del glicogen i la lipòlisi, porten a la conclusió que tots aquests efectes de l'EGF s'entenen millor en el context de l'acció d'aquest pèptid en el fetge, que en l'estrictament metabòlic.

1.3. L'EGF I L'ESTRÈS.

1.3.1. Concepte d'estrès.

L'estrès és un terme amb el qual estem molt familiaritzats actualment, i per tant pot semblar un concepte relativament modern, però ja va ser introduït a principis del segle passat per

Walter B. Cannon, primer, i desenvolupat per Hans Selye, després. Malgrat això definir-lo, en termes rigurosament científics, ha resultat una tasca altament problemàtica.

L'estrès és un concepte molt ampli que inclou, no només tot un conjunt de canvis provocats per l'acció d'una ampla varietat d'estímuls que poden afectar a la integritat de l'organisme, és a dir, entendre l'estrès com a resposta (*efecte*), sinó que també dins d'aquest concepte queden englobats els agents que modifiquen aquesta integritat, és a dir, els estímuls estressants (*causes*). Per aquest motiu a continuació parlem per separat de l'estrès com a resposta i de la classificació dels diferents agents causants d'estrès o estímuls estressants. L'estrès s'entén, en termes generals, com un estat que amenaça l'homeòstasi de l'organisme (*Stratakis i col., 1995*).

Cannon va ser el primer en introduir el concepte d'homeòstasi durant els seus estudis realitzats la primera meitat del segle XX. Va postular que l'exposició a diferents estímuls podien afectar a l'homeòstasi de l'organisme, provocant diferents canvis fisiològics i psicològics, i que era el sistema simpàtic la primera línia de defensa davant aquests agents (*Cannon i Paz, 1911; Cannon, 1914; Cannon, 1929*). Amb posterioritat va ser Hans Selye qui va enunciar més acuradament el terme d'estrès o “*síndrome d'estrès*” com: “resposta no específica de l'organisme davant qualsevol esdeveniment nociu que l'afecta” (*Selye, 1936*). Va ser ell qui va estendre les nocions d'homeòstasi de Cannon perquè va incloure les respostes mediades per l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) i altres respostes hormonals (*Kopin, 1995*).

Des d'aleshores s'han realitzat nombrosos estudis en aquest àmbit per tal d'elaborar una definició exacte del concepte d'estrès, i són moltes les definicions que podem trobar a la bibliografia, però encara avui dia cap d'elles no ha rebut un consens generalitzat entre els investigadors. Tot i això, degut al fet que la resposta a estrès ha estat una resposta evolutiva positiva, una definició de l'estrès que és altament acceptada va ser la postulada per Vigas l'any 1980 (*Vigas, 1980*). Segons Vigas l'estrès seria la resposta de l'organisme, desenvolupada al llarg de la filogènia, als agents que de forma simbòlica o real posen en perill la seva integritat.

En biomedicina, el terme d'estrès es refereix a les situacions en les quals una determinada experiència produeix un augment de glucocorticoides i de catecolamines (*McEwen, 2000*), i aquesta és, potser, la definició més indicada en el nostre cas, degut al tipus d'estudi que hem desenvolupat en aquest treball.

Actualment es coneixen els centres, vies i neurotransmisors implicats en aquesta resposta a l'estrès. Amb independència de l'agent inductor l'estrès suposa tant l'activació sistema nerviós simpàtic medul·lo-adrenal (SMA) com l'eix hipotàl·lem-hipòfisi-corticoadrenal (HPA) (*Stratakis i col., 1995*). La intensitat amb la que ambdós sistemes s'activen depèn, a més de la intensitat de l'estímul, dels mecanismes necessaris que la poden modular (*Kopin, 1995*). Però malgrat que existeixen tota una sèrie de reaccions perfectament coordinades dirigides a recuperar l'homeòstasi de l'organisme, en ocasions aquesta resposta no està totalment controlada. Els mediadors de la resposta estressant (catecolamines i glucocorticoides) són els responsables de promoure els canvis fisiològics i metabòlics per tal de protegir l'organisme, però també cal que aquests canvis desapareguin quan ja no siguin necessaris (*McEwen, 2000*). Per aquest motiu quan aquesta operació d'activació/inactivació de la resposta a l'estrès és ineficient es poden produir tot un conjunt de disfuncions fisiològiques i psicològiques que nosaltres podem analitzar: ansietat i depressió (*Halbreich, 1987*), disfuncions neuroendocrines (*Sapolsky, 1992*) i cardiovasculars (*Bohus i Koolhaas, 1993; Steptoe, 1993*) i també s'augmenta la susceptibilitat a malalties mediades pel sistema immune (*Munck i col., 1984*).

Una última consideració a tenir en compte quan estudien la resposta a l'estrès, és el fet que existeixen moltes diferències individuals a l'hora d'interpretar i respondre a un determinat estímul estressant, i que són conseqüència d'una determinada predisposició genètica i ambiental (*McEwen, 2000*). Per aquest motiu és molt important considerar aquest fet a l'hora de dissenyar els experiments i interpretar els resultats.

1.3.2. Estímuls estressants.

Resulta molt difícil l'elaboració d'una única classificació dels estímuls estressant ja que sovint és complicat identificar el component principal que caracteritza a l'estímul estudiat. I depenent de les característiques de cada estímul o agent estressant, les rutes implicades en l'activació de la resposta i el patró final d'aquesta serà diferent (*Kopin, 1995*).

Malgrat aquest fet una classificació molt extesa en va ser la postulada per Herman i Cullinan (*Herman i Cullinan, 1997*). Segons ells els estímuls estressants es poden classificar en dos grans grups: aquells estímuls que actuen a través de centres que connecten directament amb el nucli paraventricular de l'hipotàl·lem (NPV), i altres que necessiten d'una elaboració de la informació a estructures superiors del sistema nerviós central (SNC) i semblen ser canalitzades a través de les

estructures límbiques. Els primers es coneixen amb el nom d'estímuls *sistèmics* o *físics*, els segons es coneixen com a estímuls *emocionals*. Un exemple d'estímuls emocionals són els provocats per l'estrès social (derrota social, aïllament social, etc.), mentre que entre els estímuls físics podem trobar l'exposició a endotoxines o l'administració de citotòxics.

Aquesta classificació però, no es sempre adequada ja que ens podem trobar davant d'algunes situacions que tenen components d'ambdós tipus d'estímuls, per exemple existeixen estímuls emocionals com són la immobilització, la restricció de moviment (*restraint*) o l'exposició a determinats sorolls, que tenen un elevat component físic. Així encara podríem parlar de la existència d'un possible tercer grup d'estímuls estressants *mixtes* (Vallés-Sánchez, 2002; Dal Zotto, 2002).

Tal i com s'ha indicat a l'apartat anterior (apartat 1.3.1) un altre factor a tenir en compte a l'hora d'estudiar la resposta a l'estrès és la intensitat de l'estímul que el provoca (Kopin, 1995), ja que la magnitud de la resposta dependrà de la forma com l'organisme hi és exposat. Aquest fet permet elaborar un altre tipus de classificació en la qual els estímuls no es diferencien qualitativament sino quantitativament. Així parlarem d'*estímuls aguts* provocats per una exposició que pot durar de segons a hores i *estímuls crònics*, els quals poden ser *crònics intermitents* (si l'estímul es repeteix discretament i diàriament durant un determinat nombre de dies) i *crònics continus* (si l'exposició es continua i prolongada) (Martí i Armario, 1998).

1.3.3. Organització funcional dels eixos implicats en la resposta a l'estrès.

En resposta als diferents estímuls estressants es produeix l'activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) i també el sistema nerviós simpàtic (SNS), separable funcionalment en els nervis simpàtics (NS) i el sistema simpàtic medul·lo-adrenal (SMA). Com a conseqüència de l'activació d'aquests eixos es produeix l'alliberació de glucocorticoides (del còrtex adrenal via HPA), adrenalina (de la medul·la adrenal via simpàtica) i de noradrenalina (procedent de la medul·la adrenal i de les terminacions simpàtiques). L'activació d'un d'ells implica l'activació de l'altre, perquè funcionalment estan interrelacionats: existeixen projeccions de les neurones secretores de CRH del nucli paraventricular (NPV) de l'hipotàl·lem cap al *locus ceruleus* (LC) (Willenberg i col., 2000), i per altra banda projeccions de les neurones catecolaminèrgiques que viatgen des del LC cap al NPV (Elenkov i col., 2000).

Si bé és cert que independentment de les característiques particulars dels estímuls estressants, aquests provoquen l'activació del sistema nerviós central (SNC), la resposta final que podem detectar és molt específica de l'estímul que la provoca. Això és degut al fet que cada agent activa preferentment una de les vies anteriorment citades produint diferents increments d'adrenalina, de noradrenalina o de ACTH. Per exemple, l'augment d'adrenalina en plasma després de l'administració de insulina (3.0 UI), que s'injecta per induir hipoglucèmia, predomina sobre la noradrenalina o ACTH, coherent amb l'efecte homeostàtic de la adrenalina per tal d'antagonitzar l'efecte de la insulina i provocar l'alliberació de glucosa des del fetge (*Kopin, 1995*). A la taula 1.3 podem observar altres exemples de com l'acció de diferents estímuls estressants activen cadascuna d'aquestes vies.

Taula 1.3 .- Resposta a diferents estímuls estressants de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA), sistema medul·lo-adrenal (SMA) i els nervis simpàtics (NS).

| Condicció | HPA | SMA | NS |
|---------------------------------|------|------|------|
| Exposició fred amb hipotèrmia | + | ++ | ++++ |
| Exposició fred sense hipotèrmia | 0 | + | +++ |
| Exercici | + | ++ | +++ |
| Privació de glucosa | +++ | ++++ | + |
| Immobilització (rates) | ++++ | ++++ | ++++ |
| Cirurgia | + | + | ++ |

Les diferents intensitats s'indiquen de 0 a +++++. Existeixen generalment més associació entre HPA i SMA, que entre SMA i NS. Adaptat de Goldstein (*Goldstein, 2003*).

1.3.3.1. Activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA).

L'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) és un dels principals sistemes involucrats en la resposta de l'organisme davant els estímuls estressants, i són molt els estudis que s'han realitzat per tal d'aclarir perquè els glucocorticoides, efectors finals induïts per l'activació d'aquest eix, són tan importants en la resposta a l'estrès.

En resposta als estímuls estressants les neurones del nucli paraventricular (NPV) de l'hipotàl·lem sintetitzen i alliberen l'hormona alliberadora de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*, CRH), juntament amb vasopresina (arginina vasopresina, AVP), entre altres neuropèptids (*Cullinan i col., 1995; Dallman., 1993; Johnson i col., 1992*). Però el CRH, pèptid de 41 aminoàcids (*Vale i col., 1981*), és la principal molècula de l'eix HPA produïda en resposta a l'estrès (*Antoni, 1986*). Un cop sintetitzat, el CRH viatja a través de les projeccions axòniques des

del NPV fins a la làmina externa de l'eminència mitjana (EM) on s'allibera a uns capil·lars especialitzats que van a parar a la pituitària anterior o adenohipòfisi. Allà el CRH interacciona amb receptors específics acoblats a proteïnes-G (CRF-R1) situats a la superfície de les cèl·lules corticotropes (Miller i O'Callaghan, 2002). Aquesta unió provoca la estimulació de la síntesi i posterior proteolisi de la pro-opiomelanocortina (POMC), precursor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) i altres pèptids neuroactius (Vale i col., 1981; Turnbull i Rivier, 1997). Finalment l'alliberació d'aquesta hormona indueix fortament la secreció de glucocorticoides des de la zona fasciculata del còrtex adrenal conjuntament amb mineralocorticoides i andrògens adrenals des d'altres zones de l'escorça adrenal (Miller i O'Callaghan, 2002; Charmandari i col., 2005). A la figura 1.6 queda representada com es produeix l'activació de l'eix HPA i l'alliberació dels glucocorticoides des de l'escorça adrenal.

Els glucocorticoides, efectors finals de l'eix HPA, són hormones pleiotròpiques que exerceixen els seus efectes a través dels seus receptors intracel·lulars distribuïts ubiqüament (Munck i col., 1984; Bamberger i col., 1996; Kino i Chrousos, 2001). La seva alliberació està regulada per mecanismes de retroinhibició, que actuen a nivell de l'hipòfisi, l'hipotàl·lem i l'hipocam, inhibint la seva pròpia secreció (Johnson i col., 1992; De Kloet i col., 1993; Tresguerras i col., 2000) perquè així limiten la exposició de l'organisme a ells mateixos i minimitzen els seus efectes catabòlics, lipogènics, antireproductius i immunosupressors d'aquestes hormones (Charmandari i col., 2005). Els glucocorticoides exerceixen les seves accions un cop són alliberats a la circulació general via venes medul·lars des del còrtex adrenal. Però també es poden alliberar a l'àrea medul·lar de la pròpia adrenal, via sang sinusoïdal. Aquesta alliberació local de corticosteroides permet un control hormonal de l'adrenalina, ja que queda regulat l'enzim responsable de la conversió de noradrenalina a adrenalina (Rosol i col., 2001).

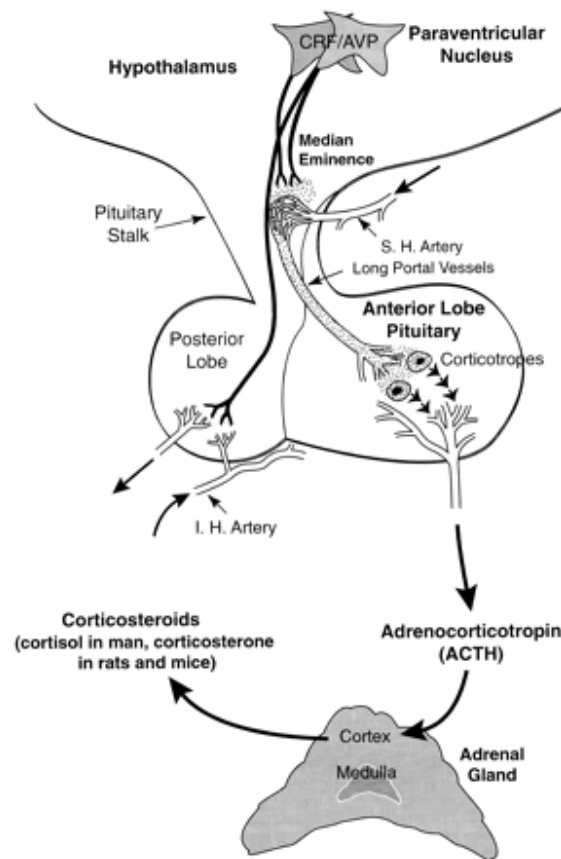


Figura 1.6.- Anatomia funcional de l'eix hipotàlem-pituitària-adrenal (HPA). AVP, arginina vasopresina; CRF/CRH, factor alliberador de corticotropina; I.H., hipofisi inferior; S.H., hipofisi superior. Adaptat de Turnbull i Rivier (*Turnbull i Rivier, 1999*).

1.3.3.2. Activació del sistema nerviós simpàtic (SNS).

El sistema nerviós simpàtic (SNS) i l'eix hipotàlem-pituitària-adrenal (HPA) són elements essencials per a mantenir l'homeòstasi però no només quan es veu amenaçada per l'acció dels agents estressants sino també en condicions basals. En condicions de repòs les catecolamines regulen el metabolisme energètic, el ritme cardíac, la pressió sanguínia i la termogènesi (*Elenkov i col., 2000*).

Actualment es coneix que l'activació aguda del sistema nerviós simpàtic provocada pels diferents estímuls estressants s'inicia a les neurones catecolaminèrgiques del *locus ceruleus* (LC) situada a l'escorça cerebral (*VanTallie, 2002; Miller i O'Callaghan, 2002*). Des d'aquest nucli les fibres eferents surten del sistema nerviós central (SNC) pels nervis toràcics i lumbar (conegut com sistema toraco-lumbar). La majoria d'aquestes fibres finalitzen en ganglis localitzats al llarg de

la medul·la espinal. D'aquí surten unes altres fibres anomenades post-ganglionars que van a parar als diferents òrgans inervats. Aquestes terminals simpàtiques s'anomenen noradrenèrgiques perquè alliberen noradrenalina (NA). Per altra banda la inervació que arriba directament a la medul·la adrenal, via fibres pre-ganglionars i que tenen com a neurotransmissor l'acetil-colina, provoca l'alliberació de adrenalina (A) i, en menor proporció, de noradrenalina (NA) (relació 4:1) cap a la circulació sanguínia (Elenkov i col., 2000). L'activació del SNS es troba representada a la figura 1.7.

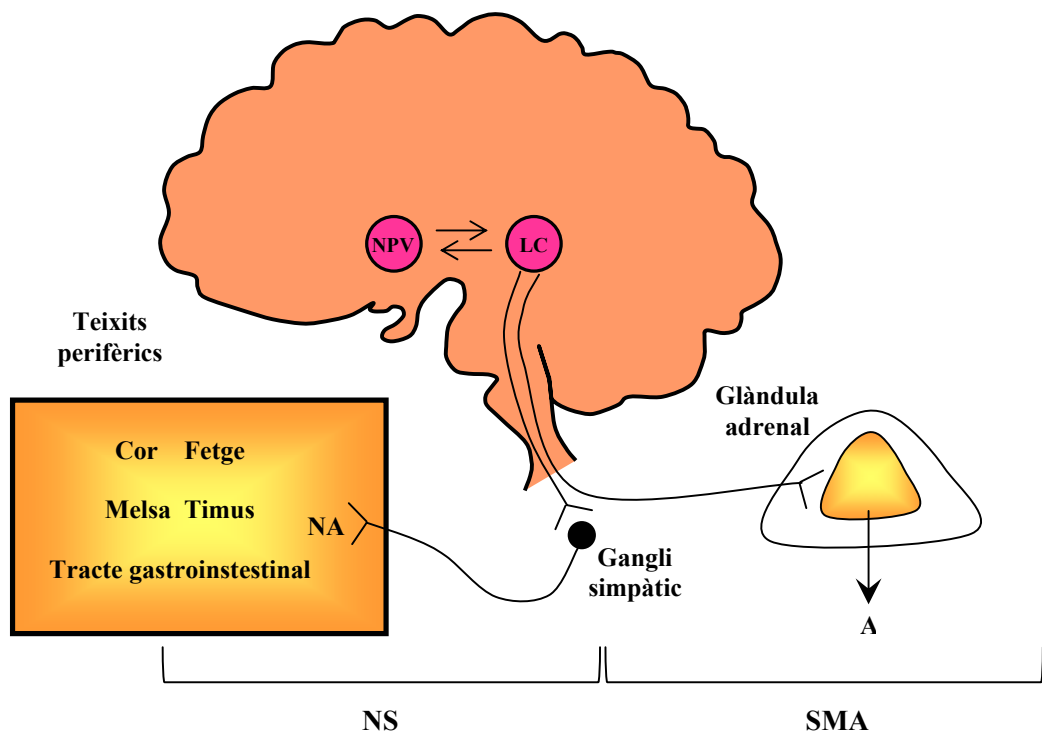


Figura 1.7.- Anatomia funcional del sistema nerviós simpàtic (SNS). El sistema nerviós simpàtic és funcionalment separable en els nervis simpàtics (NS) i el sistema nerviós simpàtic medul·lo-adrenal (SMA). NPV, nucli paraventricular; LC, locus ceruleus; A, adrenalina; NA, noradrenalina. Adaptat de Elenkov i col·laboradors (Elenkov i col., 2000).

Durant dècades, degut als experiments realitzats amb rates, es creia erròniament que l'adrenalina circulant actuava directament sobre la glàndula pituïtària controlant així l'alliberament de l'hormona adrenocorticotropa (ACTH). Segons aquesta hipòtesi en la resposta a l'estrès l'adrenalina alliberada des de l'adrenal era el primer pas que controlava la secreció de l'ACTH (Wurtman, 2002). Però posteriorment experiments realitzats en humans no van poder demostrar cap efecte consistent entre l'adrenalina i la secreció de l'ACTH. Per aquest motiu, avui en dia ja no es creu que l'adrenalina controli la secreció final de glucocorticoides mentre que sí que ha estat

demostrat que aquestes hormones controlen tant la síntesi com la secreció d'adrenalina (*Wurtman i Axelrod, 1965; Pohorecky i Wurtman, 1971*).

1.3.4. Efecte de les catecolamines i de l'estrès sobre la secreció d'EGF.

Són varies les hormones que influeixen en l'acumulació d'EGF a les glàndules submaxil·lars (veure apartat 1.2.2.). Només unes però estimulen la ràpida secreció d'EGF tant cap a la saliva com cap a la sang, són les catecolamines. Fou ja al 1974 quan Byyny i col·laboradors (*Byyny i col., 1974*) van observar que l'administració d'un agonista α_1 -adrenèrgic, provocava l'augment de la concentració d'EGF al plasma. Molts anys després Tuomela (*Tuomela, 1990*) primer, i Grau i col·laboradors (*Grau i col., 1994*) al nostre laboratori després, van demostrar que aquest EGF del plasma provenia de les glàndules submaxil·lars.

Aquests resultats suggereixen que l'estrès hauria de provocar l'alliberament de l'EGF cap a la sang. En efecte, Maria Pau Mena va demostrar al nostre laboratori que això era així (*Mena, 1999*). Ella va sotmetre ratolins mascles a estrès per immobilització durant períodes de temps de fins a tres hores, i va observar que es produïa un ràpid, però transitori, increment de la concentració d'EGF al plasma. En el mateix treball va poder demostrar que aquest EGF provenia de les glàndules submaxil·lars. Posteriorment jo mateixa, durant els experiments realitzats per a obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica, vaig poder detectar com l'estrès provocat al ratolí per la restricció de moviment (*restraint*) també provocava un increment de l'EGF al plasma que anava acompanyat d'una disminució de les concentracions d'EGF a les glàndules submaxil·lars (*Sánchez, 1999*).

1.3.5. Efecte de l'EGF sobre les accions de les catecolamines.

Degut al fet que les concentracions de catecolamines al plasma es mantenen elevades durant l'estrès i encara un temps després de la desaparició de l'estímul estressant (*Sgoifo i col., 1997*), els teixits estan exposats a una estimulació combinada de ambdós: catecolamines i EGF.

1.3.5.1. Efectes metabòlics.

Tal i com s'ha descrit anteriorment (veure apartat 1.3.4.) les catecolamines estimulen la secreció d'EGF des de les glàndules submaxil·lars a través de l'activació de receptors α_1 -adrenèrgics. Per altra banda, el nostre grup d'investigació va observar que el propi EGF interferia als efectes metabòlics més característics de les catecolamines.

Les catecolamines provoquen els seus efectes a través dels receptors adrenergics. S'han descrit 3 grans grups d'adrenoreceptors: α_1 , α_2 i β . La interacció d'aquests receptors amb els diversos tipus de proteïnes G descrites (Gs, Gq, Gi entre altres) provoca finalment l'activació dels diferents sistemes efectors (*Strasser i col., 1992*). Els receptors α_1 -adrenèrgics a través de proteïnes Gq activen la fosfolipasa C- β (PLC- β), que catalitza la hidròlisi del fosfatidil inositolbifosfat (PIP2) generant els segons missatgers: inositol-1, 4, 5-trisfosfat (IP3), induint l'alliberació de calci del reticle endoplasmàtic; i diacilglicerol (DAG), que juntament amb el calci, provoca l'activació de la proteïna cinasa-C (PKC) (*García, 1993*). Per altra banda, els receptors α_2 -adrenèrgics a través de proteïnes G, del tipus inhibitori Gi, interacciona amb l'adenilat ciclase (AC) provocant una disminució dels nivells d'AMP cíclic (AMPC) intracel·lular (*Summers i McMartin, 1993*). El tercer grup d'adrenoreceptors, el tipus β , interaccionen amb proteïnes G, del tipus estimulador Gs, provocant l'acció contrària dels receptors α_2 -adrenèrgics, és a dir, que incrementa la concentració d'AMP a l'interior cel·lular, induint l'activació de la proteïna cinasa-A (PKA), que per la seva banda fosforila diferents substrats, entre ells CREBP (*cAMP responsive element binding protein*) (*Schenk i Snaar-Jagalska, 1999*).

A nivell **hepàtic**, les catecolamines alliberades durant l'estrès estimulen la degradació del glicogen mitjançant l'activació de receptors de tipus α_1 , els quals provoquen un increment de calci intracel·lular (Ca^{2+}), i també receptors del tipus β , provocant un increment de la concentració d'AMP cíclic (AMPC). Al nostre grup d'investigació havíem observat com l'EGF també estimulava la glicogenolisi en hepatòcits aïllats de rata (*Quintana i col., 1995*) i ratolí (*Grau i col., 1996*), i per aquest motiu Grau i col·laboradors van voler analitzar si existia un efecte sinèrgic que podria tenir lloc com a resultat de la interacció de les catecolamines i l'EGF. Van observar que la degradació de glicogen provocada per aquesta combinació era menor que la produïda únicament per l'adrenalina (*Grau i col., 1997*). Aquesta capacitat de l'EGF d'interferir l'efecte de l'adrenalina es produïa tant "in vitro" com "in vivo". En el mateix treball estudien els mecanismes que produeixen aquesta interferència en hepatòcits aïllats. Mitjançant l'ús d'un inhibidor poc selectiu de les

fosfodiesterases, l'IBMX, van observar que aquest producte eliminava l'efecte inhibidor de l'EGF sobre l'increment en els nivells d'AMPc provocat per l'adrenalina i també pel glucagó. D'aquesta manera s'indicava que la interferència era deguda a la reducció en la intensitat del senyal d'AMPc, sense que l'EGF afectés el de Ca^{2+} . Per això els estímuls glicogenolítics induïts per un increment del Ca^{2+} com els generats per la hormona vasopressina (VP) (Johnson i col., 1986; Johnson i Garrison, 1987) o la fenilefrina (agonista α_1 -adrenèrgic) no es veuen afectats per l'EGF (Grau i col., 1997).

Per altra banda, al **teixit adipós**, les catecolamines estimulen la lipòlisi mitjançant l'activació de receptors β -adrenèrgics. Aquesta acció lipolítica es produeix per la fosforilació de la lipasa sensible a hormones (HSL) i de la perilina A per la proteïna cinasa-A (PKA) (Holm i col., 2000). En aquest teixit, s'ha observat un efecte antilipolític de l'EGF, ja que modula la quantitat d'AMP cíclic produït per l'isoproterenol (agonista β -adrenèrgic) en adipòcits aïllats de rata (Tebar i col., 1993) i encara que els efectes de l'EGF mimetitzen les accions de la insulina, a l'hora de modular les concentracions d'AMP cíclic, els mecanismes involucrats són diferents (Tebar i col., 1996). Aquest mateix efecte va ser detectat posteriorment "in vivo" al ratolí (Tebar i col., 2000). Tebar i col·laboradors al nostre laboratori van demostrar que tant l'EGF alliberat de forma endògena com l'EGF administrat exògenament interfereix en la acció lipolítica provocada per les catecolamines: quan més baixa es la concentració d'EGF al plasma, més intens era l'efecte de l'adrenalina sobre el teixit adipós (Tebar i col., 2000).

1.3.5.2. Efectes cardiovasculars.

Donat que s'havia observat que l'EGF reduïa l'efecte glicogenolític en el fetge i el lipolític en el teixit adipós, en tots dos casos a través de la interferència sobre el senyal d'AMP cíclic mediat pels receptors β -adrenèrgics, es va voler estudiar si també succeïa el mateix en el cor. Aquest teixit és una diana molt important de les catecolamines on provoquen un augment de la ionotropia (força de contracció) i de la cronotropia (ritme de contracció), efectes mediat per la estimulació β -adrenèrgica. Així, Susanna Faraudo en el nostre laboratori va estudiar l'efecte de l'EGF sobre el senyal d'AMP cíclic generat per les catecolamines. Va observar que, en efecte, l'EGF també en cardiomiòcits, era capaç de d'interferir el senyal d'AMP cíclic generat per l'isoproterenol (Lorita i col., 2002).

Posteriorment, estudis realitzats al nostre laboratori per Jordi Lorita i Noelia Escalona han demostrat que existeix una interacció entre l'EGF i l'adrenalina sobre la funció cardiovascular. L'EGF redueix la resposta ionotròpica i cronotròpica positiva induïda per la infusió d'adrenalina al cor perfós. I en l'animal sencer redueix també l'efecte cronotròpic provocat per l'administració d'adrenalina (*Lorita i col., 2002*).

1.3.5.3. Efectes sobre el dany cel.lular provocat per les catecolamines.

Molts estudis realitzats tant "in vitro" com "in vivo" han demostrat que com a conseqüència de l'acció de les catecolamines alliberades per causa de l'estrès, té lloc una alliberació, per part de les cèl.lules, de diferents enzims intracel.lulars, que es tradueix en un increment de l'activitat d'aquests enzims a plasma. S'utilitzen així com a marcadors de dany cel.lular i no només indiquen la progressió del dany causat per l'estrès sinó també els teixits lesionats. Els enzims que es detecten són principalment: la lactat deshidrogenasa (LDH), la creatina cinasa (CK), i les transaminases, aspartat transaminasa (AST) i alanina transaminasa (ALT).

En estudis realitzats amb hámsters cardiomiopàtics (*Matsuoka i col., 1998*), l'estrès ocasionat per la combinació del fred amb la immobilització provoca la mort brusca d'aquests animals perquè empitjora la seva disfunció cardiovascular. Davant aquest fet es van proposar dilucidar la implicació del sistema nerviós autònom en aquesta resposta. Mitjançant l'administració de propanolol (antagonista β -adrenèrgic) es prevenia la mort dels animals, en canvi, no s'aconseguia revertir l'efecte de l'estrès quan s'administrava fentolamina (antagonista α_1 -adrenèrgic). Així doncs, són els estímuls simpàtics a través dels receptors β -adrenèrgics els responsables del dany cardíac. S'ha descrit també que amb un pretractament amb antagonistes β -adrenèrgics s'evita l'increment de l'activitat enzimàtica a plasma produïda per l'estrès (*Downing i Chen, 1985*).

Als estudis realitzats en ratolins per Anna Arnau al nostre laboratori (*Arnau, 1999*), van detectar que després de 20 minuts d'immobilització les activitats dels enzims LDH, AST i AST augmentaven. Quan el temps d'immobilització era superior, 180 minuts, a banda de les ja esmentades, es detectava un augment de l'activitat CK. També s'ha descrit que, a rates, la immobilització provoca un increment dels enzims (*Sen i col., 1992*) i encara és més important aquest efecte si la immobilització es combina amb fred (*Meltzer, 1971*), essent la CK l'enzim que més espectacularment incrementa la seva activitat a plasma. L'anàlisi dels isoenzims de la LDH

(*Arnau, 1999*) i l'histològic de necropsies de cor (*Pareja i col., 2003*) demostren que, en efecte, l'estrès intens per immobilització provoca lesions cardíques.

A l'igual que l'EGF redueix les disfuncions provocades per la infusió sostinguda d'adrenalina en el cor perfós (*Lorita i col., 2002*), en l'animal sencer, l'administració d'EGF redueix molt significativament la intensitat de les lesions provocades per la immobilització (combinada amb l'exposició al fred) (*Pareja i col., 2003*).

1.4. MODELS EXPERIMENTALS PER A L'ESTUDI DE L'ESTRÈS I L'ACCIÓ DE L'EGF.

1.4.1. Estrès social.

Al laboratori s'han utilitzat durant anys diferents models d'estrès per tal d'examinar com l'organisme és afectat per l'exposició als diferents tipus d'estímuls o agents. Però moltes vegades els models convencionals d'estrès emprats al laboratori, com per exemple la immobilització (IMMO), la natació forçada o el fred, no reflexen fidelment les condicions amb les quals l'animal es troba a la seva vida diària (*Palanza, 2001*) i així es desenvolupen respostes fisiològiques i comportamentals diferents a les que poden aparèixer en una situació quotidiana d'estrès (*Sawchenko i col., 1996; Herman i Cullinan, 1997; Koolhaas i col., 1997; Martínez i col., 1998a; Blanchard i col., 2001*). Per aquest motiu els models animals que es desenvolupen en un context social semblen més apropiats perquè representen situacions que els animals poden trobar-se en la seva vida diària (*Martínez i col., 1998b; Palanza, 2001; Tamashiro i col., 2005*).

Aquest tipus d'estrès es coneix amb el nom d'“estrès social”, “estrès psicosocial” i “conflicte social”, i s'utilitzen per a mimetitzar determinades malalties humanes relacionades amb l'estrès (per exemple: ansietat i depressió) (*Martínez i col., 1998b; Palanza, 2001*), ja que en humans la principal font d'estímuls estressants són de tipus social, derivats de les interaccions entre els diferents individus (*George i col., 1989; Garnefski i col., 1990; Brown, 1993*). Mitjançant l'ús dels models animals d'aquest tipus d'estrès es pot determinar quins són els mecanismes que

provoquen l'aparició d'aquestes malalties i també trobar els tractaments farmacològics adients (*Bohus i col., 1990; Kudryavtseva i col., 1991; Koolhaas i col., 1995*).

Els animals més utilitzats en aquest tipus d'estrès són els rosegadors, la rata, el ratolí, i en ocasions els hàsters, i els primats no-humans, degut a les inherents interaccions socials que s'estableixen entre els individus i al comportament propi d'aquestes espècies (*Blanchard i col., 2001; Tamashiro i col., 2005*).

Existeixen molts models d'estrès social utilitzats al laboratori i la majoria es poden classificar en un dels dos grups àmpliament definits: el paradigma intrús-resident (el qual serà descrit a l'apartat següent) i el model de jerarquia social o colònia (*Martínez i col., 1998b; Tamashiro i col., 2005*).

L'estrès social és el resultat de la competició per l'espai, l'accés a una parella reproductiva, el menjar o el beure. Quan els ratolins estan agrupats, s'estableixen interaccions agressives entre els companys de gàbia i es desenvolupa una estructura social, o jerarquia, en poc temps, en la qual un mascle és identificat com a dominant i els altres són els subordinats. Aquest és el model de colònia (*Blanchard i col., 1991*). S'han desenvolupat molts models animals per analitzar aquesta tendència natural en rates (*Taylor i col., 1987; Stefanski i col., 2001*), ratolí (*Ely i Henry, 1978*) i també en primats no humans (*Brown i col., 1982; Shively i col., 1997*). El fet que l'habitat sigui el més natural possible (*Blanchard i Blanchard., 1990*) i l'existència de femelles dins la colònia (*Flannelly i col., 1982*) són dos factors que indueixen més agressivitat en aquest model. Però, tot i això, en els estudis realitzats amb el model de colònia es poden seguir dues estratègies per potenciar el comportament agressiu: **(a)** crear grups socials i després barrejar-los (models d'instabilitat social) o **(b)** introduir mascles altament agressius en grups estables (model de disrupció social) (*Blanchard i col., 2001*).

Aquests models d'estrès psicosocial són aplicats, sobretot, en mascles, ja que les femelles no resulten apropiades per la dificultat de induir agressivitat o obtenir relacions de dominància entre elles (*Palanza, 2001; Blanchard i col., 2001*). Fins i tot quan les femelles són reagrupades abans d'arribar a la maduresa sexual, fet que incrementa molt l'agressivitat en ratolins mascles quan arriben a l'edat adulta (*Bartolomucci i col., 2004*), no augmenta el comportament agressiu d'aquestes. Això és degut al fet que les femelles no mostren defensa pel territori quan es troben amb intrusos de la mateixa espècie (*Palanza i col., 1994*) i només desenvolupen agressivitat

quan es troben reproductivament actives (*Brain i col., 1992; Palanza, 2001*). Per aquest motiu a la bibliografia es dificil trobar treballs realitzats amb femelles (*Martínez i col., 1998b*). Però el fet que els estudis epidemiològics en humans ens mostren que els desordres de comportament associats a l'estrès són més freqüents a dones que a homes (*Breslau i col., 1997; Piccinelli i Simon, 1997; Szadoczky i col., 1997*) ha estat el motiu pel qual es fa necessari el desenvolupament de nous models en femelles. En aquesta línia, Haller i col·laboradors (*Haller i col., 1999*) han pogut observar com amb el model d'instabilitat social en femelles es reproduïen els efectes més característics que apareixen en la derrota social dels mascles (hipertròfia adrenal i augment de corticosterona al plasma). Indicant així que resultaria un bon model aplicable a les femelles ja que la instabilitat dels components socials de l'establiment serien el principal factor d'estrès en femelles i no pas l'agressivitat, que si es detecta en mascles.

1.4.1.1. Paradigma intrús-resident: la confrontació entre mascles.

El paradigma intrús-resident és un model molt popular típicament utilitzat en rata i ratolí, i està basat en l'establiment del territori per un mascle i la defensa que fa aquest contra altres mascles intrusos (*Martínez i col., 1998b; Tamashiro i col., 2005*). Consisteix en la introducció d'un mascle, anomenat *intrús*, dins la gàbia d'un altre mascle, anomenat *resident*, de manera que el primer resulta atacat per aquest últim. La durada de l'exposició pot variar de minuts a setmanes, i per això ha estat àmpliament classificat dins de les exposicions agudes i/o cròniques (*Martínez i col., 1998b*).

Respecte al tipus d'experiència social estressant que provoca aquest tipus d'estrès es pot fer una distinció entre aquells models en els quals l'intrús es exposat només a "atacs físics", i aquells en els quals l'intrús està exposat a "atacs físics" i també a "l'amenaça d'atac" (*Tornatzky i Miczek, 1994*). Per alguns investigadors simplement "l'amenaça d'atac" ja és utilitzada per induir estrès social (*Koolhaas i col., 1986; Sgoifo i col., 1998*).

En el model de confrontació entre mascles desenvolupat en aquest treball els animals eren exposats durant un període de temps a "atacs físics" i no induïem en cap moment "l'amenaça d'atac".

A l'hora de dissenyar els experiments d'estrès social el manipulador pot modificar determinats paràmetres per tal d'assolir l'èxit en el seu estudi. Es pot seleccionar l'animal resident:

(a) que sigui d'una soca més agressiva; (b) que tingui major pes corporal; (c) que estigui aparellat amb una femella (en el cas de les rates) o que estigui aïllat (en el cas del ratolí) (Martínez i col., 1998b; Tamashiro i col., 2005). Així es pot induir una major agressivitat de l'animal resident i tenir la garantia de que es produirà confrontació entre els animals.

1.4.1.2. Conseqüències fisiològiques i patològiques de l'estrès social agut.

Com a conseqüència de l'aplicació de l'estrès social es produeixen tota una sèrie de canvis de comportament, neuroendocrins, fisiològics i immunològics, entre d'altres, dirigits tots ells a afrontar l'amenaça que aquest tipus d'estrès provoca sobre l'estat homeostàtic de l'animal. Els canvis que seran descrits a continuació estan referits, majoritàriament, a l'animal que resulta vençut (subordinat) després de la confrontació entre mascles, és a dir, l'animal intrús.

Els canvis més destacables en el comportament és que l'animal subordinat mostra una menor activitat locomotora i exploratoria (Kudryavtseva i col., 1991; Meerlo i col., 1996) i un augment de l'ansietat (Avgustinovich i col., 1996). A més mostren un comportament defensiu molt evident, el qual inclou fugides (*fleeing*) i adopció de postures de total submissió (Blanchard i col., 1993). Malgrat aquesta actitud clarament submissa, l'animal resulta atacat i les lesions cutànies produïdes es troben situades preferentment a l'esquena i a la cua (Tamashiro i col., 2004).

El sistema immune també es veu afectat per l'estrès social, però les funcions immunològiques es poden veure augmentades o suprimides en funció del procediment d'estrès social aplicat. S'ha descrit que l'estrès social indueix immunodepressió i també influencia en la progressió de determinades malalties. Diversos models d'estrès social emprats en rosegadors han demostrat que es produeix una alteració en la població leucocitària (Bohus i col., 1993; Stefanski, 2000), que disminueix la citotoxicitat de les cèl·lules NK (*natural killer*) (Bohus i col., 1993) i la producció d'anticossos (Bohus i col., 1993; Fleshner i col., 1989). Aquests canvis funcionals expliquen perquè després de les interaccions agressives entre ratolins es produeixen més infeccions parasitàries (Barnard i col., 1993) i augmenta la probabilitat de que es reactivi el virus *Herpes simplex* (Padgett i col., 1998). Malgrat això alguns estudis demostren que els conflictes socials en ratolins no tenen un efecte inhibidor global sobre la funció immune (Stark i col., 2001) i d'altres indiquen com l'estrès social augmenta la resposta limfocitària (Lyte i col., 1990). Aquest resultat contradictori també s'observen en l'habilitat de les cèl·lules per produir citocines. Podem trobar estudis on es detecta una supressió de la producció de citocines (de Groot i col., 1999;

Bartolomucci i col., 2001), i d'altres on es descriu una estimulació de la seva síntesi (*Quan i col., 2001; Johnson i col., 2002*). Tots aquests efectes a primera vista contradictoris poden explicar-se per la diversitat de situacions socials que es poden utilitzar, i que potencien en major o menor grau un dels dos components de l'estrès social: el component psicològic (pèrdua de control) o el component físic (ferides produïdes) (*Merlot i col., 2003*).

Per altra banda, tal i com s'ha indicat anteriorment (apartat 1.3.3.) l'estrès provoca una activació de l'eix HPA i del sistema nerviós simpàtic (SNS). Per aquest motiu es detecta un increment a la sang de l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) (*Picth i col., 1993; Skutella i col., 1994*), de corticosterona (*Sachser i Lick, 1991; Picth i col., 1993; Blanchard i col., 1995*) i d'adrenalina i noradrenalina (*Sgoifo i col., 1996*). També s'observa un augment de l'activitat dels enzims implicats en la síntesi de les catecolamines a la medul·la adrenal, com són l'enzim feniletanolamina N-metiltransferasa (*Haemish i Gärtner, 1996*) i l'enzim tirosinahidroxilasa (*Raab i col., 1986*). Altres hormones, en canvi, veuen disminuïts els seus nivells per l'estrès social. Aquest és el cas de la hormona luteilitzant (LH) i la hormona estimulant dels fol·licles (FSH) (*Bronson, 1973*), i la testosterona (*Blanchard i col., 1993; Blanchard i col., 1995*), encara que alguns autors indiquen que aquesta última no es veu afectada (*Dijkstra i col., 1992*). La disminució de la producció andrògena afecta a la producció de feromones pel que les femelles es veuen menys atretes pels mascles subordinats (*Dijkstra i col., 1992*).

Els canvis hormonalment comporten a la vegada tota una sèrie de canvis fisiològics. Com a conseqüència de l'alliberació de les catecolamines es produeix un increment de la pressió arterial i de la freqüència cardíaca, i un augment de la temperatura (*Tornatzky i Miczek, 1994; Meehan i col., 1995*). En aquesta línia els estudis realitzats per Stilli i col·laboradors van mostrar com l'aplicació del paradigma intrús-resident en rates mascles induïa una forta activació del sistema nerviós simpàtic (SNS) i provocava l'aparició d'un elevat nombre d'arrítmies ventriculars (*Stilli i col., 2001*). La quantitat d'arrítmies amb aquest tipus d'estrès era molt superior a la detectada a d'altres models d'estrès, no socials, més convencionals, com la restricció de moviment (*restraint*) i la natació (*Sgoifo i col., 1999*).

S'ha parlat àmpliament de la relació entre l'estrès social i els atacs de feridura (apoplexies). Pocs treballs científics però documenten clarament aquesta relació (*Carasso i col., 1981; House i col., 1990; Harmsen i col., 1990*). Treballs recents en animals experimentals intenten aclarir aquesta relació. Estudis d'isquèmia cerebral mostren com els glucocorticoides fan les

neurones més susceptibles a agressions posteriors (*Sapolsky, 1985*). DeVries i col·laboradors han descrit recentment el mecanisme pel qual es produeix aquesta afectació de la integritat neuronal (*DeVries i col., 2001*): les elevades concentracions de corticosterona assolides durant l'estrès social fan disminuir l'expressió de Bcl-2, protooncogen neuroprotector, augmentant així la susceptibilitat a d'altres agressions. Aquest mateix mecanisme podria explicar com els nivells circulants de corticosterona afecten a la evolució d'altres malalties isquèmiques, com l'infart de miocardi, susceptible a l'estrès (*Scheuer i Mifflin, 1998*) i també influenciat per l'expressió de Bcl-2 (*Brocheriou i col., 2000*). Per altra banda, en models d'estrès social on la confrontació és molt intensa s'ha detectat que es produeix una resistència de les cèl·lules dels sistema immune a l'acció inhibidora dels glucocorticoides (*Stark i col., 2001; Avitsur i col., 2001*). Aquest efecte s'entén com un fenomen adaptatiu per tal de no interferir amb els mecanismes de reparació de les ferides produïdes durant la lluita.

A nivell metabòlic l'alliberació de catecolamines i glucocorticoides es tradueix principalment en una mobilització de les reserves per tal d'augmentar l'energia disponible per l'individu durant el període d'estrès. Els glucocorticoides produeixen un augment de la glucosa a la sang inhibint el seu emmagatzematge a teixits perifèrics gràcies a la inhibició de la secreció d'insulina, i estimulant la secreció de glucagó. També estimulen la degradació de proteïnes i activen la lipòlisi, (*Dal Zotto, 2002*). Per la seva banda l'adrenalina actua sobre el fetge activant la glicogenòlisi (mitjançant l'activació dels receptors α_1 i β -adrenèrgics) i sobre el pàncreas provocant l'augment de secreció de glucagó i inhibint la secreció d'insulina (mitjançant l'activació dels receptors α_2 -adrenèrgics). A més les catecolamines actuen sobre el teixit adipós i gràcies a l'activació dels receptors β -adrenèrgics estimulen la lipòlisi (*Nonogaki i Iguchi, 1997*).

1.4.1.3. Habitució a l'estrès social.

La resposta de l'organisme als estímuls estressants depèn, a més de les característiques particulars de l'agent que la indueix, del temps durant el qual hi es exposat (*Kopin, 1995*), ja que l'exposició a un determinat estimul pot ser puntual (*estrès agut*), i durar desde pocs segons fins a dies o setmanes, i també pot ser repetida (*estrès crònic*) tal i com ha quedat descrit a l'apartat 1.3.2. Normalment l'exposició repetida d'un organisme a un mateix agent o situació estressant es tradueix en una disminució de l'amplitud de la resposta (*McCarty i col., 1992; Miller i O'Callaghan, 2002*), fenomen que es coneix amb el nom d'*adaptació* o *habitució*.

Aquesta menor resposta és conseqüència d'una desensibilització dels elements implicats en la estimulació dels eixos que en són responsables. Per una banda es produeix una atenuació del sistema nerviós simpàtic el que es tradueix en una disminució dels nivells de catecolamines circulants, que ha estat descrit en diversos models: natació forçada (*Lutgemeier i col., 1987*), restricció de moviment utilitzant immobilitzadors (*DeTurck i Vogel, 1980*) i exercici (*Ostman-Smith, 1979*). I per altra banda l'habitució també afecta a l'eix HPA, i com a conseqüència els nivells plasmàtics de corticosterona són menors. A la bibliografia s'ha descrit que es produeix una disminució de corticosterona en exposicions repetides al soroll (*Armario i col., 1986*), i en la immobilització (*Mikulaj i Mitro, 1972*). Però quan l'agent estressant aplicat canvia, la resposta es normalitza (*Martí i Armario, 1998*), i fins i tot de vegades es pot arribar a potenciar (*Aguilera, 1998*). Per aquest motiu, aquest fenomen d'habitució també pot ser degut a un procés d'aprenentatge a la situació estressant, ja que si realment la disminució en la intensitat de la resposta hagués estat un mecanisme bioquímic, després del canvi a un nou estímul estressant aquesta resposta continuaria reduïda.

L'aparició de l'habitució als estímuls estressants s'entén com un efecte avantatjós per a la supervivència de l'organisme, ja que una activació persistent o crònica de les respostes desenvolupades davant l'estrès agut aplicat a curt termini o de forma aguda (funcions catabòliques, immunosupresores, antireproductives, etc.), poden tenir conseqüències adverses per l'organisme (*McCarty i col., 1992; Tamashiro i col., 2005; Charmandari i col., 2005*).

1.4.2. Estrès produït per la injecció d'endotoxina bacteriana.

L'administració d'endotoxina bacteriana o lipopolisàcarid (LPS) ha estat àmpliament utilitzat per mimetitzar la resposta de l'organisme davant d'una infecció bacteriana sense necessitat d'infectar l'hoste. Així s'ha reproduït i analitzat la resposta inflamatòria que es desenvolupa (producció de mediadors proinflamatoris: citocines, òxid nítric (NO), prostaglandines (PGEs), etc.) que depèn de diferents factors com la dosi d'LPS administrada, la via d'administració i la soca bacteriana utilitzada (*Tilders i col., 1994*). Però en ocasions aquesta sèpsia pot complicar-se fins a produir un xoc sèptic caracteritzat per l'aparició de disfuncions cardiovasculars (coagulació intravascular disseminada i col·lapse vascular sistèmic) i dany multiorgànic, que finalment pot derivar en la mort de l'individu (*Bannerman i Goldblum, 2003*). A més el fet de tenir un bon model amb el qual desenvolupar la resposta inflamatòria innata ha permès assajar la capacitat

antiinflamatòria de determinats compostos i molècules (*Novogrodsky i col., 1994; Senaldi i col., 1998; Yamaguchi i col., 2001; Kwon i col., 2004*).

El lipopolisacàrid és el component més abundant de la membrana externa de les bacteries gram negatives (G-) (*Uesugi i col., 2001; Bannerman i Goldblum, 2003*) i en les últimes dècades moltes preparacions de LPS han estat purificades i caracteritzades biològica i químicament (*Mamat i col., 1999*). Les molècules de LPS consisteixen en un lípid bisfosforilat (lípid A) i en un polisacàrid hidrofílic (*Caroff i col., 2002*). Aquest lípid A és el responsable de les accions tòxiques produïdes per la endotoxina bacteriana (*Freudenberg i col., 2001; Reisser i col., 2002*). La flora bacteriana constitueix un reservori endogen de LPS i per aquest motiu quan es veu afectada la permeabilitat intestinal (estrès, alcoholisme i infeccions víriques) es produeix un increment dels nivells de lipopolisacàrid al plasma, que poden superar la capacitat hepàtica per eliminar-lo i derivar en una hepatitis crònica i cirrosis (*Meddings i Swain, 2000; Kono i col., 2000; Uesugi i col., 2001; Han, 2002*).

A la bibliografia trobem descrit com l'administració de LPS es pot realitzar sol o bé combinat amb D-Galactosamina (D-GalN). Aquest sucre és un inhibidor de la transcripció gènica (*Kosai i col., 1999; Endo i col., 1999*) i amb la seva utilització s'aconsegueix augmentar la sensibilitat dels animals a l'endotoxina. En aquest treball hem utilitzat la combinació LPS/D-GalN per als diferents experiments amb endotoxina, ja que és molt utilitzada en estudis amb rosegadors (menys sensibles a l'acció citotòxica del lipopolisacàrid que els humans) (*Bradham i col., 1998; Turnbull i Rivier, 1999*).

La endotoxina bacteriana pot activar el sistema nerviós central (SNC), actuant directament sobre els centres que connecten amb el nucli paraventricular de l'hipotàl·lem (NPV) i sense necessitat d'una elaboració de la informació a estructures superiors del SNC, per aquest motiu es considerat un tipus d'estrès físic-immune (*Herman i Cullinan, 1997*). Aquesta activació la pot dur a terme directament l'LPS o bé indirectament a través dels diferents mediadors generats durant la resposta inflamatòria (citocines, NO, PGEs,...) (*Turnbull i Rivier, 1999; Rivest i col., 2000; Rivest, 2001*). Com a conseqüència de l'administració d'endotoxina bacteriana s'observa un augment de l'expressió de l'RNA missatger de CRF al NPV i un increment en les concentracions plasmàtiques de ACTH i de corticosterona (*Vallés i col., 2002*) indicant així l'activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA). També es detecta un increment de l'expressió *c-fos* en diverses àrees cerebrals (*Vallés i col., 2005*). A més en aquest tipus d'estrès físic (immunològic)

s'ha observat que es produeix una disminució en la ingesta els dies posteriors a l'administració del tòxic, efecte degut a l'alliberació de CRF, tal i com queda descrit per altres models com la restricció de moviment (*Shibasaki i col., 1988; Smagin i col., 1999*) i l'administració de IL-1 (*Uehara i col., 1989*).

1.4.2.1. Reconeixement de l'LPS i transducció de la senyal: inducció de citocines inflamatòries.

El lipopolisacàrid (LPS) és un glicolípid que es troba de forma molt abundant a la paret externa de les bacteries gram negatives (G-). Degut al fet que les bacteries que colonitzen l'intestí de forma natural, bacteries intestinals, són d'aquests tipus, l'organisme ha desenvolupat forts mecanismes de defensa, utilitzant l'LPS com a marcador de la presència d'invasors (*Su, 2002*). El fetge juga un paper central en aquest procés degut a la seva habilitat, no només per eliminar l'LPS de la circulació, sinó també per respondre enèrgicament davant d'ell. En estudis realitzats amb animals sans, l'LPS és eliminat de la circulació en pocs minuts després d'una administració intravenosa, i la majoria es troba localitzat al fetge (*Mathison i Ulevitch, 1979*). Mentre que en pacients amb cirrosi és molt freqüent l'aparició d'endotoxèmia (*Lin i col., 1995*). A més d'aquesta habilitat per eliminar l'LPS, el fetge respon a l'LPS produint citocines (*Luster i col., 1994*) i d'altres mediadors inflamatoris (*Arthur i col., 1988; Bautista i Spitzer, 1995*).

Per tal que s'iniciïn aquests mecanismes de defensa cal que es produeixi un reconeixement de l'endotoxina bacteriana per part de diferents tipus cel·lulars, principalment macròfags. A posteriori es produeix la transducció de la senyal que indueix la producció i secreció de citocines, iniciant així la resposta inflamatòria. En aquest apartat descriurem els mecanismes pels quals l'LPS és reconegut i com es produeix la transducció de la senyal.

Després de l'administració de l'LPS, aquest arriba al torrent circulatori, on s'uneix a una proteïna sèrica anomenada proteïna d'unió a l'LPS (*LPS binding protein* o LBP) (*Schumann i col., 1990*). LBP és una proteïna de fase aguda produïda majoritàriament pels hepatòcits, encara que també s'ha detectat la seva producció, en menor quantitat, a llocs extrahepàtics (*Su i col., 2005*). El complex LPS/LBP s'uneix al receptor de membrana CD14 (mCD14), que és una glicoproteïna que es troba a les cèl·lules d'origen monocític i de la qual també existeix una forma soluble (sCD14) (*Ulevitch i Tobias, 1995*). L'LPS per si sol pot unir-se directament a mCD14, però amb l'LBP

disminueixen les concentracions d'LPS necessàries per activar les cèl·lules (*Schumann, 1992*) ja que s'incrementa de forma molt important l'afinitat per aquest receptor (*Su i col., 2000*).

La proteïna mCD14 es troba ancorada a la membrana cel·lular però no té domini intracel·lular, per tant per a la transducció de la senyal és necessari l'acció d'un altre receptor de membrana. Aquest receptor va ser identificat com receptor semblant a Toll (*Toll-like receptor 4* o TLR-4) (*Chow i col., 1999*) i el seu nom és degut a la elevada similitud amb les proteïnes Toll descrites a *Drosophila*. Durant molt de temps es va pensar que un altre membre de la mateixa família, TLR-2, també induïa la senyalització per l'LPS. Dos grups diferents van descriure que l'activació per LPS era generada gràcies a TLR-2 (*Kirschning i col., 1998; Yang i col., 1998*). Però estudis posteriors van demostrar que algunes preparacions comercials d'LPS estan contaminades amb lipoproteïnes bacterianes i que són aquestes lipoproteïnes, i no l'LPS, les responsables de l'activació de TLR-2 (*Hirschfeld i col., 2000*).

Finalment és una petita molècula situada a l'exterior cel·lular coneguda amb el nom de MD-2 l'últim membre que es necessita per tal que es produeixi l'activació cel·lular per l'LPS (*Nagai i col., 2002*). Aquesta proteïna és necessària per a la transducció de la senyal a través de TLR-4 i les seves mutacions es tradueixen en una disminució de la resposta a l'LPS (*Schromm i col., 2001*).

Després de l'activació del complex TLR-4 una proteïna anomenada factor 88 de diferenciació mieloide (*myeloid differentiation factor 88* o MyD88), que actua com proteïna adaptadora, es reclutada cap al domini citoplasmàtic de TLR-4 i interacciona gràcies al seus dominis TIR (*Toll receptor-IL-1 receptor*) (*Bannerman i Goldblum, 2003; Beutler i col., 2003*). Seguidament MyD88 mitjançant un altre domini d'unió anomenat domini de mort (*death domain* o DD) s'associa a una altra molècula que conté aquest mateix domini DD, la cinasa-1 associada al receptor de IL-1 (*IL-1 receptor-associated kinase-1* o IRAK-1) (*Daun i Fenton., 2000*). Després de la seva autofosforilació, IRAK-1 es dissocia de MyD88 i interacciona amb el factor 6 associat al receptor de TNF (*TNF receptor-associated factor-6* o TRAF-6) (*Swanek i col., 2000*). A continuació aquesta s'uneix a la cinasa-1 activada pel factor de creixement transformant- β (*transforming growth factor- β activated kinase-1* o TAK-1) (*Lee i col., 2000*), resultant en l'activació d'una cascada de proteïnes cinases, entre les quals s'inclouen la cinasa inductora del factor de transcripció NF-kB (*NF-kB-inducing kinase* o NIK) i la cinasa de I κ B, proteïna inhibidora de NF-kB, (*I κ B kinase* o IKK) (*Bannerman i Goldblum, 2003*). Gràcies a la fosforilació de I κ B per

part de IKK queda alliberat el factor de transcripció NF- κ B i ja es pot tranlocar al nucli, mentre I κ B és degradada a través del proteosoma (Daun i Fenton, 2000). Un cop allà NF- κ B activa la transcripció gènica de nombroses citocines com el factor de necrosi tumoral (TNF- α) i la interleucina-1 (IL-1) entre altres (Caroff i col., 2002; Beutler i col., 2003) (veure figura 1.8).

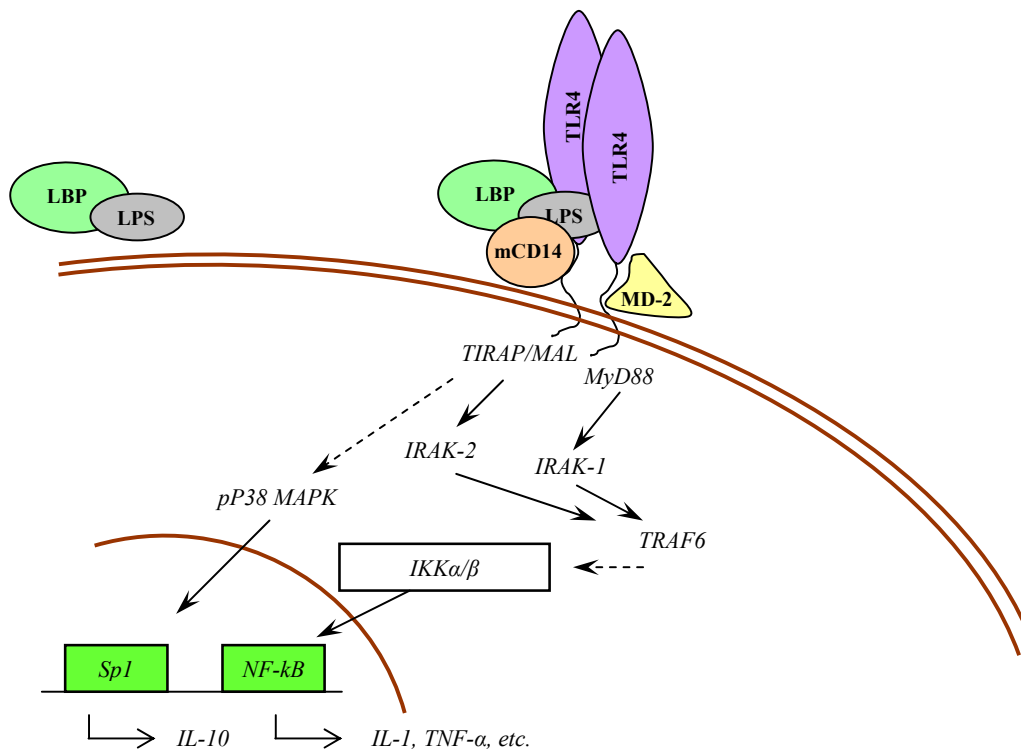


Figura 1.8.- Diagrama esquemàtic de la transducció de senyal originada per l'LPS per a la generació de citocines. Després de la unió de l'LPS a TLR4 s'inicia la transducció de senyal que finalitzarà amb l'expressió de citocines inflamatòries. Aquesta transducció de senyal inclou diverses proteïnes com MyD88, MAL, TIRAP, IRAK 1 i 2, i TRAF6, que produeixen l'activació del factor de transcripció NF- κ B i posterior expressió de TNF- α i IL-1 β entre d'altres. A més, a través de TIRAP s'inicia una cascada de fosforilacions que finalitzarà amb l'activació de p38 MAPK i posterior expressió de la IL-10, mitjançant el factor de transcripció Sp1. **LBP**, proteïna d'unió a LPS; **mCD14**, CD14 de membrana; **TLR4**, receptor semblant a Toll 4; **MyD88**, factor 88 de diferenciació mieloide, **IRAK-1 i 2**, cinasa 1 i 2 associada al receptor de IL-1; **MAL**, proteïna adaptadora semblant a MyD88; **TIRAP**, proteïna adaptadora que conté el domini TIR; **TRAF6**, factor 6 associat al receptor de TNF; **IKK**, proteïna cinasa de I κ B; **p38MAPK**, proteïna cinasa activada per mitogens p38; **TNF- α** , factor de necrosi tumoral α ; **IL-1 β** , interleucina 1 β ; **IL-10**, interleucina 10. Adaptat de Ma i col·laboradors (Ma i col., 2001), Caroff i col·laboradors (Caroff i col., 2002) i Bannerman i Goldblum (Bannerman i Goldblum, 2003).

Estudis realitzats amb animals *Knock Out* per MyD88 o IRAK-1 van demostrar que la unió del NF- κ B a l'ADN induïda per l'LPS es veia reduïda però no inhibida, indicant que l'activació cel·lular provocada per l'LPS podia tenir lloc sense aquestes molècules (*Bannerman i Goldblum, 2003*). Recentment, s'han identificat dues proteïnes semblants a MyD88, la proteïna adaptadora semblant a MyD88 (*MyD88 adaptator-like protein* o MAL) o la proteïna adaptadora que conté el domini TIR (*TIR domain-containing adaptator-like protein* o TIRAP) que participen en la inducció de NF- κ B a través d'un procés dependent d'IRAK-2 (*Fitzgerald i col., 2001; Horng i col., 2001*). A través de TIRAP s'inicia una altra cascada de fosforilacions que implica a diferents cinases i que finalitza amb l'activació de la proteïna cinasa activada per mitogens p38 (*p38 mitogen-activated protein kinase* o p38 MAPK) i el factor de transcripció Sp1, induint l'expressió de la interleucina-10 (IL-10) (*Ma i col., 2001; Caroff i col., 2002*) (veure figura 1.8).

1.4.2.2. Evolució de la resposta inflamatòria i mecanismes de retroinhibició generades pel sistema nerviós central.

La injecció d'endotoxina bacteriana produeix una ràpida producció de citocines, característica essencial de la resposta immunitària innata. Aquestes proteïnes, juntament amb quemocines i prostaglandines, pertanyen a una superfamília de molècules proinflamatòries que són responsables de la majoria de canvis neuroendocrins que tenen lloc durant la resposta de fase aguda d'aquest tipus d'agressió. El factor de necrosi tumoral- α (TNF- α), la interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 i els interferons (IFN- γ i IFN- β) són les citocines que pertanyen al sistema immune innat, encara que no totes són proinflamatòries (IL-10 és antiinflamatòria). Entre elles el TNF- α , la IL-1 β i IL-6 són ràpidament induïdes en resposta a l'LPS i poden circular pel torrent circulatori i actuar en òrgans distants. Un cop allà aquestes citocines s'uneixen a receptors específics iniciant diferents vies de senyalització que provocaran l'evolució de la resposta inflamatòria.

El **factor de necrosi tumoral (TNF- α)** és una citocina que va ser descoberta per la seva activitat antitumoral (*Carswell i col., 1975*), però actualment és molt coneguda com a factor proinflamatòri que juga un paper central iniciant la cascada de citocines involucrades en el control de la resposta immune. Existeixen dues isoformes d'aquesta citocina, α i β , amb un 50% d'homologia. El TNF- β (o limfotoxina- α) es produïda majoritàriament per limfòcits activats (*Turnbull i Rivier, 1999*), mentre que el TNF- α (també anomenat catequina) es produïda per una àmplia varietat de cèl·lules com neutròfils, macròfags activats (*Miller i col., 1993*), limfòcits T i B

(Goldfield *i col.*, 1991), cèl·lules NK (*natural killer*), astròcits (Chung *i Benveniste*, 1990), cèl·lules endotelials (Wilkinson *i Edwards*, 1991) i microglia (Nadeau *i Rivest*, 2000) entre altres. Els macròfags i les cèl·lules NK són la font principal de secreció d'aquesta citocina.

El TNF- α és expressat com una proteïna associada a la membrana de 26 KD i es processada cap a la forma soluble de 17 KD (Turnbull *i Rivier*, 1999). Aquesta citocina participa en una àmplia varietat d'esdeveniments, com shock sèptic, proliferació cel·lular i apoptosi, que són mediades per la unió del TNF- α a un dels seus dos receptors: un de 55 KD (TNF-R1) i l'altre de 75 KD (TNF-R2) (Bazzoni *i Beutler*, 1996).

Els mecanismes pels quals el TNF- α indueix apoptosi han estat molt ben descrits en hepatòcits i ens permeten entendre com la injecció de LPS provoca l'aparició de dany hepàtic. Els efectes apoptòtics del TNF- α són mediats únicament pel TNF-R1, mentre que el TNF-R2 serveix per potenciar els efectes del TNF-R1 a l'hora d'induir mort cel·lular o inflamació (Wang *i col.*, 2003). El TNF-R1 conté tres dominis funcionals per a la transducció del senyal (Ding *i Yin*, 2004): domini DD (*death domain*), domini ASD (*A-Smase, acidic sphingomyelinase, activating domain*) i domini NSD (*N-Smase, neutral sphingomyelinase, activating domain*). A través dels dominis DD s'inicien les vies pro i antiapoptòtiques, mentre que els altres dos dominis modulen la resposta apoptòtica i inflamatòria. Les mitocondries semblen ser les executores centrals en l'apoptosi dels hepatòcits induïda pel TNF- α (Ding *i Yin*, 2004).

La **interleucina-1 (IL-1)** (especialment la isoforma β) és, probablement, la molècula més important que pot modular les funcions cerebrals durant la inflamació sistèmica o localitzada. Existeixen també dues isoformes de la IL-1, α i β , que comparteixen menys d'un 30% d'homologia i que s'uneixen als mateixos receptors (Dinarello, 1991), anomenats receptor de IL-1 tipus I (IL-1R1) i II (IL-1R2) i proteïna accessòria del receptor de IL-1 (IL-1R-AcP) (Rivest, 2001). Ambdues isoformes són sintetitzades com una molècula precursora de 31 KD. La molècula pro-IL-1 β és biològicament inactiva i necessita ser processada proteolíticament per l'enzim conversor de la IL-1 β (ICE, també conegut com caspasa-1) (Keane *i col.*, 1995). Un tercer membre d'aquesta família, anomenat antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), s'uneix als mateixos receptors que IL-1 β i IL-1 α però no indueix cap senyal intracel·lular i per tant actua com un inhibidor endogen de l'activitat IL-1 (Eisenberg *i col.*, 1990).

La IL-1 α i IL-1 β tenen diferents mecanismes d'expressió, síntesi i secreció. El gen de la IL-1 α no conté la clàssica seqüència d'inici de transcripció coneguda com caixa "TATA", mentre que si hi és present al gen de la IL-1 β (*Shirakawa i col., 1993*). La transcripció del gen de la IL-1 β sembla que està controlat d'una manera més complexa i la seva regió promotora conté elements de resposta a l'AMPc (CRE), un element que respon a l'LPS anomenat NF-IL-6, llocs anàlegs als del factor de transcripció NF- κ B i altres (*Roux i Lombard, 1998*). La IL-1 β té l'habilitat de circular pel torrent circulatori i actuar sobre òrgans distants i produir diferents respostes fisiològiques per la unió al seu receptor tipus I (IL-1R1).

Una altra citocina molt important generada durant la resposta inflamatòria és la IL-6, la qual no és directament induïda per la endotoxina bacteriana sinó pel TNF- α . El mecanisme molecular pel qual el TNF- α induïx l'expressió de IL-6 és a través de NF- κ B (*Vanden Berghe i col., 2000*).

La **interleucina-6 (IL-6)** és una glicoproteïna d'una tamany entre 21-28 KD, que es troba involucrada en una àmplia varietat de funcions immunes com diferenciació de limfòcits T i B, inducció de la producció de IL-2 i el seu receptor en limfòcits T, estimulació de la síntesi de proteïnes de fase aguda i hematopoiesi (*Taga i Kishimoto, 1997; Hirano, 1998*). El primer pas en la inducció de la transducció de la senyal per la IL-6 és la unió al seu receptor (IL-6R). A continuació les dos molècules s'associen a la subunitat de membrana gp130 i seguidament dimeritzen dos complexos per induir la transducció de la senyal (*Rivest, 2001*).

Dels receptors de IL-1 β , IL-6 i TNF- α existeixen també les seves formes solubles corresponents que poden unir el seu lligand (*Fernández-Botran, 1991; Heaney i Golde, 1996*). Per la IL-1 β i el TNF- α la unió a aquests receptors truncats els hi confereix una acció antagònica, però en canvi el complex IL-6/IL-6R pot interaccionar amb la subunitat gp130 de membrana i produir la resposta cel·lular.

L'administració d'endotoxina no només induïx l'expressió de citocines proinflamatòries (anteriorment esmentades) sinó també d'una citocina antiinflamatòria: la **interleucina 10 (IL-10)**. Aquesta és una citocina pleiotròpica que es produïda per molts tipus cel·lulars inclosos els monocits/macròfags. Es tracta d'un polipèptid de 17-18 KD, que en el cas del ratolí es troba glicosilat prop del seu extrem N-terminal (*Moore i col., 1990; Mosmann i col., 1990*). La principal funció d'aquesta citocina sembla ser la de controlar i finalitzar la resposta inflamatòria:

suprimint l'expressió de citocines proinflamatòries (com IL-1 β , TNF- α i IL-6), de molècules d'adhesió (com ICAM-1) i de molècules presentadores d'antigen com MHC-II (complex de histocompatibilitat classe II) en macròfags, neutròfils i cèl·lules T (*Moore i col., 2001*).

A banda de les anteriors accions induïdes per les citocines proinflamatòries, més relacionades amb les reaccions immunes, també produeixen l'activació del sistema nerviós. Aquest fet és essencial per a una correcta recuperació de la infecció, ja que s'inicien tota una sèrie de mecanismes antiinflamatoris dirigits a aturar la resposta inflamatòria generada, que en cas contrari podria evolucionar cap a xoc sèptic. En aquesta línia s'ha detectat com es produeix un augment de la susceptibilitat a les citocines (i també a l'LPS) a animals que tenen l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) deficient (adrenolectomitzats o hipofisectomitzats) (*Kapcala i col., 1995*).

Molts estudis han analitzat la relació existent entre el sistema immune i el sistema nerviós central (SNC). Les primeres evidències de que el sistema immune i els seus productes podien actuar sobre el SNC ja van ser identificades per Besedovsky i col·laboradors a mitjans de la segona meitat del segle XX (*Besedovsky i col., 1979*). A posteriori s'ha pogut descriure com durant la resposta immune certes citocines (TNF- α , IL-1 β i IL-6) poden actuar sobre el cervell a través de la via depenent de CRH i produir així tant l'activació de l'eix HPA com el SNS (*Sapolsky i col., 1987; Kovacs i Elenkov, 1995*), tal i com es pot observar a la figura 1.9. El SNS també pot ser activat a través de senyals aferents del nervi vagus provinents de inflamacions més localitzades (*Maier i col., 1998*).

Els productes de secreció d'aquestes dos vies, els glucocorticoides (provinents de l'activació de l'eix HPA) i les catecolamines (provinents de l'activació del SNS) juguen un paper molt important en l'evolució de la resposta inflamatòria ja que actuen com a factors antiinflamatoris. Els glucocorticoides mitjançant la unió als receptors de glucocorticoides tipus II, localitzats a les cèl·lules dels teixits limfàtics com la melsa i el timus (*Lowy, 1989; Spencer i col., 1991*), produeixen els seus efectes inhibitoris, en particular és important la reducció que produeixen en l'expressió de citocines i de molècules d'adhesió cel·lular (*Almawi i col., 1996; Cato i Wade, 1996*). Per la seva banda s'ha observat que una elevada activitat simpàtica, i l'increment de catecolamines corresponent, estimula la secreció de la IL-10 depenent de receptors β -adrenèrgics, des dels monòcits (*Van der Poll i col., 1996; Woiciedrowsky, 1998*).

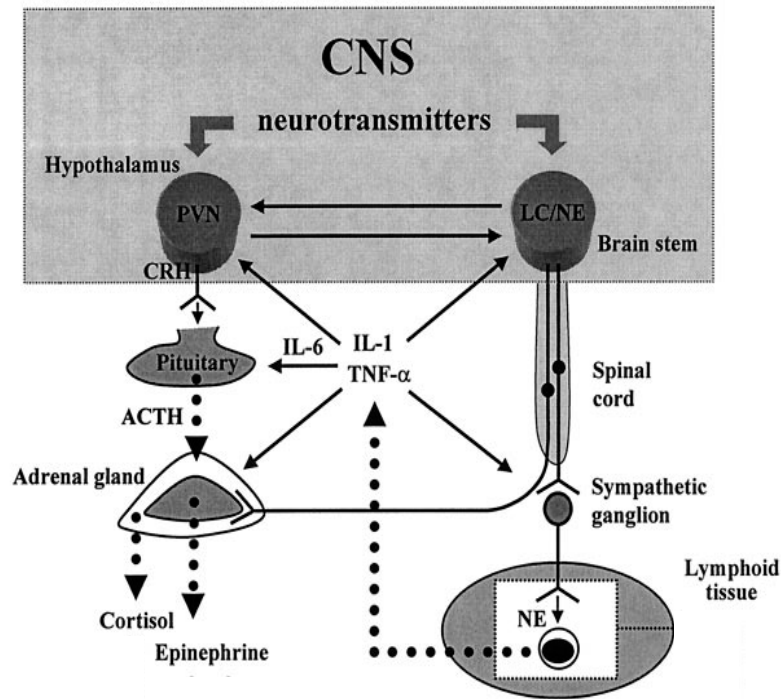


Figura 1.9.- Representació gràfica de la relació existent entre el sistema immunitari i el sistema nerviós central. L'activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) i del sistema nerviós simpàtic (SNS) per determinades citocines, com el TNF- α , la IL-1 β i la IL-6, produeix l'alliberació de glucocorticoides (cortisol/corticosterona) i catecolamines (**Epinephrine**, adrenalina; **NE**, noradrenalina) que per la seva banda actuen com a factors antiinflamatoris. **CNS**, sistema nerviós central; **PVN**, nucli paraventricular; **LC/NE**, locus ceruleus. Línies sòlides, projeccions neuronals; Línies puntejades, influències hormonals. Adaptat de Elenkov i col·laboradors (*Elenkov i col., 2000*).

Més recentment també ha estat descrita la importància del nervi vagus durant l'inflamació. L'anomenat "reflex inflamatori" a través de vies eferents del nervi vagus produeixen una resposta antiinflamatòria més ràpida i més localitzada als teixits on s'ha originat el dany (*Tracey, 2002*).

1.4.2.3. Lesions tissulars induïdes per l'administració d'endotoxina bacteriana.

Tal i com s'ha indicat anteriorment l'administració d'endotoxina bacteriana s'ha utilitzat per mimetitzar la resposta inflamatòria de l'organisme davant d'una infecció bacteriana. El fetge és un òrgan clau durant aquesta resposta inflamatòria ja que suposa la primera barrera per frenar l'agressió generada per l'LPS gràcies a l'activació de les cèl·lules de Kupffer (macròfags residents). Però si aquesta resposta és exagerada, i es sobrepassa la capacitat detoxificant del

fetge, molts altres òrgans es poden veure afectats, entre ells el cor, els pulmons, els ronyons i el cervell, produint el que es coneix amb el nom de síndrome de disfunció multiorgànica.

En clínica el model d'administració d'endotoxina bacteriana resulta molt útil ja que encara avui en dia existeix una elevada mortalitat associada a aquesta errada multiorgànica que es produeix durant el xoc sèptic.

Per a la generació d'una correcta resposta inflamatòria el fetge juga un paper fisiològic molt important ja que inicia la resposta inflamatòria i s'encarrega de la detoxificació de l'LPS. Tant les cèl·lules de Kupffer com els hepatòcits poden reconèixer l'LPS a través del receptor TLR4, i l'estimulació d'aquestes cèl·lules provoca l'alliberament de citocines i radicals lliures (*Fox i col., 1989; Liu i col., 1998; Fearnly i col., 1995*).

Estudis realitzats tan "in vitro" (*Iwai i col., 2001*) com "in vivo" (*Adachi i col., 1994*) han demostrat la importància de les cèl·lules de Kupffer en la generació de la resposta inflamatòria. Mitjançant la utilització de clorur de gadolini ($GdCl_3$), substància que destrueix específicament aquestes cèl·lules (*Hardonk i col., 1992*), s'ha pogut observar que no es produeix resposta a l'endotoxina bacteriana: no hi ha secreció de citocines al plasma i s'evita l'aparició de lesions hepàtiques. Per tant l'activació d'aquestes cèl·lules és un punt molt important en l'inici dels esdeveniments que tenen lloc durant la resposta inflamatòria.

Un cop activades, les cèl·lules de Kupffer produeixen i segreguen un conjunt de mediadors proinflamatoris (*Su, 2002*). Entre aquests mediadors, destaca la secreció de la citocina TNF- α , que jugarà un paper clau en la generació de lesions hepàtiques en el model de patogènesis induïda pel tractament amb LPS i galactosamina (*Bradham i col., 1998*). L'administració d'anticossos anti-TNF (*Hishinuma i col., 1990*) fa que la resposta inflamatòria no progressi i permet protegir l'animal de la toxicitat letal induïda per l'LPS. Els efectes citotòxics del TNF- α són mediatos pel seu receptor TNFR1. Així queda demostrat en estudis realitzats amb *Knock Out* per aquest receptor, ja que els animals es tornen resistents a dosis letals d'endotoxina (*Rothe i col., 1993; Pfeffer i col., 1993*).

La importància d'altres citocines durant la resposta inflamatòria, com la IL-1 β i la IL-6, també ha estat investigada gràcies a la generació d'animals *Knock Out*. En aquesta línia s'ha descrit la importància de la IL-1 β alhora de produir febre en resposta a l'endotoxina, mentre que la

IL-6 no afecta aquest procés (Kozack i col., 1998). El paper de la IL-6 en la resposta inflamatòria depèn molt del model emprat. Així, mentre que en animals *Knock Out* per la IL-6 es redueix considerablement la inducció de proteïnes de fase aguda, la pèrdua de pes corporal i l'hipoglucèmia induïda per l'administració de turpentina (Alonzi i col., 1998), indicant un paper proinflamatori per la IL-6, altres estudis suggereixen una acció de citocina antiinflamatòria. En animals *Knock Out* per la IL-6 l'administració de LPS produeix tres vegades més TNF- α que als animals controls, però en canvi aquests animals desenvolupen anorexia, pèrdua de pes corporal i hipoglucèmia, indicant que en aquest model la IL-6 no és necessària per a la resposta inflamatòria (Tilg i col., 1997).

Un cop alliberat el TNF- α s'uneix al seu receptor present a l'hepatòcit, majoritàriament a TNFR1 que és el que predomina a fetge, i s'indueix la trimerització i activació d'aquest. Com a conseqüència s'activen diverses vies de senyalització que indueixen tant mecanismes proapoptòtics com antiapoptòtics (Hoek i Pastorino, 2002; Ding i Yin, 2004). Entre les vies proapoptòtiques induïdes pel TNF- α es troben: (a) la via RIP-TRAF6 (Bernardi i col., 2001), (b) la via de les proteïnes cinases activades per l'estrès (*stress-activated protein kinase* o SAPK) (Wajant i col., 2001) i (c) la més ben caracteritzada via TRADD-FADD (Yin, 2000), que provoca l'activació de la caspasa 8. La diana final de totes aquestes cascades és la mitocondria, ja que queda afectada la seva permeabilitat de membrana i com a conseqüència s'inicia el programa de condensació i degradació de la cromatina característic de l'apoptosi (Kroemer i Reed, 2000).

Al mateix temps, l'activació de TNFR1 inicia respostes citoprotectores als hepatòcits a través d'altres vies de senyalització, com l'activació de la via PI3-cinasa (Pastorino i col., 1999). En aquesta via antiapoptòtica és molt important l'activació de NF- κ B, ja que s'indueix l'expressió de molècules específiques que inhibeixen la citotoxicitat provocada pel TNF- α (Beg i Baltimore, 1996). Però en el model d'administració de LPS i galactosamina, el bloqueig de la transcripció induït per la galactosamina interfereix amb l'expressió de gens per part de l'NF- κ B, i per aquest motiu es transduïxen preferentment les senyals apoptòtiques (Kosai i col., 1999).

El TNF- α també indueix l'alliberació d'altres citocines (IL-6), quimocines, la òxid nítric sintasa i determinades molècules d'adhesió com ICAM-1, VCAM-1 i p-selectina (Bradham i col., 1998). Totes aquestes proteïnes són essencials per tal que es produeixi la infiltració de neutròfils dins del parènquima hepàtic i la posterior activació d'aquests (Klebanoff i col., 1986; Philip i Epstein, 1986). La seqüència d'esdeveniments seria: inicialment es produeix el reclutament de neutròfils als sinusoides hepàtics, a continuació té lloc la transmigració endotelial d'aquests

neutròfils gràcies a l'expressió de VCAM-1 en les cèl·lules sinusoidals, endotelials i cèl·lules de Kupffer, primer, i l'expressió de ICAM-1 en hepatòcits, després. Seguidament es produeix l'adherència dels neutròfils als hepatòcits, el que provoca apoptosi i a continuació necrosi. Però com en el model d'administració de LPS i galactosamina (LPS/D-GalN) el TNF- α ja ha provocat apoptosi abans de la transmissió (*Jaeschke i col., 1998*) encara s'amplifica molt més el dany necròtic al fetge.

Per altra banda també s'ha detectat que durant l'endotoxèmia es produeixen alteracions del flux sanguini portal i sinusoidal al fetge (*Secchi i col., 2000*) i es creu que aquestes alteracions del flux sanguini causarien les disfuncions a hepatòcits i cèl·lules de Kupffer que portarien a aquests tipus cel·lular a l'alliberament de radicals lliures de forma exagerada, empitjorant encara més les lesions produïdes (*Jirillo i col., 2002*).

Com a conseqüència de la destrucció del teixit hepàtic, es veu disminuït el rentat (*clearance*) de l'LPS, i per aquest motiu molts altres òrgans es poden veure afectats directament per l'endotoxina, entre ells el cor (*Parker i Adams, 1985; Romanosky i col., 1986; Chagnon i col., 2005*), els pulmons (*Spöhr i col., 2005; Jacobson i col., 2005*), els ronyons (*Lortie i col., 2004*) i el cervell (*Ambrosini i col., 2005*).

Però indirectament l'LPS també afecta a aquests mateixos òrgans, a través dels mediadors generats pel fetge. Les citocines generades per la endotoxina bacteriana indueixen iNOS (isoforma induïble de la òxid nítric sintasa) (*Moncada i col., 1991; Wang i col., 2004*). L'augment de iNOS a diferents òrgans i teixits resulta en un increment de òxid nítric (NO). Aquest NO provoca vasodil·latació sistèmica i com a conseqüència una hipotensió que acaba afectant a moltes funcions orgàniques (*Johnson i Billiar, 1998*). Per una banda aquesta disminució de la pressió sanguínia provoca un increment del treball cardíac i una activació del SNS i del sistema renina-angiotensina, que es combina per mantenir la pressió i compensar així la resistència vascular sistèmica generada durant l'endotoxèmia (*Wang i col., 2004*). Però els efectes vasoconstrictors induïts per l'angiotensina II i les catecolamines resulten nocius al ronyó, on es produeix una vasoconstricció que fa disminuir el grau de filtració glomerular i pot arribar a induir una trombosi glomerular (*Schwartz i Blantz, 1999*). També, i com a conseqüència de la vasodilatació generada per NO, s'altera el tonus vascular al pulmó (*Spöhr i col., 2005*) i al tracte gastrointestinal (*Suliburk i col., 2005*), on es produeix l'acumulació de fluïds a la llum gàstrica.

Objectius

L'estrès s'entén com un estat que amenaça l'homeòstasi de l'organisme (*Stratakis i col., 1995*). Els agents inductors d'aquest fenomen, els agents estressants, ja siguin emocionals o físics, provoquen l'activació del sistema simpàtic medul·lo-adrenal i de l'eix hipotàl·lem-pituitària-corticoadrenal (*Stratakis i col., 1995*). Estudis previs realitzats al nostre laboratori (*Grau i col., 1994*) havien demostrat que les catecolamines estimulen la secreció d'EGF des de les glàndules submaxil·lars (SMG) cap a la sang i que una bona part d'aquest EGF és aclarit pel fetge. Posteriorment Maria Pau Mena i jo mateixa vàrem poder comprovar que la immobilització, tant provocada per la fixació de les extremitats del ratolí amb cinta adhesiva a una superfície rígida (*Mena, 1999*), com la restricció de moviment per la introducció de l'animal en un cilindre ajustable (*Sánchez, 1999*), comportava un increment de la concentració plasmàtica d'EGF.

Quin és el significat biològic de la relació entre estrès, EGF i el fetge? Sabíem que l'EGF interfereix alguns mecanismes implicats en els efectes metabòlics de les catecolamines en el fetge (*Grau i col., 1997*). Però els efectes que s'havien observat no semblaven donar resposta prou satisfactòria a la pregunta. Alguns estudis publicats a principis dels 2000 ens van orientar cap a la hipòtesi central d'aquesta Tesi Doctoral. Així, es va descriure que l'administració exògena d'EGF millorava les lesions hepàtiques provocades per les endotoxines (*Cho i col., 2000*) o per la ingesta crònica d'alcohol (*Deaciuc i col., 2002*). Com en el nostre laboratori Anna Arnau havia demostrat que l'estrès per immobilització provocava lesions a diferents teixits (*Arnau, 1999*), ens hem plantejat com a hipòtesi fonamental que la secreció aguda d'EGF que té lloc en l'estrès podria tenir una funció hepatoprotectora. És a dir, podria estar evitant, o reduint la gravetat de les lesions cel·lulars provocades per les catecolamines o altres components de la resposta a l'estrès.

Donat que Eva Nexo havia descrit ja alliberament d'EGF d'una magnitud molt superior en altres models d'estrès (comportament agressiu) (*Nexo i col., 1981*), hem començat estudiant un model d'estrès emocional. Concretament hem utilitzat el paradigma "intrús-resident" i hem analitzat l'efecte de l'agressió provocada per la confrontació d'animals prèviament aïllats. Després hem utilitzat un model d'estrès físic com és l'administració d'endotoxina bacteriana. Hem volgut caracteritzar ambdós models mesurant paràmetres que il·lustren la situació d'estrès i estudiant la cinètica de secreció de l'EGF. També hem analitzat l'existència de dany cel·lular a partir de la determinació d'enzims i de l'observació de preparacions histològiques. Per testar la nostra hipòtesi principal hem analitzat els canvis provocats per l'extirpació prèvia de les glàndules submaxil·lars (sialoadenectomia). En alguns casos hem estudiat també l'efecte de l'administració exògena d'EGF, o de sèrum anti-EGF, o d'un inhibidor de l'activitat tirosina-cinasa del receptor d'EGF.

Materials i mètodes

3.1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ

Per a la realització dels experiments es van utilitzar ratolins mascles SWISS-CD1 procedents de HARLAN INTERFAUNA IBÈRICA, S.A. (Barcelona), amb un pes corporal de 35-40 grams. Aquests animals arribaven a l'estabulari de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i eren traslladats immediatament a una cabina-estabulari situada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la mateixa facultat. Després del període d'adaptació (4-5 dies) eren utilitzats pels diferents experiments. La cabina-estabulari es troba dividida en dos espais: una cambra d'estabulació i una avantcambra per a la manipulació, separades per una porta. Ambdós espais estan insonoritzats per tal d'evitar l'estrès dels animals. A l'avantcambra de la cabina-estabulari es realitzava el control dels animals, el canvi de gàbies i els preparatius dels diferents experiments realitzats (períodes de confrontació, administració de LPS, etc.). A la cambra d'estabulació els ratolins es mantenien sota un cicle constant de 12 hores de llum (8:00 a 20:00 hores) i 12 hores de foscor. La temperatura es va mantenir als 23 ± 2 °C i amb una humitat que oscil·lava entre 45 - 55%.

Abans d'ésser utilitzats en algun dels experiments indicats a l'apartat 3.2 els animals es mantenien en gàbies de (51 x 27.5 x 14.5 cm, 14,02 dm² de superfície) en nombre de cinc ratolins/gàbia, amb lliure accés a l'aigua i al pinso, CRIA-A03 (*Panlab, S.L.*). La composició del pinso CRIA-A03 era el següent: humitat (12%), proteïnes (21%), greixos (4.5%), glúcids (52.4%), fibra (4.1%) i minerals (6%).

Els procediments amb animals que es van seguir en aquest treball van ser autoritzats pel Comitè Ètic i de Benestar Animal de la Universitat de Barcelona. En el model d'estrès social, el procediment fou autoritzat també pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

3.2. MODELS EXPERIMENTALS.

3.2.1. Un model d'estrès social: confrontació entre mascles).

L'estrès agut que vam estudiar va ser el que patien els ratolins durant els episodis de lluita que tenien lloc quan s'enfrontaven dins d'una gàbia de dimensions reduïdes. Per potenciar l'enfrontament vam fer servir el paradigma "intrús-resident", consistent en introduir un ratolí anomenat *intrús* dins de la gàbia d'un altre animal, anomenat *resident* (Martínez i col., 1998b).

3.2.1.1. Estudi de les alteracions durant la confrontació entre mascles.

Cadascun dels *residents* va ser aïllat en sengles gàbies petites (27.5 x 27.5 x 14.5 cm, 7,56 dm² de superfície) durant un període de temps de 15 dies, abans que tingués lloc l'enfrontament. Amb posterioritat, i nou dies abans de l'enfrontament es van separar en gàbies individuals (gàbies de 14,02 dm² de superfície) dos grups d'animals, els que serien els futurs *intrusos* i els *controls* (aquests últims no lluitarien).

Es van establir uns períodes de lluita de 30, 60 o 180 minuts, corresponent al temps que deixàvem l'*intrús* dins la gàbia del *resident*. Un cop passat el temps indicat en cada condició, el ratolí que havia estat l'*intrús* es treia de la gàbia i es procedia al seu sacrifici. Simultàniament es sacrificaven animals del grup control. Tots els animals foren sacrificats entre les 11:00 i les 12:00 hores.

L'animal anomenat *resident* es deixava dins de la seva gàbia i eren retornats a la cambra d'estabulació. Aquests animals van ser reutilitzats durant tots els dies que va durar l'experiment, prenent la precaució de que cada dia fossin sotmesos a un temps diferent d'exposició a l'*intrús*. El *resident* que un dia havia lluitat 30 minuts, l'endemà ho feia 60 minuts i a l'altra 180 minuts. Així tots els *residents* van participar de tots els grups experimentals de confrontació.

Sacrificats els animals es procedia a l'extracció i processament de les mostres segons el descrit a l'apartat 3.3.

3.2.1.2. Estudi de la recuperació després de la confrontació entre mascles.

Per l'estudi de la recuperació després de l'aplicació d'estrès per confrontació de forma aguda vam establir un únic període de lluita de 180 minuts. Finalitzat aquest temps l'animal *intrús* era retornat de nou a la seva gàbia (14,02 dm²) on realitzava un període de recuperació post-estrès de 0, 5 o 21 hores. Durant aquest temps, tenien lliure accés a l'aigua i al pinso. Passat aquest temps de recuperació els animals eren sacrificats. Paral·lelament també eren sacrificats els animals *controls* (animals aïllats però que no havien lluitat).

Tots els animals van ser sacrificats entre les 13:00 i les 14:00 hores, i l'extracció i processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3. A més el tros de fetge seleccionat per histologia era processat tal i com es descriu a l'apartat 3.12.

3.2.1.3. Habitució a l'estrès provocat per la confrontació entre mascles.

Per tal d'induir l'habitució en el model d'estrès per confrontació, els animals *intrusos* van ser sotmesos a un període de lluita de 180 minuts diaris durant quatre dies consecutius. Finalitzat cada període de confrontació l'animal *resident* es deixava dins de la seva gàbia (7,56 dm²) i l'animal *intrús* tornava a la seva gàbia original (14,02 dm²). Per evitar que disminuís la intensitat i els episodis de confrontació vam prendre la precaució de canviar diàriament la parella *intrús-resident*, d'aquesta manera un intrús no estava en contacte més d'una vegada amb un mateix *resident*.

El cinquè dia, els animals *intrusos* habituats a l'estrès per confrontació van ser dividits en tres grups segons el període de lluita al que eren sotmesos. El primer grup van ser sacrificats sense lluitar. El segon grup va lluitar durant un període de temps de 60 minuts i l'últim grup d'animals va lluitar durant 180 minuts, i a continuació eren sacrificats. Simultàniament eren sacrificats un grup d'animals no sotmesos a episodis de confrontació prèvia però que si havien estat aïllats, grup control.

Tots els animals foren sacrificats entre les 13:00 i les 14:00 hores, i l'extracció i el processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3.

3.2.1.4. Estudi de l'acció de l'EGF sobre les lesions hepàtiques produïdes per la confrontació entre mascles.

Experiments amb animals sialoadenectomitzats.

La sialoadenectomia és una operació quirúrgica consistent en l'extirpació de les glàndules salivals submaxil·lars (SMG). Així eliminem la principal font de síntesi i secreció del Factor de Creixement Epidèrmic en el ratolí (*Fisher i Lakshmanan, 1990*).

Els animals eren anestesiats mitjançant la injecció intraperitoneal (1.5mL/kg) d'una solució ketamina (*Imalgène 1000[®], Merial*)/xilacina (*Rompún[®], Bayer*) amb una combinació 3 a 1. L'ús d'aquest anestèsic (ketamina) combinat amb un relaxant muscular (xilacina), permet la ràpida recuperació dels animals després de l'operació.

A continuació, un cop l'animal era ben adormit, es col·locava sobre una superfície plana en posició supina, lligàvem les dues extremitats anteriors i realitzàvem una petita incisió al coll per tal d'exposar les glàndules submaxil·lars. Seguidament s'estirava d'elles cap a l'exterior amb molta cura per poder lligar-les amb un fil; el nus es lligava al nivell de les venes que irriguen les glàndules que immediatament s'extirpaven fent un tall per sobre d'aquest nus. Netejàvem molt bé la ferida amb PBS i aplicàvem sulfanilàmida en pols (*Laboratorios Andreu*) per evitar infeccions. Un cop fet això tancàvem la incisió amb dos o tres punts de sutura, netejàvem amb PBS les restes de sang, aplicàvem de nou sulfanilàmida i deixàvem els animals recuperar-se de la operació sota una font de calor per tal d'evitar l'hipotèrmia. Aquests animals sense glàndules submaxil·lars s'anomenaren sialoadenectomitzats (SIALO).

Un altre grup d'animals patien una operació simulada en la qual se seguia el mateix protocol que la sialoadenectomia amb la diferència de que les glàndules submaxil·lars eren exposades, però ni lligades ni extirpades. Aquests animals s'utilitzaren com a grup control i els anomenarem operació simulada (OS).

Un cop realitzades totes les operacions els animals es posaven en gàbies grans (14,02 dm² de superfície) que tenien una reixeta, per evitar que la ferida pogués infectar-se en contacte

amb els encenalls. Es posaren tres animals per gàbia i durant les primeres 24 hores es van mantenir en dejuni per tal d'uniformitzar les diferències d'ingesta que es donen just després de l'operació. Abans d'iniciar l'experiment de confrontació es deixaven durant tres setmanes en les condicions d'estabulació esmentades, amb lliure accés al beure i al menjar, per tal de recuperar-se de l'operació.

Per fer l'estudi de la resposta a l'agressió en ratolins sialoadenectomitzats era necessari tenir 5 grups d'animals:

- Un grup d'animals *residents* o agressors, els quals no havien estat sotmesos a cap operació. Per tenir ratolins agressors vam aïllar ratolins d'un pes aproximat de 40 grams, cadascun en sengles gàbies petites (7,56 dm² de superfície), durant un període de 21 dies, abans d'iniciar l'experiment.
- Dos grups d'animals *intrusos* o agredits, un de ratolins SIALO i altre d'OS. Abans d'utilitzar-los com a *intrusos* eren aïllats durant 15 dies en gàbies de 14,02 dm² de superfície. El pes d'aquests animals era d'uns 35 grams.
- Dos grups d'animals *controls*, un de ratolins SIALO i un altre d'OS, amb un pes de 35 grams, es mantenien en les mateixes condicions esmentades que els futurs els *intrusos*, és a dir, també van ser aïllats durant 15 dies.

Transcorreguts els períodes d'aïllament de tots els grups experimentals, s'iniciava l'experiment de confrontació, en el qual l'*intrús* (OS o SIALO) estava en contacte amb el *resident*, dins de la gàbia d'aquest últim durant un període de 180 minuts. Passat aquest temps, l'*intrús* es treia de la gàbia i es procedia al seu sacrifici. Paral·lelament també se sacrificaven animals *controls* (SIALO i OS), que també havien estat aïllats però no van ser enfrontats als residents. Tots els animals foren sacrificats entre les 13:00 i les 14:00 hores.

Acabada la confrontació l'animal anomenat *resident* retornava a la cambra d'estabulació. Aquest grup d'animals va ser reutilitzat durant tots els dies que va durar l'experiment, prenent la precaució que cada dia lluitessin amb un animal que hagués patit una operació diferent. De forma que si un dia l'*intrús* era un animal SIALO, a l'endemà ho era un animal OS.

L'extracció i processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3.

Experiments amb anticossos anti-EGF.

En aquest estudi eren necessaris tres grups d'animals: *residents*, *intrusos* i *controls*. Les condicions d'estabulació i aïllament d'aquests animals es van fer seguint les indicacions descrites a l'apartat 3.2.1.1.

En aquest experiment els animals *intrusos* van ser sotmesos a un període de lluita de 180 minuts. Prèviament aquests van ser dividits en quatre grups segons el tractament que havien rebut:

- grup *PBS*, animals injectats amb 100 µL de PBS per via intraperitoneal 10 minuts abans del període de confrontació;
- grup *subcutani* o SC, animals injectats amb 150 µL de sèrum de conill anti-EGF de ratolí (obtingut al nostre laboratori) per via subcutània 48 hores abans del període de confrontació;
- grup *intraperitoneal* o IP, animals injectats amb 100 µL de sèrum de conill anti-EGF de ratolí per via intraperitoneal 2 hores abans del període de confrontació;
- grup *intravenós* o IV, animals injectats amb 10 µg d'anticòs neutralitzant contra l'EGF (*UPSTATE, EGF neutralizing rabbit polyclonal antibody*) dissolt amb PBS per via intravenosa 1 hora abans del període de confrontació.

Finalitzat el període de confrontació tots els animals *intrusos* i *controls* (animals aïllats però que no van lluitar) foren sacrificats. Tots els sacrificis es van realitzar entre les 13:00 i les 14:00 hores, i l'extracció i processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3.

Experiments amb la tirfostina AG-1478.

Per analitzar l'acció de la tirfostina AG-1478 (*Calbiochem*) (inhibidor específic de l'activitat tirosina-cinasa de ErbB1) en l'estrès social van ser necessaris tres grups d'animals: *residents*, *intrusos* i *controls*. Les condicions d'estabulació i d'aïllament d'aquests animals es van fer seguint les indicacions descrites a l'apartat 3.2.1.1.

El període de confrontació establert per al grup d'animals *intrusos* va ser de 180 minuts. Aquests van ser injectats amb tirfostina AG-1478 (0.25 mg/kg per via intraperitoneal dissolta en dimetilsulfòxid (*AnalytiCal, CARLO ERBA S.A.*) al 10% en aigua destil·lada) o bé amb 100 µL de PBS, 20 minuts abans de l'aplicació de l'estímul estressant. Finalitzat el període de lluita els animals *intrusos* foren sacrificats. Simultàniament eren sacrificats el grup d'animals *controls*, els quals havien estat aïllats però no havien lluitat.

El sacrifici es realitzava entre les 13:00 i les 14:00 hores, i l'extracció i processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3.

3.2.2. Un model d'estrès físic-immune: injecció d'endotoxina bacteriana (LPS).

Per aquest estudi, els ratolins eren injectats amb una dosi coneguda d'endotoxina bacteriana o lipopolisacàrid (LPS). Aquest model queda englobat dins del que es coneix com estrès físic-immune perquè el lipopolisacàrid és un potent activador de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) (*Takemura i col., 1997*) que provoca una resposta immediata de l'organisme, ja que actua a través de centres que connecten directament amb el nucli paraventricular de l'hipotàl·lem (PVN) (*Herman i Cullinan, 1997*). Els mecanismes pels quals el LPS activa l'eix HPA són molt complexes, ja que es necessita la transducció de senyals per diferents tipus cel·lulars localitzats dins i fora de la barrera hematoencefàlica, les quals són activades pel mateix LPS o per les citocines que aquest genera perifèricament (*Turnbull i Rivier, 1999; Rivest i col., 2000; Rivest, 2001*).

El ratolí és força resistent a l'efecte citotòxic de l'endotoxina bacteriana. És freqüent administrar-la conjuntament amb D-Galactosamina (inhibidor de la transcripció) per tal de potenciar els seus efectes (*Morikawa i col., 1996; Endo i col., 1999; Freudenberg i col., 2001; Sass i col., 2002*).

*** Reactius.**

- D-Galactosamina (D-GalN) (*Calbiochem*)
- Lipopolisacàrid (LPS) de *Salmonella Abortus Equii* (*Sigma*)

* Preparació de les solucions de treball.

- Solució de D-GalN.- a partir del producte comercial liofilitzat es preparava una solució de 150 mg/mL amb PBS. Aquesta solució era preparada en fresc el dia de la seva utilització.

- Solució de LPS.- a partir del producte comercial liofilitzat es preparava una solució mare de 10 mg/mL amb aigua destil·lada. Aquesta solució era al·liquotada i conservada a -20°C fins al dia de la seva utilització.

- Solució LPS/D-GalN.- el dia de l'experiment descongelàvem la solució mare de LPS (10 mg/mL) i preparàvem la solució de D-GalN. Les diferents dosis a injectar es preparaven diluint l'LPS amb la solució de D-GalN.

* Ajust de les dosis de LPS.

L'endotoxina l'administràvem per via intraperitoneal. El volum a injectar a cada animal per obtenir finalment la dosi desitjada el vam obtenir mitjançant la fórmula: $\text{volum } (\mu\text{L}) = \text{pes corporal (g)} \times 5 \mu\text{L/g}$. Així, per un ratolí de 40 grams, havíem d'injectar 200 μL .

Per aquest motiu tant les diferents dosis de LPS com la solució de galactosamina apareixen expressades sempre per Kg de pes corporal. En el cas dels animals control vam aplicar la mateixa fórmula emprada pels injectats amb LPS a l'hora de calcular el volum de PBS a injectar. D'aquesta manera el volum final injectat era sempre el mateix, independentment del tractament que rebien.

3.2.2.1. Estudi preliminar: dosi letal 50.

Per a la realització d'aquest experiment els animals van rebre la injecció d'una solució d'endotoxina bacteriana per via intraperitoneal. Es preparaven diferents dosis de lipopolisacàrid de 1, 3, 10, 30, 100 i 300 $\mu\text{g/kg}$, totes elles combinades amb D-Galactosamina (750 mg/kg). El grup d'animals control (dosi 0 $\mu\text{g LPS/kg}$) rebia la injecció d'un volum equivalent de PBS també per via intraperitoneal.

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i seguidament eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. Vam anar controlant la supervivència de tots els animals a les 4, 8, 24 i 48 hores després de la injecció. Finalitzada l'observació de les 48 hores els

animals que havien sobreviscut a la injecció del lipopolisacàrid eren sacrificats. D'aquests animals no vam extreure cap mostra ja que únicament volíem realitzar el seguiment de la supervivència.

3.2.2.2. Estudi preliminar d'hepatotoxicitat: dosi-resposta.

Els animals van rebre la injecció d'una solució d'endotoxina bacteriana per via intraperitoneal. Es preparaven les diferents dosis de lipopolisacàrid de 3, 30 i 300 µg/kg totes elles combinades amb D-Galactosamina (750 mg/kg). Paral·lelament un grup d'animals control rebia la injecció d'un volum equivalent de PBS també per via intraperitoneal.

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i seguidament eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. A les 8 hores d'haver rebut la injecció tots els animals eren sacrificats i es procedia a l'extracció i processament de les mostres segons el descrit a l'apartat 3.3.

3.2.2.3. Evolució temporal dels marcadors de lesió hepàtica.

Un cop observades quines alteracions eren provocades per la injecció de lipopolisacàrid vam voler analitzar com evolucionava al llarg del temps el dany hepàtic que s'havia provocat. Per a la realització d'aquest experiment els animals van rebre la injecció d'una dosi de 10 µg LPS/kg combinada amb D-Galactosamina (750mg/kg) per via intraperitoneal. Paral·lelament el grup d'animals control van rebre la injecció d'un volum equivalent de PBS.

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. Els animals injectats amb endotoxina bacteriana i amb PBS van ser sacrificats a les 8, 24 i 48 hores després d'haver rebut la injecció. L'extracció i processament de les mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3.

3.2.2.4. Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència dels animals tractats amb endotoxina bacteriana.

Passades tres setmanes des de la intervenció quirúrgica els animals OS i SIALO van rebre la injecció d'una dosi de 100 µg LPS/kg combinada amb D-Galactosamina (750mg/kg) per via intraperitoneal.

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. Vam anar controlant la supervivència d'aquests animals durant les 48 hores posteriors a la injecció (a les 8, 24 i 48 hores). Els animals supervivents d'aquesta primera injecció es van deixar a les seves gàbies, i es va procedir a extreure sang de la cua 7 i 12 dies després.

Passades dues setmanes des de la primera injecció els animals ja estaven totalment recuperats i van rebre una segona injecció d'una dosi de 100 µg LPS/kg combinada amb D-Galactosamina (750mg/kg). Seguint el mateix protocol establert per la primera injecció vam controlar la supervivència durant les 48 hores posteriors a la injecció. Finalitzat el període d'observació de 48 hores els animals supervivents van ser sacrificats.

3.2.2.5. Alteracions provocades per la sialoadenectomia en la resposta a l'endotoxina bacteriana.

Per realitzar aquest estudi van ser necessaris 4 grups d'animals: dos grups d'animals injectats amb lipopolisacàrid, un de ratolins SIALO i altre d'OS, i dos grups d'animals controls, un de ratolins SIALO i altre d'OS.

Passades 3 setmanes des de la intervenció quirúrgica un grup d'animals OS i altre de SIALO van rebre la injecció d'una dosi de 10 µg LPS/kg combinada amb D-Galactosamina (750mg/kg) per via intraperitoneal. De forma paral·lela un altre grup d'animals OS i altre de SIALO van rebre la injecció d'un volum equivalent de PBS (grup control OS i grup control SIALO).

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. Es van establir diferents períodes de sacrifici per als animals injectats amb endotoxina: 0, 45 minuts, 1.5, 3, 8 i 24 hores. L'extracció i processament de les

mostres es va fer segons el descrit a l'apartat 3.3. A més el tros de fetge seleccionat per histologia era processat tal i com es descriu a l'apartat 3.12.

3.2.2.6. Modifica l'EGF l'efecte hepatotòxic de l'endotoxina bacteriana?

Per a la realització d'aquest experiment els animals van rebre la injecció d'una dosi de 10 µg LPS/kg combinada amb D-Galactosamina (750mg/kg) per via intraperitoneal. Immediatament aquests animals eren dividits en 4 grups segons el tractament que rebien:

- grup *PBS*.- animals injectats amb 100 µL de PBS, per via intraperitoneal;
- grup *EGF*.- animals injectats amb 5 µg d'EGF recombinant de ratolí (*Roche*) dissolt amb PBS, per via intraperitoneal.
- grup *DMSO 10%*.- animals injectats amb 100 µL de dimetilsulfòxid (*AnalytiCal, CARLO ERBA S.A.*) preparat al 10% amb aigua destil·lada, per via intraperitoneal.
- grup *AG-1478*.- animals injectats amb tirfostina AG-1478 (0.25 mg/kg dissolta en dimetilsulfòxid al 10% en aigua destil·lada), per via intraperitoneal.

De forma paral·lela un grup d'animals control (que no havien rebut la injecció d'LPS) va rebre una injecció d'un volum equivalent de PBS per via intraperitoneal.

Tots els animals eren injectats a les 9:00 hores i eren retornats a les seves gàbies amb lliure accés al beure i al menjar. A les 8 hores d'haver rebut la injecció intraperitoneal de l'hepatotòxic tots els animals eren sacrificats i es procedia a l'extracció i processament de les mostres.

3.2.3. Un model de fetge perfós: efecte de la infusió d'endotoxina bacteriana.

*** Fonament.**

Per tal d'estudiar l'efecte directe de l'LPS en el fetge vàrem fer perfusions del fetge aïllat d'animals SIALO i OS, adaptant al ratolí el mètode desenvolupat per Galan (*Galan, 1996*) per al fetge de rata.

*** Material.**

- Cabina termostatitzada : 38 ± 2 °C
- Bomba peristàltica (*Miniplus 2.Gilson*)
- Cànules de diferents mides: la més prima (*Critchley Electrical*. Australia. Diàmetre intern/extern: 0.50/0.80 mm) s'introduïa en la vena cava inferior, la més gruixuda (groc/blau, *AFORA*) donava el tomb al sistema de bombeig de l'aparell, i la d'un diàmetre intermedi (blanc/blanc, *AFORA*) acabava a l'interior del recipient que contenia el medi de perfusió
- Embut amb reixeta (receptacle del fetge aïllat)
- Xeringa de tuberculina de 1mL (*Rubilabor*)
- Material de cirurgia
- Placa de petri (*Rubilabor*)

*** Reactius.**

- Carbogen (O₂/CO₂, 95:5)
 - Solució d'heparina (*Sigma*), 2.5 mg/mL en PBS
 - Solució de pentobarbital sòdic (60mg/kg)
 - Solució salina tamponada amb fosfats (PBS): NaCl (*Panreac*) 137 mM, KCl (*Panreac*) 2.7 mM, KH₂PO₄ (*Panreac*) 1.5 mM i Na₂HPO₄ (*Panreac*) 8 mM, a pH=7.4.
 - Solució de pentobarbital sòdic 60 mg/Kg preparat amb PBS
 - Solució de Leivobitz: NaCl (*Panreac*) 136.8 mM, KCl (*Panreac*) 5.4 mM, KH₂PO₄ (*Panreac*) 0.44 mM, Na₂HPO₄·2H₂O (*Panreac*) 1.33 mM, MgCl₂·6H₂O (*Merck*) 0.98 mM, MgSO₄·7H₂O (*Merck*) 0.81 mM en AD
 - Solució d'aminoàcids i vitamines (x16.6):
 - * aminoàcids essencials (x50) (*Gibco*)
 - * aminoàcids no essencials (x100) (*Gibco*)
 - * L-Glutamina (x100) (*Gibco*)
 - * vitamines (x100) (*Gibco*)
- Barrejàvem 2 volums d'aminoàcids essencials + 1 volum d'aminoàcids no essencials + 1 volum de vitamines + 1 volum de L-Glutamina + 1 volum d'aigua miliQ, i guardàvem la solució fraccionada a - 20 °C

- D-Glucosa (*Panreac*) 1.5M en AD (x100)
- HEPES (*Roche*) 200 mM en AD (x10)
- CaCl₂ (*Panreac*) 130 mM en AD (x100)
- Solució d'albumina sèrica bovina (BSA) (*Sigma*): a 1% p/v preparada amb aigua miliQ
- Solució NaOH 5M
- D-Galactosamina (*Calbiochem*)
- Lipopolisacàrid (LPS) de *Salmonella Abortus Equii* (*Sigma*)

* Preparacions del medi i les condicions de perfusió.

El medi de perfusió era preparat cada dia en fresc a partir dels seus diferents components. Per tal de preparar 100 mL de medi de perfusió barrejàvem 10 mL de la solució de Leivobitz concentrada (10x), 1 mL de glucosa 1.5 M, 1 mL de CaCl₂ 130 mM, 10 mL d'HEPES 200 mM i 6 mL de la solució de vitamines i aminoàcids (16.6x). Afegíem uns 20 mL d'aigua destil·lada (AD) a la barreja i la posàvem a gasejar amb carbogen durant 20 minuts. Un cop passat aquest temps ajustàvem el pH amb la solució de NaOH 5M. A continuació afegíem 10 mL d'albumina sèrica bovina (BSA) concentrada (10x) i finalment enrrasàvem amb AD fins als 100 mL finals.

Un cop enllestit el medi de perfusió, el deixàvem atemperant-se dins la cabina termostatitzada connectat al carbogen, i ajustàvem el flux de la bomba peristàltica amb AD. D'aquesta manera ens asseguràvem que cada dia el flux era de 2 mL/min. Seguidament la bomba peristàltica era també introduïda dins la cabina termostatitzada i omplíem tot el sistema de cànules amb el medi de perfusió.

* Procediment.

A. Rentat i extracció del fetge.

Els animals eren anestesiats amb 100 µL d'una solució de pentobarbital sòdic dissolt en PBS per via intraperitoneal. Però prèviament, uns 10 o 15 minuts abans, els animals havien estat injectats amb 100 µL d'una solució d'heparina per tal de facilitar el rentat correcte del fetge. Un cop l'animal estava totalment adormit es col·locava en posició supina sobre una superfície plana i

enganxàvem les 4 extremitats amb cinta adhesiva. A continuació, li fèiem una laparotomia mitjana i apartàvem tot el paquet intestinal a la dreta per tal de deixar al descobert la vena cava inferior i l'aorta abdominal. Seguidament lligàvem les dues ramificacions de la vena cava inferior cap als ronyons, després, i amb l'ajut d'unes pinces, aïllàvem la vena cava inferior i l'artèria abdominal i passàvem dos fils per sota d'elles sense fer cap nus. El següent pas consistia en extreure sang de la vena cava inferior amb una xeringa heparinitzada i a continuació procedíem a la canul·lació d'aquesta mateixa vena amb una cànula de perfusió amb la punta biselada (connectada a la vegada a la bomba peristàltica), fent entrar la cànula fins a l'interior del fetge. Ràpidament lligàvem els dos fils a la vena canulada (per tal d'assegurar que quedés fixada) i procedíem a tallar el diafragma i obrir la caixa toràcica. Lligàvem la cava inferior al tram toràcic per sobre del fetge, tallàvem la vena porta i engegàvem la bomba peristàltica ajustada a un flux de 2 mL/min. Mentre l'òrgan s'anava rentant procedíem a eliminar tot el paquet intestinal de l'animal. Després extrèiem el fetge de l'animal amb molta cura i el col·locàvem a una placa de petri. Un cop aquí tallàvem els dos ronyons i deixàvem l'òrgan rentant-se fins assegurar-nos que estigués totalment net. El temps aproximat d'aquesta operació era d'uns 15 o 20 minuts.

B. Perfusió i recollida de mostres.

Acabat el rentat, l'òrgan era dipositat sobre una reixeta que estava situada dins d'un embut que havia estat habilitat com a receptacle pel fetge aïllat. Així podíem recollir el medi de perfusió eluït amb més facilitat.

Els fetges controls eren sotmesos a perfusió durant 180 minuts i recollíem l'eluït durant 1 minut cada 10 minuts. En el cas dels fetges tractats amb hepatotòxic, es feia una perfusió d'una solució de 0.1 µg d'LPS, 7.5 mg GalN/mL preparada amb el mateix medi de perfusió. La durada de la perfusió amb LPS era de 10 minuts des del minut zero. A continuació, els 170 minuts restants el fetge era perfós amb el medi sense LPS. Les mostres d'eluït eren recollides, també, durant 1 minut cada 10 minut fins al final de la perfusió. Previ a la congelació de les mostres, aquestes eren diluïdes amb albumina sèrica bovina (BSA) al 10% de manera que la concentració final de albúmina a la mostra fou del 3%. Aquesta dilució es realitzava per tal de mantenir l'activitat dels enzims en aquestes mostres que es congelaven a -20 °C fins el dia de la valoració.

3.3. EXTRACCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES.

* Material.

- Xeringa de tuberculina de 1mL (*Rubilabor*)
- Placa de petri (*Rubilabor*)
- Cinta adhesiva
- Fil de cotó
- Material de cirurgia
- Bomba peristàltica (*Miniplus 2, Gilson*)
- Cànula 0.5/0.8 mm (*Critchley Electrical, Australia*)
- Cànules de diferents mides (*AFORA*)
- Microcentrifuga (*Biofuge A-Heracus Spatech*)
- Bastonets de cotó
- Tub Falcon de 50 mL (*BECKTON DICKINSON*)

* Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució pentobarbital sòdic (60mg/Kg)
- Solució d'heparina (*Sigma*) (200 U/mL) preparada amb PBS
- Paraformaldehid 4%: paraformaldehid (*Panreac*) al 16% en tampó fosfat salí 0.1M (veure apartat 3.12)

* Procediment.

Per sacrificar els animals es procedia a la injecció de 100 µL de pentobarbital sòdic, dissolt en PBS, per via intraperitoneal. Un cop l'animal estava totalment adormit, es col·locava en posició supina sobre una superfície plana i se li immobilitzaven les extremitats anteriors i posteriors amb cinta adhesiva. A continuació, li realitzàvem una laparotomia mitjana i apartàvem el paquet intestinal cap a la dreta per tal de poder accedir a la vena cava inferior i l'aorta abdominal. Seguidament amb l'ajut d'unes pinces aïllàvem ambdues i passàvem un fil per sota però sense fer

cap nus. A més situàvem una espàtula per sota d'ambdós vasos sanguinis en el punt on seria introduïda l'agulla de la xeringa. En aquest punt, procedíem a l'extracció de sang de la vena cava inferior amb una xeringa heparinitzada, tot punxant per sota d'on teníem el fil. Un cop extreta la sang era recollida en un tub eppendorf i es deixava en gel fins a la seva posterior centrifugació.

Als primers experiments un cop havíem extret la sang, procedíem a l'extracció de teixits. Però degut al fet que vam començar a valorar l'activitat mieloperoxidasa al fetge va ser necessari la perfusió d'aquest teixit amb una solució PBS-heparina. Per a dur a terme la perfusió, vam utilitzar una bomba peristàltica que un cop graduada ens permetia tenir un flux constant de 5 mL/min. Acoblat a la bomba teníem un sistema de cànules de tres diàmetres diferents. La més prima (*Critchley Electrical*. Austràlia. Diàmetre intern/diàmetre extern: 0.50/0.80 mm) s'introduïa en la vena cava inferior de l'animal, la més gruixuda (Groc/blau. Diàmetre intern: 1.52 mm) envoltava el sistema de bombeig de l'aparell, i la d'un diàmetre intermedi (Blanc/blanc. Diàmetre intern: 1.02 mm) acabava a l'interior d'un tub on hi havia el PBS-heparina. Per iniciar la perfusió introduïem la cànula de menor diàmetre pel forat fet per l'agulla de la xeringa fins l'encreuament de la vena cava inferior amb les renals sense entrar al fetge. Llavors ens asseguràvem que la cànula quedés fixada a l'interior, fent un doble nus amb el fil que prèviament havíem passat per sota la vena cava inferior i l'aorta abdominal. A continuació tallàvem el diafragma de l'animal i obríem la cavitat toràcica per tal de poder arribar al tram toràcic de la vena cava inferior que també lligàvem amb un fil. Després tallàvem la vena porta i ràpidament connectàvem la bomba peristàltica durant aproximadament un minut. Aquest temps era suficient per netejar l'interior del fetge que clarament canviava de color. Seguidament extrèiem el fetge i el dipositàvem en una placa de petri amb solució salina per tal de seleccionar un tros d'aproximadament uns 100 mm³ que era tallat amb una fulla de bisturí i el reservàvem per histologia. Amb posterioritat aquest tros era processat per fer blocs de parafina (vegeu apartat 3.12). La resta de teixit es recollia i era congelat amb N₂ líquid. Posteriorment extrèiem les glàndules submaxil.lars i també eren submergides immediatament en N₂ líquid.

Un cop recollides totes les mostres, centrifugàvem la sang durant 20 minuts a 12000 x g en una microcentrífuga a 4°C, per tal de separar el plasma de les cèl·lules sanguínies. Finalment les mostres de glàndules submaxil.lars (SMG), fetges i els plasmes es guardaven a -20°C fins al moment de la seva utilització.

3.4. QUANTIFICACIÓ D'EGF A TEIXITS: GLÀNDULES SUBMAXIL·LARS (SMG) I FETGE.

* Fonament de la tècnica.

L'*ELISA* ("Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay") utilitzada per a la quantificació d'EGF en glàndules submaxil·lars és del tipus indirecte d'inhibició per antígen. S'ha emprat el mètode descrit per Grau i col·laboradors (*Grau i col., 1994*), basat en la competència que s'estableix entre l'EGF adsorbit a la placa de valoració i l'EGF existent a la mostra/patró per la unió als anticossos de l'antisèrum de conill anti-EGF de ratolí. Per tal que tingui lloc aquesta competència la concentració d'aquest anticòs primari ha de ser limitant.

Amb l'objectiu de determinar la quantitat d'anticòs que quedava finalment unit a la placa, es va fer servir una immunoglobulina G de cabra anti-conill conjugada amb peroxidasa (anticòs secundari). La peroxidasa catalitzava la transformació d'un substrat, la O-fenilendiamina, en presència de peròxid d'hidrogen, en un producte colorejat. Aquest permetia la lectura de la placa a una longitud d'ona de 492 nm. D'aquesta manera es quantificava l'EGF present a la mostra ja que quan més color s'obtenia, era indicatiu d'una unió més important dels anticossos de l'antisèrum de conill a l'antígen adherit a la placa, i per tant que la concentració d'EGF en aquella mostra era més baixa.

* Material.

- Placa d'elevada adsorció de poliestirè de 96 pous per *ELISA* (*Costar-Cultek*, referència-3590)
- Lector de plaques d'*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

* Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)

- EGF de ratolí 9.1 μ M en PBS purificat per Carme Rodríguez al nostre laboratori a partir de glàndules submaxil·lars, segons descriu Savage i Cohen (*Savage i Cohen, 1972*)
- Solució fixadora: isopropanol (*Fluka*) 25% en àcid acètic (*Panreac*) 10% v/v
- Solució de blocatge: llet en pols desnatada (*Cental Lechera Asturiana*) al 5% en PBS
- MTP: llet en pols desnatada (*Cental Lechera Asturiana*) al 0.5% i Tween-20 (*Sigma*) al 0.1 % en PBS
- Anticòs primari: sèrum de conill anti-EGF, obtingut també al nostre laboratori per procediments estàndards
- Anticòs secundari: immunoglobulines G de cabra anti-conill conjugades amb peroxidasa (*Nordic Immunological*)
- Solució de revelat: O-fenilendiamina (*Sigma*) 0.4 mg/mL, H₂O₂ (*Panreac*) 60 ppm en tampó citrat (*Panreac*) 0.15 M a pH=5
- HCl (*Panreac*) 2.5 M

* **Processament de les mostres.**

Material.

- Balança de precisió (*Sartorius BP61S*)
- Morter de porcellana (*AFORA*)
- Disruptor cel·lular (*Ultra-turrax T25, IKA® LABORTECHNIK*)
- Ultracentrífuga (*Sorvall® RC M120EX*)

Procediment.

Es pesaven les glàndules submaxil·lars a la balança de precisió i després es col·locaven dins d'un morter on eren fragmentades. A continuació agafàvem la meitat de les glàndules i les submergiem en 3 mL de PBS.

Per homogeneitzar el teixit es va fer servir un disruptor cel·lular (a una velocitat mitja de 22000 rpm) mantenint sempre el tub amb la mostra submergit en aigua amb gel. El temps necessari per a una total homogeneització era aproximadament de 1 minut.

Amb posterioritat afegíem PBS fins a un volum final de 6 mL i se centrifugava durant 1 hora en una ultracentrífuga, a una velocitat de 100000 x g i a 4°C. El sobrenedant recollit es guardava a -20°C. El dia de la valoració la mostra era diluïda 1/5000 amb tampó MTP i a partir d'aquesta dilució es quantificava la concentració d'EGF de cadascuna de les glàndules.

En el cas del teixit hepàtic, submergíem un tros de 100 mg en 5 mL de PBS. I l'homogeneitzàvem de la mateixa manera que les glàndules submaxil·lars. Un cop homogenat el teixit afegíem PBS fins a un volum final de 10 mL i se centrifugava durant 1 hora en una ultracentrífuga, a una velocitat de 100000 x g i a 4°C. El sobrenedant recollit es guardava a -20°C. El dia de la valoració la mostra era diluïda 1/10 amb tampó MTP .

* Preparació de la corba patró.

Per la corba patró es preparaven les següents dilucions d'EGF amb tampó MTP.

EGF 66.6 nM .- 5.9 µL d'EGF 9.1 µM + 794 µL MTP

EGF 20 nM .- 135.2 µL d'EGF 66.6 nM + 314.8 µL MTP

EGF 6.6 nM .- 45 µL d'EGF 66.6 nM + 405 µL MTP

EGF 2 nM .- 45 µL d'EGF 20 nM + 405 µL MTP

EGF 0.66 nM .- 45 µL d'EGF 6.6 nM + 405 µL MTP

EGF 0.2 nM .- 45 µL d'EGF 2 nM + 405 µL MTP

EGF 0.066 nM .- 45 µL d'EGF 0.66 nM + 405 µL MTP

EGF 0.02 nM .- 45 µL d'EGF 0.2 nM + 405 µL MTP

EGF 0.0066 nM .- 45 µL d'EGF 0.066 nM + 405 µL MTP

Aquestes solucions es preparaven cada dia, doncs l'EGF no es pot congelar un cop diluït a concentracions inferiors a 10 nM.

* Procediment de la quantificació.

Es preparava una solució d'EGF 2 nM diluint 2 µL de la solució mare d'EGF (9.1 µM) en 11 mL de PBS. Seguidament es posaven 100 µL d'aquesta solució per pou (equivalent a 1ng) i es deixava adsorbir a la placa durant tota la nit a 4°C en una cambra humida. L'endemà es fixava aquest EGF afegint 100 µL de solució fixadora a tots els pous. La fixació es realitzava a

temperatura ambient durant 15 minuts a la cambra humida. La placa es rentava a continuació 3 vegades amb PBS (1 minut per rentat). Per tal de buidar totalment els pouets, després d'abocar el líquid a la pica, es donaven uns quants cops a la placa invertida sobre un coixinet fet de paper de filtre.

Per eliminar la unió inespecífica de l'anticòs a la placa, es feia un bloqueig consistent en afegir 350 μL de la solució de bloqueig per pou i es mantenia així durant 30 minuts dins la cambra humida i en un bany a 37°C amb agitació suau. Es rentava la placa 3 vegades amb MTP (1 minut per rentat). A continuació posàvem 50 μL de mostra o valor de l'estàndard (per triplicat) amb 50 μL de l'anticòs primari (diluït 1/2500 en MTP) per pou, i es deixava incubant durant 4 hores dins la cambra humida i en un bany a 37°C amb agitació suau.

Finalitzat el primer període d'incubació es rentava de nou la placa 3 cops amb MTP (1 minut per rentat) i començava el segon període d'incubació afegint 100 μL per pou de l'anticòs secundari (diluït 1/10000 en MTP). Així es deixava 90 minuts dins la cambra humida i en un bany a 37°C amb agitació suau. Passat aquest temps es feien els 3 últims rentats amb MTP (1 minut per rentat) i afegíem 100 μL de solució de revelat per pou.

El revelat de la placa tenia lloc a les fosques i s'aturava aproximadament als 20 minuts (depenent de la intensitat del color) afegint 50 μL d' HCl 2.5 M, virant el color de groc a taronja. A continuació llegíem l'absorbància de la placa a 492 nm.

* Especificitat de l'*ELISA*.

El mètode de quantificació d'EGF per *ELISA* ja s'havia posat a punt al nostre laboratori l'any 1994 i llavors havíem comprovat la especificitat del sèrum de conill anti- EGF (*Grau i col., 1994*) ja que no reconeixia el TGF- α . Ara hem volgut extendre l'anàlisi a d'altres membres de la família de l'EGF, especialment l'*Heparin Binding EGF-like Growth Factor* (HB-EGF).

Vàrem preparar 4 solucions diferents: una d'EGF de ratolí (EGFr), una HB-EGF humana (HB-EGFh) (*Sigma*), una de *Nerve Growth Factor* de ratolí (NGFr) (*Sigma*) i l'última d'albumina sèrica bovina (BSA) al 0.1% en PBS (*Sigma*). La solució de BSA era preparada i utilitzada en aquesta *ELISA* per dos motius: (a) perquè les solucions mare de l'HB-EGFh i el NGFr eren

preparades amb aquesta solució i, (b) perquè volíem detectar si l'albumina d'aquesta solució interferia a la nostra valoració.

Proves preliminars realitzades amb la solució de BSA van passar de manifest que l'albumina no interfereix en la nostra valoració.

Per preparar la corba patró de NGFr resuspeníem el producte liofilitzat amb la solució de BSA fins a obtenir una concentració final de 666 nM. A partir d'aquest punt realitzàvem una dilució 1/10 amb MTP obtenint així el punt més alt de la patró 66.6 nM i seguidament fèiem el mateix banc de dilucions que per l'EGF (veure apartat 3.4.5.). Aquesta mateixa operació era realitzada per a la preparació de la corba patró d'HB-EGFh.

Les diferents solucions eren preparades en fresc el dia de la valoració, igual que la patró d'EGF, i el procediment de la quantificació era el mateix que l'indicat amb anterioritat.

* Càlculs.

La corba patró de l'ELISA del tipus indirecte d'inhibició per antígen queda ajustada a l'equació:

$$Ab = Ab_0 - (C * D_{max} / (CD_{0.5} + C))$$

on:

Ab = absorbància

Ab₀ = absorbància a la concentració d'EGF igual a 0

C = concentració d'EGF

D_{max} = (Ab₀ - Ab_∞)

CD_{0.5} = concentració d'EGF a la que s'obté 1/2 de D_{max}

Els paràmetres Ab₀, D_{max} i CD_{0.5} s'estimaven mitjançant mètode de mínims quadrats.

3.5. QUANTIFICACIÓ D'EGF A PLASMA.

* Fonament de la quantificació.

Per la quantificació d'EGF a plasma es va utilitzar el mateix procediment descrit anteriorment. En aquest cas, però va ser necessari un processament previ del plasma per tal d'eliminar d'aquest, els constituents que interfereixen a l'*ELISA*.

* Processament de les mostres.

Fonament.

Es va fer servir el mètode d'extracció per àcid-etanol (*Grau i col., 1994; Mena, 1999*), el qual es basa en la resistència de l'EGF a precipitar a una solució àcid-etanol. D'aquesta manera aconseguim separar l'EGF que volem quantificar d'altres proteïnes plasmàtiques que s'ha vist que interfereixen en l'*ELISA* (*Grau i col., 1994*).

Material.

- Microcentrífuga (*Biofuge A-Heraeus Spatech*)
- Sonicador (*High Intensity Ultrasonic Processor - Vibra Cell, model VC 50 T*)
- Liofilitzador (*SPEED-VAC® PLUS SC110A*)

Reactius.

- Àcid fòrmic (*Panreac*) 2N
- Etanol absolut (*Panreac*)
- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- MTP x 10: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) 5% Tween-20 (*Sigma*) 1% en PBS
- Trietanolamina (*Sigma*) 0.5 M en KOH (*Panreac*) 2N (TEA/KOH)
- Indicador de pH Universal (*Merck*)

- Tires indicadores de pH (*Merk*)
- Plasma de rata (obtingut de rates heparinitzades, amb una solució de 2.5 mg d'heparina/mL en PBS, 20 minuts abans del seu sacrifici amb una solució de 60 mg/Kg de pentobarbital sòdic)

Procediment.

Partiem d'un volum de 150 μ L de plasma als quals s'afegien 75 μ L d'àcid fòrmic 2N, es barrejava amb el vòrtex i es mantenia a 4°C durant 10 minuts. A continuació s'afegien 525 μ L d'etanol absolut fred (concentracions finals: àcid fòrmic 0.5 N i etanol 70%), i es deixava a temperatura ambient durant 30 minuts. Passat aquest temps se centrifugava a 12000 x g a una microcentrifuga durant 10 minuts a temperatura ambient. El sobrenedant recollit s'evaporava en el liofilitzador. Un cop la mostra estava totalment seca, es resuspenia en PBS amb el seu volum inicial i se sotmetia a una sonicació fins que fos transparent. A continuació s'afegien 5 μ L d'indicador universal i volums controlats de TEA/KOH fins obtenir un pH neutre. Degut al fet que la mostra no era incolora i alterava el color de l'indicador, la neutralització de les mostres va ser verificada amb la utilització de tires reactives. Finalment se centrifugava a 12000 x g a la microcentrifuga durant 10 minuts, el sobrenedant es recollia i es guardava a -20 °C. El dia de la valoració de les mostres afegíem a 90 μ L del sobrenedant 10 μ L de MTPx10.

Paral·lelament es processava plasma de rata exactament de la mateixa forma, per preparar amb ell la corba patró que fariem servir a la valoració i per diluir les mostres de plasma de ratolí quan calgui. El vam anomenar PRA-MTP. L'EGF de rata no és reconegut per l'antisèrum anti-EGF de ratolí (*Grau i col., 1994*), així sabem que no es produïrien reaccions creuades.

*** Preparació de la corba patró.**

Les solucions de la corba patró es preparaven com segueix:

EGF 66.6 nM.- 1.84 μ L d'EGF 9.1 μ M + 248.2 μ L PRA-MTP

EGF 20 nM.- 60.1 μ L d'EGF 66.6 nM + 139.9 μ L PRA-MTP

EGF 6.66 nM.- 45 μ L d'EGF 66.6 nM + 405 μ L PRA-MTP

EGF 2 nM.- 45 μ L d'EGF 20 nM + 405 μ L PRA-MTP

EGF 0.66 nM.- 45 μ L d'EGF 6.66 nM + 405 μ L PRA-MTP

EGF 0.2 nM.- 45 µL d'EGF 2 nM + 405 µL PRA-MTP

EGF 0.066 nM.- 45 µL d'EGF 0.66 nM + 405 µL PRA-MTP

EGF 0.02 nM.- 45 µL d'EGF 0.2 nM + 405 µL PRA-MTP

EGF 0.006 nM.- 45 µL d'EGF 0.066 nM + 405 µL PRA-MTP

Aquestes solucions es preparaven cada dia, doncs l'EGF no es pot congelar un cop diluït a concentracions inferiors a 10 nM.

* Procediment de la quantificació.

Material i Reactius.

Els mateixos emprats a la valoració d'EGF a SMG per *ELISA* (veure apartat 3.4)

Procediment.

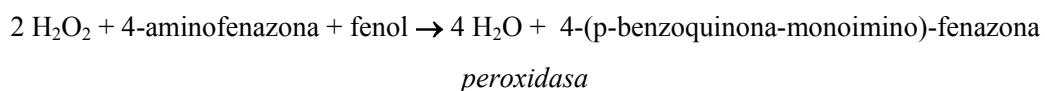
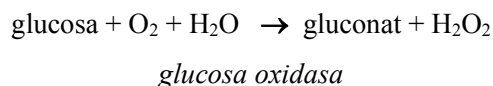
En aquest cas se seguia el mateix protocol descrit per a la quantificació d'EGF a glàndules submaxil.lars, amb unes petites modificacions, ja que només posàvem 40 µL de mostra (per duplicat) i 10 µL de PRA-MTP, abans de posar els 50 µL d'anticòs primari.

3.6. QUANTIFICACIÓ DE GLUCOSA PLASMÀTICA.

* Fonament de la quantificació.

Per a la quantificació de glucosa en plasma es va utilitzar el mètode enzimàtic descrit per Trinder (*Trinder, 1969*), basat en l'oxidació de la glucosa a gluconat en presència de glucosa oxidasa. El peròxid d'hidrogen (H₂O₂) que es produeix s'acobla a una segona reacció catalitzada per la peroxidasa, on el cromogen reduït i incolor (4-animofenazona) és oxidat a 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona, producte que es caracteritza per la seva coloració rosada.

La seqüència de reaccions és:



En presència de quantitats no limitants d'oxigen, 4-aminofenazona, fenol, glucosa oxidasa i peroxidasa, la intensitat de color és directament proporcional a la concentració de glucosa de la mostra.

*** Material.**

- Plaques Corning de 96 pous (*Cultek*)
- Lector de plaques d'*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

*** Reactius.**

- Solució de glucosa (*Panreac*) 30 mM preparada en aigua destil·lada (AD)
- Solució reactiva (Kit comercial de *Boehringer Mannheim*® MPR3 16639): fenol (11 mM), 4-aminofenazona (0.77 mM), glucosa oxidasa (18 U/mL, E.C. 1.11.1.7.) i peroxidasa (1.1 U/mL, E.C. 1.11.7.7.) dissolt en tampó fosfats 0.1 M, a pH=7

*** Preparació de les solucions de treball.**

- Solució reactiva: es dissol el contingut de l'ampolla 1 (la qual conté la 4-aminofenazona i els enzims) amb 200 mL d'aigua destil·lada. Un cop dissolta afegim el contingut de l'ampolla 1a (fenol). Aquest reactiu cal mantenir-lo protegit de la llum en una ampolla de vidre i és estable un mes a 4 °C.

- Preparació de la patró de glucosa: a partir de la solució de glucosa 30 mM es feia una dilució 1/10 amb aigua destil·lada (AD), aconseguint una concentració 3 mM. A partir d'aquesta nova concentració es preparava un banc de dilucions com segueix:

Glc 2mM : 500 µL de Glc 3mM + 250 µL AD

Glc 1mM : 500 µL de Glc 2mM + 500 µL AD

Glc 0.5 mM : 500 µL de Glc 1mM + 500 µL AD

Glc 0.25 mM : 500 µl de Glc 0.5mM + 500 µL AD

Pel blanc s'utilitzava aigua destil·lada.

* **Procediment.**

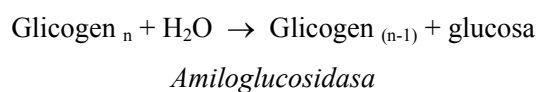
Es realitzava una dilució 1/10 amb aigua destil·lada de cadascuna de les mostres. A continuació es pipetejaven 20 µL de cadascun dels punts de l'estàndard i el mateix volum de plasma diluït de les diferents mostres, per duplicat, a la placa; després s'afegien 200 µL de la solució reactiva a cada pou.

La placa es deixava incubant 1 hora a temperatura ambient protegida de la llum amb paper d'alumini. Passat aquest temps es mesurava la densitat òptica en un lector de plaques utilitzant un filtre amb una longitud d'ona de 492 nm.

3.7. QUANTIFICACIÓ DE GLICOGEN HEPÀTIC.

* **Fonament de la tècnica.**

El glicogen hepàtic es va quantificar segons el mètode descrit per Keppler i Decker (*Keppler i Decker, 1984*) basat en la degradació enzimàtica de glicogen en medi àcid, catalitzada per l'amiloglucosidasa:



Prèviament a la hidròlisi del glicogen, calia eliminar la glucosa lliure de la mostra, això s'aconseguia bullint-les en medi alcalí; sota aquestes condicions tota la glucosa lliure del medi es transformava en furfurals. D'aquesta manera s'assegurava que la glucosa quantificada finalment provenia, exclusivament, del glicogen degradat.

*** Material.**

- Homogeïtzador manual de vidre (*AFORA*)
- Morter de porcellana (*AFORA*)
- Centrífuga (*Eppendorf, 5415R*)
- Agitador d'eppendorfs termostatitzat (*Eppendorf, Thermomixer 5437*)

*** Reactius.**

- HClO_4 (*Panreac*) al 3%
- NaOH (*Panreac*) 1.2 N
- Reactiu de digestió: 4mg/mL d'Amiloglucosidasa d'*Aspergillus niger* (*Boehringer Mannheim*, E.C. 3.2.1.3.) dissolta en acetat (*Panreac*) 2 M: àcid acètic (*Panreac*) 0.3 M, en proporció 1:1
- Indicador de pH Universal (*Merck*)
- Trietanolamina (*Sigma*) 0.5 M en KOH (*Panreac*) 2 N (TEA/KOH)
- Solució de glucosa (*Panreac*) 30 mM preparada en aigua destil·lada (AD)
- Solució reactiva (Kit comercial de *Boehringer Mannheim*® MPR3 166391)

*** Procediment.**

Per a la quantificació de glicogen en fetge era necessària l'homogeïtzació prèvia d'aquest teixit. Així doncs, s'agafava el fetge congelat i es pesava, a continuació es fraccionava dins

d'un morter que contenia nitrogen líquid. Es pesava un tros de fetge d'aproximadament 200 mg i era col·locat en un homogeinitzador manual de vidre; s'afegia un volum de perclòric al 3% corresponents a 25 vegades el pes del fragment de fetge expressat en grams (aproximadament uns 5 mL). Quan ja no s'observava cap resta de teixit sencer a l'homogeinitzador, es transferia l'homogenat àcid a tubs eppendorfs que eren centrifugats a 12000 x g durant 10 minuts a 4°C. Finalment es recollia el sobrenedant i es descartava el precipitat.

A 0.3 mL de l'extracte àcid s'afegien 0.15 mL de NaOH 1.2 N. Es posava al bany Maria (100°C) durant 10 minuts i després es deixava refredar en gel. A continuació es pipetejaven 0.25 mL de reactiu de digestió per eppendorf i s'incubava a 45°C amb agitació (*Thermomixer 5437-Eppendorffs*) durant 2 hores. Per tal de valorar la glucosa resultant d'aquesta hidròlisi, es van recollir 0.4 mL del digerit; es van afegir 5 µL d'indicador universal i volums controlats de TEA/KOH fins a obtenir el color indicatiu de pH neutre. Finalment se centrifugava durant 10 minuts a 12000 x g a temperatura ambient. El sobrenedant recollit era diluït 1/4 amb aigua destil·lada i es procedia a la quantificació de la glucosa com s'indica a l'apartat 3.6.

3.8. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN PLASMA I MEDI DE PERFUSIÓ.

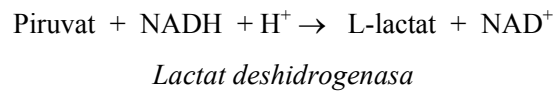
3.8.1. *Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH)*

La lactat deshidrogenasa (LDH) E.C. 1.1.1.27, és l'enzim que catalitza l'oxidació del L-lactat a piruvat, utilitzant com a acceptor d'electrons el NAD. La reacció és reversible i assolit l'equilibri s'afavoreix la reacció reversa, és a dir, la producció de piruvat i NADH.

* **Fonament.**

L'activitat de la LDH va ser determinada segons el mètode espectrofotomètric descrit per Vassault (*Vassault, 1984*), el qual està fonamentat en la reducció enzimàtica del piruvat a lactat en presència de lactat deshidrogenasa al medi.

La reacció és:



L'aparició de NAD^+ com a producte d'aquesta reacció es tradueix en una disminució de l'absorbància del NADH a 340 nm.

*** Material.**

- Cubetes semimicro (*Rubilabor*)
- Espectrofotòmetre (*Shimadzu UV-160A*)

Les valoracions es van realitzar inicialment seguint el mètode estandaritzat per *Boehringer Mannheim*, però degut al fet que el producte va ser retirat del mercat vam passar a punt la valoració al nostre laboratori.

A. Mètode *Boehringer Mannheim*®.

Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució reactiva (Kit comercial de *Boehringer Mannheim*® LDH MPRI 1087592): piruvat (0.62 mM) i NADH (0.19 mM) dissolt en tampó fosfat 51.7 mM, a pH=7.5

Procediment.

Es preparava la solució reactiva diluint un flascó de 3 mL de tampó/substrat amb 1 mL de PBS i s'afegia una pastilla de reactiu (NADH). S'agitava amb el vòrtex i es deixava a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzada.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 5 μL de mostra, 395 μL de PBS i 600 μL de reactiu. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 4 minuts repetíem la mesura (DO_f), perquè sabíem que en aquest temps es mantenia la linealitat, demostrada pels experiments de A. Arnau (*Arnau, 1999*). Així la variació de l'absorbància per minuts ($\Delta\text{DO}_{340\text{ nm}}/\text{min}$) es podia relacionar directament amb els micromols de NADH oxidats i alhora l'activitat de l'enzim a la mostra.

Càlculs.

L'activitat LDH de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{240} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} = (\text{DO}_f - \text{DO}_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

240 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

B. Mètode descrit per Bergmeyer i Grassl (*Vassault, 1984*).

Reactius.

- Tampó Tris-NaCl: Trizma Base (*Roche*) 81.3 mM i NaCl (*Panreac*) 203.3 mM a pH 7.2
- Solució NADH (*Roche*) 244 μM en tampó Tris-NaCl
- Àcid pirúvic (*Sigma*) 9.76 mM en tampó Tris-NaCl

Procediment.

Les solucions de NADH i piruvat eren descongelades i s'atemperaven a 30°C a un bany termostatitzat fins al moment de la seva utilització. Es descongelaven les mostres de plasma o medi de perfusió i es pipetejaven a una cubeta semimicro 4 µL de mostra, 835 µL de la solució NADH i 166 µL de piruvat. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 5 minuts repetíem la mesura (DO_f), perquè sabíem que en aquest temps es mantenia la linealitat, tal i com havíem comprovat al nostre laboratori (*J. Lorita, comunicació personal*).

Càlculs.

L'activitat LDH de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta DO_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{300} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta DO_{340\text{nm}} = (DO_f - DO_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

300 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

3.8.2. Determinació de l'activitat α -hidroxibutirat deshidrogenasa (α -HBDH).

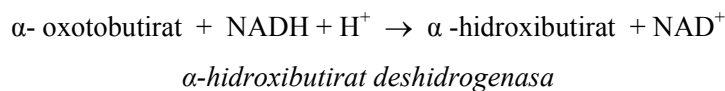
L'enzim lactat deshidrogenasa anteriorment descrit (vegeu apartat 3.8.1.) té una especificitat pels substrats que implica a varis α -hidroxiàcids i oxoàcids, a més del L-lactat. Un d'aquests substractes, α -oxobutirat, quan pateix una reducció catalítica cap a α -hidroxibutirat per part de la lactat deshidrogenasa es referit com activitat α -hidroxibutirat deshidrogenasa. Dues de les cinc isoformes de la LDH, la LDH-1 i la LDH-2, especialment abundants a cor, són relativament més actives amb α -oxobutirat com a substrat que no pas amb el piruvat. Quan aquest dos isoenzims

hi són presents, la reducció del α -oxobutirat de la mostra té lloc a una taxa considerable, en canvi la resta d'isoenzims de la LDH són molt menys actius. Per això, s'ha proposat la mesura de la α -HBDH com a alternativa a la determinació dels isoenzims de la LDH. La mesura α -HBDH pot ser considerada fonamentalment com una mesura dels isoenzims cardíacs.

* **Fonament.**

El mètode utilitzat per a determinar l'activitat α -hidroxibutirat deshidrogenasa va ser el mètode espectrofotomètric descrit per Henderson (*Henderson, 1984*), el qual està basat en la reducció del α -cetobutirat en presència de α -hidroxibutirat deshidrogenasa.

La reacció és:



L'aparició de NAD^+ com a producte d'aquesta reacció es tradueix en una disminució de l'absorbància del NADH a 340 nm.

* **Material.** Vegeu material de l'apartat 3.8.1.

Les valoracions es van realitzar inicialment seguint el mètode estandaritzat per *Boehringer Mannheim*, però degut al fet que el producte va ser retirat del mercat vam passar a punt la valoració al nostre laboratori.

A. Mètode *Boehringer Mannheim*[®].

Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució reactiva (Kit comercial de la *Boehringer Mannheim*[®] α -HBDH 1087606):

α -oxoglutarat (3.1 mM) i NADH (0.19 mM) dissolt en tampó fosfat 51.7 mM, a ph=7.5.

Procediment.

Es preparava la solució reactiva diluint 1 flascó de 3 mL de tampó/substrat amb 1 mL de PBS i s'afegia una pastilla de reactiu (NADH). S'agitava en el vòrtex i es deixava a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzada.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 5 μ L de mostra, 395 μ L de PBS i 600 μ L de reactiu. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 4 minuts repetíem la mesura (DO_f) perquè, tot i que sabíem que la linealitat es mantenia durant 10 minuts pels experiments realitzats al nostre laboratori per A. Arnau (Arnau, 1999), es van voler mantenir les mateixes condicions que les utilitzades per a la valoració de la LDH.

Càlculs.

L'activitat α -HBDH de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta DO_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{240} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta DO_{340\text{nm}} = (DO_f - DO_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

240 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

B. Mètode descrit per Bergmeyer i Grassl (Henderson, 1984).

Reactius.

- Tampó fosfat : Na₂HPO₄ (Panreac) 16 mM i KH₂PO₄ (Panreac) 13 mM en AD
- Solució 2-oxobutirat (Sigma) 71 mM en tampó fosfat
- NADH, dissodium salt (Roche)

Procediment.

Es preparava la solució reactiva afegint a 25 mL de tampó fosfat, 3.8 mg de NADH i s'atemperava a 30 °C a un bany termostatitzat fins al moment de la seva utilització. Es descongela ven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 20 µL de mostra, 1 mL de la solució NADH i 50 µL del 2-oxobutirat. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 4 minuts repetíem la mesura (DO_f) perquè sabíem que en aquest temps es mantenia la linealitat, tal i com havíem comprovat al nostre laboratori (J. Lorita, comunicació personal).

Càlculs.

L'activitat α-HBDH de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{240} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} = (\text{DO}_f - \text{DO}_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

240 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

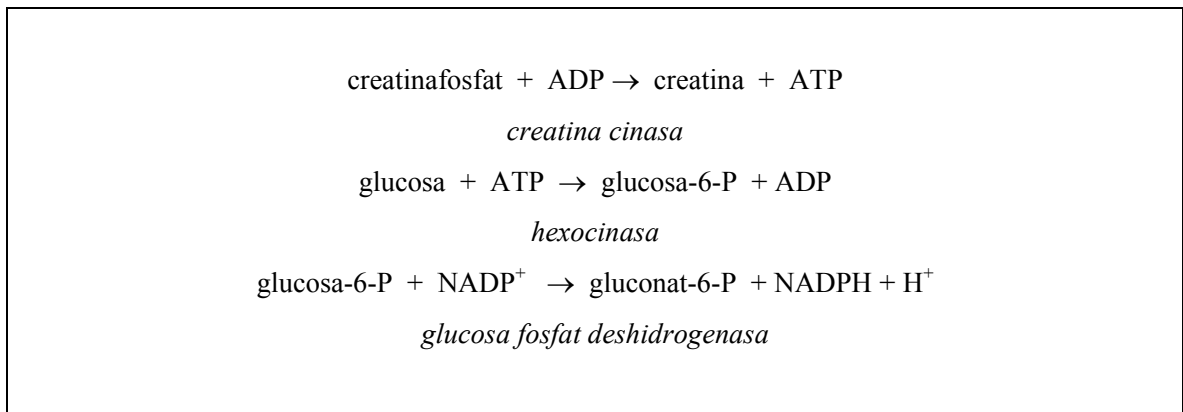
6.317 · 10⁻² l · mol⁻¹ · mm⁻¹ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

3.8.3. Determinació de l'activitat creatina cinasa (CK).

* Fonament.

L'activitat de la creatina cinasa (CK) E.C. 2.7.3.2. va ser determinada segons el mètode descrit per Szasz i col·laboradors (*Szasz i col., 1976*) i estandarditzat per *Boehringer Mannheim*[®]. El mètode es basa en la reacció reversa de la creatina cinasa, per la qual es forma ATP i aquest pot ser mesurat per l'acoblament de dues reaccions consecutives. La primera d'elles es catalitzada per l'hexocinasa (HK) i fosforila la glucosa gràcies a l'ATP, regenerant ADP per a la reacció de la CK. A continuació té lloc l'oxidació de la glucosa-6-P per la glucosa fosfat deshidrogenasa (G6PDH) formant NADPH i àcid-6-fosfogluconic.

La seqüència de reaccions és:



La taxa de formació de NADPH és una mesura de l'activitat CK quan la reacció sigui limitada únicament per la presència de l'enzim, això s'aconsegueix sempre que la concentració dels components de tot el sistema enzimàtic esmentat està en excés.

* **Material.** Vegeu material de l'apartat 3.8.1.

* Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)

- Solució reactiva (Kit comercial de la *Boehringer Mannheim*[®] CK NAC activado MPRI 1087533): creatinafosfat (30 mM), glucosa (20 mM), Mg²⁺ (10 mM), ADP (2 mM), NADP (2 mM), EDTA (2 mM), AMP (5 mM), n-acetilcisteïna (20 mM), HK (≥ 2.5 U/mL), G6PDH (≥ 1.5 U/mL) i diadenosinpentafosfat (10 μM) dissolt en tampó imidazol 0.1 M, a pH=6.7

* Procediment.

Es preparava la solució reactiva diluint un flascó de 2.5 mL de tampó/substrat amb 1 mL de PBS i s'afegia una pastilla de reactiu. S'agitava en el vòrtex i es deixava a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzada.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 5 μL de mostra, 395 μL de PBS i 600 μL de reactiu. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia als 5 minuts (DO_f), perquè és el temps durant el qual es manté la linealitat, com van demostrar els experiments anteriors realitzats per A. Arnau (*Arnau, 1999*). Dins d'aquest període la variació de l'absorbància per minuts (ΔDO_{340 nm} /min) es podia relacionar directament amb els micromols de NADPH produïts i per tant amb l'activitat CK.

* Càlculs.

L'activitat CK de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{300} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} = (\text{DO}_i - \text{DO}_f)$$

10 mm = amplada de la cubeta

300 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

6.317·10⁻² l·mol⁻¹·mm⁻¹ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

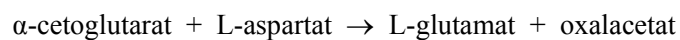
3.8.4. Determinació de l'activitat aspartat transaminasa (AST).

L-aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferasa (AST) E.C. 2.6.1.1., s'anomena també Glutamat Oxalacetat Transaminasa (GOT).

* Fonament.

L'activitat de l'AST plasma va ser determinada seguint el fonament del mètode espectrofotomètric descrit per Rej i Horder (*Rej i Horder, 1984*). Segons aquest mètode l'oxalacetat format en la reacció de transaminació produïda per AST, es reduït al seu hidroxiàcid corresponent, que és el malat, gràcies a l'actuació de la malat deshidrogenasa.

La seqüència de reaccions és:



L-Aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferasa



malat deshidrogenasa

A l'igual que amb la determinació de l'activitat ALT, dins de l'interval de linealitat el descens de la densitat òptica mesurada a 340 nm deguda a l'oxidació del NADH és proporcional a l'activitat de l'enzim, en aquest cas l'AST. Per tal que la reacció sigui limitada únicament per la presència d'AST, tant el NADH, com l'enzim malat deshidrogenasa han d'estar presents en excés.

* **Material.** Vegeu material de l'apartat 3.8.1.

Les valoracions es van realitzar inicialment seguint el mètode estandaritzat per *Boehringer Mannheim*, però degut al fet que el producte va ser retirat del mercat vam passar a punt la valoració al nostre laboratori.

A. Mètode *Boehringer Mannheim*[®].

Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució reactiva (Kit comercial de la *Boehringer Mannheim*[®] AST MPR1 1087541): L-aspartat (233 mM), malat deshidrogenasa (≥ 0.7 U/mL), NADH (0.21 mM) i α -cetoglutarat (14 mM) dissolt en tampó fosfats 93 mM, a pH=7.4

Procediment.

Es preparava la solució reactiva diluint un flascó de 3 mL de tampó/substrat amb 1 mL de PBS i s'afegia una pastilla de reactiu (enzim/coenzim/ α -cetoglutarat) (*Arnau, 1999*), s'agitava en el vòrtex i es deixava a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzada.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 25 μ L de mostra, 375 μ L de PBS i 600 μ L de reactiu. S'agitava per inversió i es feia una primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia als 5 minuts (DO_f). Aquesta segona mesura es realitzava als 5 minuts perquè durant aquest temps es mantenia la linealitat, com va demostrar A. Arnau al nostre laboratori (*Arnau, 1999*), amb el que la variació d'absorbància per minuts ($\Delta DO_{340nm} / \text{min}$) es podia relacionar directament amb els micromols de NADH oxidats i alhora amb els micromols de substrat transformat per minuts (U.I.).

Càlculs.

L'activitat AST de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta DO_{340nm}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{300} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta DO_{340nm} = (DO_f - DO_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

300 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

B. Mètode descrit per Bergmeyer i Grassl (*Rej i Horder, 1984*).

Reactius.

- Tampó Tris: Trizma Base (*Roche*) 100 mM a pH 7.8
- Solució d'Aspartat (*Panreac*) 297 mM en tampó Tris
- Solució 2-oxoglutarat (*Sigma*) 144 mM en tampó Tris
- Solució Piridoxal-fosfat (*Sigma*) 5.8 mM en tampó Tris
- Barreja enzimàtica: malat deshidrogenasa (*Sigma*) de cor de porc (230 KU/l)/ lactat deshidrogenasa (*Roche*) de múscul de porc (105 KU/l), preparat en una solució glicerol/aigua destil·lada (1:1)
- NADH, *dissodium salt* (*Roche*)

Procediment.

Es preparava la solució reactiva barrenjant 10 mL d'Aspartat, 250 μL de piridoxal fosfat, 50 μL de la barreja enzimàtica malat deshidrogenasa/lactat deshidrogenasa i 1.5 mg de NADH. Un cop preparada la barreja de reacció l'atemperàvem a 30°C a un bany termostatitzat, juntament amb la solució de 2-oxoglutarat.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven a una cubeta semimicro 10 μL de cada mostra i 1 mL de la solució reactiva. S'agitava per inversió i deixàvem durant 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps afegíem 100 μL de la solució d'oxoglutarat a totes les cubetes i de nou agitàvem per inversió. Als 90 segons es feia una primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia 10 minuts després (DO_f). La segona mesura es realitzava als 10 minuts perquè durant aquest temps es mantenia la linealitat.

Càlculs.

L'activitat AST de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{600} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} = (\text{DO}_f - \text{DO}_i)$

10 mm = amplada de la cubeta

600 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta (microlitres)

V_m = volum de mostra (microlitres)

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

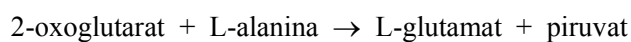
3.8.5. Determinació de l'activitat alanina transaminasa (ALT).

L-Alanina: 2-oxoglutarat aminotransferasa (ALT) E. C. 2.6.1.2., s'anomena també Glutamat Piruvat Transaminasa (GPT).

*** Fonament.**

L'activitat de l'ALT a plasma va ser determinada segons el mètode descrit per Horder i Rej (*Horder i Rej, 1984*). Es tracta d'un mètode espectrofotomètric pel qual el piruvat format en la reacció de l'ALT és reduït al seu hidroxilàcid corresponent, el lactat, en presència de lactat deshidrogenasa.

La seqüència de reaccions és:



L-Alanina: 2-oxoglutarat aminotransferasa



lactat deshidrogenasa

A mesura que la reacció té lloc, el NADH és oxidat a NAD⁺. La disminució de la concentració de NADH és seguida per la disminució de l'absorbància a 340 nm durant un període de temps determinat on es manté la linealitat. Per tal que la reacció sigui limitada únicament per la presència d'ALT, tant el NADH, com l'enzim lactat deshidrogenasa han d'estar presents en excés.

* **Material.** Vegeu material de l'apartat 3.8.1.

Les valoracions es van realitzar inicialment seguint el mètode estandaritzat per *Boehringer Mannheim*, però degut al fet que el producte va ser retirat del mercat vam passar a punt la valoració al nostre laboratori.

A. Mètode *Boehringer Mannheim*[®].

Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució reactiva (Kit comercial de la *Boehringer Mannheim*[®] ALT MPR1 1087568): L-alanina (933 mM), lactat deshidrogenasa (≥ 1.4 U/mL), NADH (0.21 mM) i α -cetoglutarat (21 mM) dissolt en tampó fosfats 93 mM, a pH=7.4

Procediment.

Es preparava la solució reactiva diluint un flascó de 3mL de tampó/substrat amb 1 mL de PBS i s'afegia una pastilla de reactiu (enzim/coenzim/ α -cetoglutarat) (Arнау, 1999), s'agitava en el vòrtex i es deixava a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzada.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 50 μ L de mostra, 350 μ L de PBS i 600 μ L de reactiu. S'agitava per inversió i es feia una primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia 10 minuts després (DO_f). Aquesta segona mesura es realitzava als 10 minuts perquè durant aquest temps es mantenia la linealitat, com va demostrar al nostre laboratori A. Arnau (Arнау, 1999).

Càlculs.

L'activitat ALT de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta DO_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{600} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta DO_{340\text{nm}} = (DO_f - DO_i)$$

10 mm = amplada de la cubeta

600 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

B. Mètode descrit per Bergmeyer i Grassl (Horder i Rej, 1984).Reactius.

- Tampó Tris: Trizma Base (Roche) 110 mM a pH 7.3
- Solució L-Alanina (Panreac) 615mM en tampó Tris

- Solució 2-oxoglutarat (*Sigma*) 180mM en tampó Tris
- Solució Piridoxal-fosfat (*Sigma*) 5.44 mM en tampó Tris
- Lactat deshidrogenasa (*Roche*) de muscul de porc (550 KU/L) preparat en una solució glicerol/aigua destil·lada (1:1)
- NADH, *dissodium salt* (*Roche*)

Procediment.

Es preparava la solució reactiva barrejant 10 mL d'alanina, 250 µL de piridoxal-fosfat, 50 µL de LDH i 1.65mg de NADH. Un cop preparada la barreja de reacció l'atemperàvem a 30 °C a un bany termostatitzat, juntament amb la solució de 2-oxoglutarat.

Es descongelaven les mostres de plasma o perfós i es pipetejaven a una cubeta semimicro 10 µL de cada mostra i 1 mL de la solució reactiva. S'agitava per inversió i deixàvem durant 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps afegíem 100 µL de la solució d'oxoglutarat a totes les cubetes. De nou agitàvem per inversió. Als 90 segons es feia una primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia 10 minuts després (DO_f). Per cada valoració calia fer un blanc amb 10 µL PBS, perquè vam observar que l'absorbància baixava al llarg del temps sense que hi hagués mostra i això ens hauria fet supervalorar la activitat ALT. La segona mesura es realitzava als 10 minuts perquè durant aquest temps es mantenia la linealitat, com vam demostrar al nostre laboratori.

Càlculs.

L'activitat ALT de la mostra es calculava segons la fórmula:

$$\mu\text{Kat/l}(\mu\text{mol/s/l}) = \frac{\Delta DO_{340\text{nm}}}{6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}} \times \frac{1}{10 \text{ mm}} \times \frac{1}{600} \times \frac{V_t}{V_m} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

on:

$$\Delta DO_{340\text{nm}} = (DO_f - DO_i) - (DO_{\text{PBSf}} - DO_{\text{PBSi}})$$

10 mm = amplada de la cubeta

600 = temps entre lectura inicial i final (segons)

V_t = volum final a la cubeta

V_m = volum de mostra

$6.317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30°C.

3.9. DETERMINACIÓ DE CITOCINES.

3.9.1. Factor Necròtic Tumoral - α (TNF- α).

La quantificació de TNF- α en mostres de plasma i mostres provinents de perfusió de fetge es va dur a terme mitjançant la utilització del mètode comercial KMC3012, estandaritzat per *Biosource International*.

* Fonament del mètode.

El mètode comercial de quantificació de TNF- α és una *ELISA* (“*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*”) del tipus “sandvitx” de fase sòlida, en la qual els pous de la placa tenen adsorbit un anticòs policlonal específic pel TNF- α de ratolí.

Les diferents mostres i punts de la patró són pipetejats dins dels pous i seguidament s’afegeix un anticòs monoclonal biotinitat. Finalitzada aquesta primera incubació s’afegeix una solució d’estreptavidina unida a peroxidasa. Aquesta proteïna, l’estreptavidina, s’unirà a l’anticòs biotinitat i així completa el quart membre del “sandvitx”. Acabada la segona incubació s’afegeix una solució-substrat. Aquesta solució reacciona amb l’estreptavidina present produint l’aparició de color. La intensitat del producte colorejat és directament proporcional a la concentració de TNF- α de ratolí present a la mostra.

* Material.

- Lector de plaques d’*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

*** Reactius subministrats amb el mètode comercial KMC3012 (*Biosource International*):**

- TNF- α recombinant de ratolí per fer l'estàndard
- Tampó de dilució de l'estàndard (TDE), el qual conté azida sòdica 15 mM
- TNF- α recombinant de ratolí per fer el control alt i baix
- Placa de 96 pous adsorbida amb anticòs contra TNF- α de ratolí
- Anticòs anti-TNF- α de ratolí conjugat amb biotina, el qual conté azida sòdica 15 mM
- Solució estreptavidina-peroxidasa concentrada (100x), la qual conté timol 3.3 mM
- Diluent per l'estreptavidina-peroxidasa, el qual conté timol 3.3 mM
- Tampó de rentat concentrat (25x)
- Solució del cromogen estabilitzada (tetrametilbenzidina)
- Solució per aturar la reacció, solució *STOP*

*** Procediment.**

Preparació de la patró.

Es reconstituïa el vial que contenia el TNF- α recombinant de ratolí amb el tampó de dilució de l'estàndard (TDE) obtenint una concentració de 10000 pg/mL. Es barrejava enèrgicament i es mantenia durant 10 minuts al gel abans de la seva utilització. Aquest temps era necessari per a una completa reconstitució. A continuació preparàvem la concentració de 1250 pg/mL de la patró afegint 100 μ L de la concentració 10000 pg/mL a 700 μ L de TDE. A partir d'aquest punt realitzàvem un banc de dilucions com segueix:

TNF- α 625 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 1250 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 312 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 625 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 156 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 312 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 78.1 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 156 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 39.1 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 78.1 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 19.5 pg/mL .- 300 mL de TNF- α 39.1 pg/mL + 300 mL de TDE

TNF- α 0 pg/mL .- 300 mL de TDE

Preparació dels controls alt i baix de TNF- α .

Reconstituïem el contingut del vial del control alt i baix amb aigua destil·lada, tal i com indicava el fabricant ja que el volum d'aigua destil·lada necessari era diferent segons el lot comercial emprat. A continuació fèiem alíquotes de 125 μL de cadascun dels controls i es mantenien a -20°C fins al moment de la seva utilització.

Procediment de la quantificació.

Un cop descongelades les mostres de plasma o medi de perfusió, els controls alt i baix i preparada l'estàndard de TNF- α , començàvem la quantificació posant 100 μL de cada punt de l'estàndard i dels controls a la placa. De les mostres de plasma posàvem 50 μL i 50 μL de TDE i per mostres de medi de perfusió 100 μL . Deixàvem un pou buit que era reservat per fer el blanc. Seguidament pipetejàvem 50 μL d'anticòs anti-TNF- α conjugat amb biotina a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc i es deixava incubant la placa durant 90 minuts a temperatura ambient.

Finalitzada aquesta primera incubació buidàvem tots els pous per decantació i fèiem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat (prèviament diluït amb aigua destil·lada). A continuació afegíem 100 μL de la solució d'estreptavidina-peroxidasa a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc. Aquesta segona incubació es feia durant 30 minuts a temperatura ambient.

Després de 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat, afegíem 100 μL de la solució del cromogen a tots els pous (inclòs el blanc). El procés de revelat durava uns 20 minuts i es realitzava a temperatura ambient i protegint la placa de la llum. La reacció era aturada afegint 100 μL de la solució *STOP*. En aquest moment es produïa un canvi de color de blau a groc i seguidament llegíem l'absorbància a 450 nm. Abans de realitzar els càlculs per obtenir les concentracions de TNF- α calia restar l'absorbància obtinguda pel blanc del cromogen a tots els altres pous.

3.9.2. Interleucina 1 β (IL-1 β).

La quantificació de la IL-1 β en mostres de plasma i mostres provinents de perfusió de fetge es va dur a terme mitjançant la utilització del mètode comercial KMC0012, estandaritzat per *Biosource International*.

*** Fonament del mètode.**

El mètode comercial de quantificació de la IL-1 β és una *ELISA* (“*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*”) del tipus “sandvitx” de fase sòlida, en la qual els pous de la placa tenen adsorbit un anticòs monoclonal específic per la IL-1 β de ratolí.

Les diferents mostres i punts de la patró són pipetejats dins dels pous i seguidament s’afegeix un anticòs monoclonal biotinitat. Finalitzada aquesta primera incubació, s’afegeix una solució d’estreptavidina unida a peroxidasa. Aquesta proteïna, l’estreptavidina, s’unirà a anticòs biotinitat i així completa el quart membre del “sandvitx”. Acabada la segona incubació s’afegeix una solució-substrat. Aquesta solució reacciona amb l’estreptavidina present produint l’aparició de color. La intensitat del producte colorejat és directament proporcional a la concentració de IL-1 β de ratolí present a la mostra.

*** Material.**

- Lector de plaques d’*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

*** Reactius subministrats amb el mètode comercial KMC0012 (*Biosource International*).**

- IL-1 β recombinant de ratolí per fer l’estàndard
- Tampó de dilució de l’estàndard (TDE), el qual conté azida sòdica 15 mM
- IL-1 β recombinant de ratolí per fer el control alt i baix
- Placa de 96 pous adsorbida amb anticòs contra IL-1 β de ratolí
- Anticòs anti-IL-1 β de ratolí conjugat amb biotina, el qual conté azida sòdica 15 mM

- Solució estreptavidina-peroxidasa concentrada (100x), la qual conté timol 3.3 mM
- Diluent per l'estreptavidina-peroxidasa, el qual conté timol 3.3 mM
- Tampó de rentat concentrat (25x)
- Solució del cromogen estabilitzada, (tetrametilbenzidina)
- Solució per aturar la reacció, solució *STOP*

* Procediment.

Preparació de la patró.

Es reconstituïa el vial que contenia la IL-1 β recombinant de ratolí amb tampó de dilució de l'estàndard (TDE) obtenint una concentració de 10000 pg/mL. Es barrejava enèrgicament i es deixava durant 10 minuts amb gel abans de la seva utilització. Aquest temps era necessari per a una completa reconstitució. A continuació preparàvem la concentració 1000 pg/mL de la patró afegint 50 μ L de la concentració 10000 pg/mL a 450 μ L de TDE. A partir d'aquest punt realitzàvem un banc de dilucions com segueix:

IL-1 β 500 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 1000 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 250 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 500 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 125 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 250 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 62.5 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 125 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 31.2 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 62.5 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 15.6 pg/mL .- 150 mL de IL-1 β 31.2 pg/mL + 150 mL de TDE
IL-1 β 0 pg/mL .- 150 mL de TDE

Preparació dels controls alt i baix de IL-1 β .

Reconstituïem el contingut del vial del control alt i baix amb aigua destil·lada, tal i com indicava el fabricant ja que el volum d'aigua destil·lada necessari era diferent segons el lot comercial emprat. A continuació fèiem alíquotes de 125 μ L de cadascun dels controls i es mantenien a – 20°C fins al moment de la seva utilització.

Procediment de la quantificació.

Un cop descongelades les mostres de medi de perfusió, els controls alt i baix i preparada l'estàndard de IL-1 β , començàvem la quantificació posant 50 μ L de cada punt de la patró i dels controls a la placa. De les mostres posàvem també 50 μ L. Deixàvem un pou buit que era reservat per fer el blanc. Seguidament pipetejàvem 50 μ L d'anticòs anti-IL-1 β conjugat amb biotina a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc i es deixava incubant la placa 90 minuts a 37 °C.

Finalitzada aquesta primera incubació buidàvem tots els pous per decantació i fèiem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat (prèviament diluït amb aigua destil·lada). A continuació afegíem 100 μ L de la solució d'estreptavidina-peroxidasa a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc. Aquesta segona incubació es feia durant 30 minuts a temperatura ambient.

Després de 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat, afegíem 100 μ L del cromogen estabilitzat a tots els pous (inclòs el blanc). El procés de revelat durava uns 20 minuts i es realitzava a temperatura ambient, protegint la placa de la llum. La reacció era aturada afegint 100 μ L de la solució *STOP*. En aquest moment es produïa un canvi de color de blau a groc i seguidament llegíem l'absorbància a 450 nm. Abans de realitzar els càlculs per obtenir les concentracions de IL-1 β calia restar l'absorbància obtinguda pel blanc del cromogen a tots els altres pous.

3.9.3. Interleucina 6 (IL-6).

La quantificació de IL-6 en mostres de plasma i mostres provinents de la perfusió de fetge es va dur a terme mitjançant la utilització del mètode comercial KMC0062, estandaritzat per *Biosource International*.

*** Fonament del mètode.**

El mètode comercial de quantificació de IL-6 és una *ELISA* (“*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*”) del tipus “sandvitx” de fase sòlida, en la qual els pous de la placa tenen adsorbit un anticòs monoclonal específic per la IL-6 de ratolí.

Les diferents mostres i punts de la patró són pipetejats dins dels pous. Després d'aquesta primera incubació s'afegeix un anticòs monoclonal biotinitat específic per la IL-6. Finalitzada aquesta segona incubació s'afegeix una solució d'estreptavidina unida a peroxidasa. Aquesta proteïna, l'estreptavidina, s'uneix a l'anticòs biotinitat i així completa el quart membre del "sandvitx". Acabada aquesta tercera incubació s'afegeix una solució-substrat. Aquesta solució reacciona amb l'estreptavidina present als pous produint l'aparició de color. La intensitat del producte colorejat és directament proporcional a la concentració de IL-6 present a la mostra.

*** Material.**

- Lector de plaques d'*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

*** Reactius subministrats amb el mètode comercial KMC0062 (*Biosource International*).**

- IL-6 recombinant de ratolí per fer l'estàndard
- Tampó de dilució de l'estàndard (TDE), el qual conté azida sòdica 15 mM
- IL-6 recombinant de ratolí per fer el control alt i baix
- Placa de 96 pous adsorbida amb anticòs contra IL-6 de ratolí
- Anticòs anti-IL-6 de ratolí conjugat amb biotina, el qual conté azida sòdica 15 mM
- Solució estreptavidina-peroxidasa concentrada (100x), la qual conté timol 3.3 mM
- Diluent per l'estreptavidina-peroxidasa, el qual conté timol 3.3 mM
- Tampó de rentat concentrat (25x)
- Solució del cromogen estabilitzada (tetrametilbenzidina)
- Solució per aturar la reacció, solució *STOP*

*** Procediment.**

Preparació de la patró.

Es reconstituïa el vial que contenia la IL-6 recombinant de ratolí amb tampó de dilució de l'estàndard (TDE) obtenint una concentració de 10000 pg/mL. Es barrejava enèrgicament i es mantenia durant 10 minuts amb gel abans de la seva utilització. Aquest temps era necessari per a

una completa reconstitució. A continuació preparàvem la concentració de 500 pg/mL de la patró afegint 50 µL de la concentració 10000 pg/mL a 950 µL de TDE. A partir d'aquest punt realitzàvem un banc de dilucions com segueix:

IL-6 250 pg/mL .- 300 mL de IL-6 500 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 125 pg/mL .- 300 mL de IL-6 250 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 62.5 pg/mL .- 300 mL de IL-6 125 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 31.2 pg/mL .- 300 mL de IL-6 62.5 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 15.6 pg/mL .- 300 mL de IL-6 31.2 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 7.8 pg/mL .- 300 mL de IL-6 15.6 pg/mL + 300 mL de TDE
IL-6 0 pg/mL .- 300 mL de TDE

Preparació dels controls alt i baix de IL-6.

Reconstituïem el contingut del vial del control alt i baix amb aigua destil·lada, tal i com indicava el fabricant ja que el volum d'aigua destil·lada necessari era diferent segons el lot comercial emprat. A continuació fèiem alíquotes de 125 µL de cadascun dels controls i es mantenien a – 20°C fins al moment de la seva utilització.

Procediment de la quantificació.

Un cop descongelades les mostres de plasma o medi de perfusió, els controls alt i baix i preparada l'estàndard de IL-6, començàvem la quantificació posant 100 µL de cada punt de la patró i dels controls a la placa. De les mostres de plasma posàvem 50 µL i 50 µL de TDE, i per mostres de medi de perfusió posàvem 100 µL. Deixàvem un pou buit que era reservat per fer el blanc. Es deixava incubant la placa durant dos hores a temperatura ambient.

Finalitzada aquesta primera incubació buidàvem tots els pous per decantació i fèiem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat (prèviament diluït amb aigua destil·lada). Seguidament pipetejàvem 100 µL d'anticòs anti-IL-6 conjugat amb biotina a tots el pous, excepte al pou reservat pel blanc i es deixava incubant la placa durant 30 minuts a temperatura ambient.

Després de 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat, afegiem 100 µL de la solució d'estreptavidina-peroxidasa a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc. Aquesta tercera incubació es feia durant 30 minuts a temperatura ambient.

De nou fem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat. Un cop finalitzats els rentats afegiem 100 µL del cromogen a tots els pous (inclòs el blanc). El procés de revelat durava uns 20 minuts i es realitzava a temperatura ambient, protegint la placa de la llum. La reacció era aturada afegint 100 µL de la solució *STOP*. En aquest moment es produïa un canvi de color de blau a groc i seguidament llegíem l'absorbància a 450 nm. Abans de realitzar els càlculs per obtenir les concentracions de IL-6 calia restar l'absorbància obtinguda pel blanc del cromogen a tots els altres pous.

3.9.4. Interleucina 10 (IL-10).

La quantificació de IL-10 en mostres de plasma i mostres provinents de la perfusió de fetge es va dur a terme mitjançant la utilització del mètode comercial KMC0102, estandaritzat per *Biosource International*.

*** Fonament del mètode.**

El mètode comercial de quantificació de IL-10 és una *ELISA* (“*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*”) del tipus “sandvitx” de fase sòlida, en la qual els pous de la placa tenen adsorbit un anticòs monoclonal específic per la IL-10 de ratolí.

Les diferents mostres i punts de la patró són pipetejats dins del pou. Després d'aquesta primera incubació s'afegeix un anticòs monoclonal biotinitat específic per la IL-10. Finalitzada la segona incubació s'afegeix una solució d'estreptavidina unida a peroxidasa. Aquesta proteïna, l'estreptavidina, s'uneix a anticòs biotinitat i així completa el quart membre del “sandvitx”. Acabada aquesta tercera incubació s'afegeix una solució-substrat. Aquesta solució reacciona amb l'estreptavidina present als pous produint l'aparició de color. La intensitat del producte colorejat és directament proporcional a la concentració de IL-10 present a la mostra.

*** Material.**

- Lector de plaques d'*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

*** Reactius subministrats amb el mètode comercial KMC0102 (*Biosource International*).**

- IL-10 recombinant de ratolí per fer l'estàndard
- Tampó de dilució de l'estàndard (TDE), el qual conté azida sòdica 15 mM
- IL-10 recombinant de ratolí per fer el control alt i baix
- Placa de 96 pous adsorbida amb anticòs contra IL-10 de ratolí
- Anticòs anti-IL-10 de ratolí conjugat amb biotina, el qual conté azida sòdica 15 mM
- Solució estreptavidina-peroxidasa concentrada (100x), la qual conté timol 3.3 mM
- Diluent per l'estreptavidina-peroxidasa, el qual conté timol 3.3 mM
- Tampó de rentat concentrat (25x)
- Solució del cromogen estabilitzada (tetrametilbenzidina)
- Solució per aturar la reacció, solució *STOP*

*** Procediment.***Preparació de la patró.*

Es reconstituïa el vial que contenia la IL-10 recombinant de ratolí amb tampó de dilució de l'estàndard (TDE) obtenint una concentració de 10000 pg/mL. Es barrejava enèrgicament i es mantenia durant 10 minuts al gel abans de la seva utilització. Aquest temps era necessari per a una completa reconstitució. A continuació preparàvem la concentració de 2000 pg/mL de la patró afegint 200 µL de la concentració 10000 pg/ml a 800 µL de TDE. A partir d'aquest punt realitzàvem un banc de dilucions com segueix:

- IL-10 1000 pg/mL .- 300 mL de IL-6 2000 pg/mL + 300 mL de TDE
- IL-10 500 pg/mL .- 300 mL de IL-6 1000 pg/mL + 300 mL de TDE
- IL-10 250 pg/mL .- 300 mL de IL-6 500 pg/mL + 300 mL de TDE
- IL-10 125 pg/mL .- 300 mL de IL-6 250 pg/mL + 300 mL de TDE

IL-10 62.5 pg/mL .- 300 mL de IL-6 125 pg/mL + 300 mL de TDE

IL-10 31.2 pg/mL .- 300 mL de IL-6 62.5 pg/mL + 300 mL de TDE

IL-10 0 pg/mL .- 300 mL de TDE

Preparació dels controls alt i baix de IL-10.

Reconstituïem el contingut del vial del control alt i baix amb aigua destil·lada, tal i com indicava el fabricant ja que el volum d'aigua destil·lada necessari era diferent segons el lot comercial emprat. A continuació fèiem al·lquotes de 125 µL de cadascun dels controls i es mantenien a – 20°C fins al moment de la seva utilització.

Procediment de la quantificació.

Un cop descongelades les mostres de plasma o medi de perfusió, els controls alt i baix i preparada l'estàndard de IL-10, començàvem la quantificació posant 100 µL de cada punt de la patró i dels controls a la placa. De les mostres de plasma o medi de perfusió posàvem també 100 µL. Deixàvem un pou buit que era reservat per fer el blanc. Es deixava incubant durant 60 minuts a 37 °C.

Finalitzada aquesta primera incubació buidàvem tots els pous per decantació i fèiem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat (prèviament diluït amb aigua destil·lada). Seguidament pipetejàvem 100 µL d'anticòs anti-IL10 conjugat amb biotina a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc i es deixava incubant la placa durant 60 minuts a temperatura ambient.

Després de 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat, afegíem 100 µL de la solució d'estreptavidina-peroxidasa a tots els pous, excepte al pou reservat pel blanc. Aquesta tercera incubació es feia durant 30 minuts a temperatura ambient.

De nou fèiem 4 rentats de 30 segons cadascun amb tampó de rentat. Un cop finalitzats els rentats afegíem 100 µL del cromogen estabilitzat a tots els pous (inclòs el blanc). El procés de revelat durava uns 20 minuts i es realitzava a temperatura ambient, protegint la placa de la llum. La reacció era aturada afegint 100 µL de la solució *STOP*. En aquest moment es produïa un canvi de color de blau a groc i seguidament llegíem l'absorbància a 450 nm. Abans de realitzar els càlculs

per obtenir les concentracions de IL-10 calia restar l'absorbància obtinguda pel blanc del cromogen a tots els altres pous.

3.10. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA (MPO).

La mieloperoxidasa (MPO) és un enzim present a l'interior dels grànuls primaris de neutròfils, i en menys quantitat en monòcits i macròfags. La mesura de l'activitat MPO es va fer a partir d'una modificació de la tècnica descrita per Krawisz i col·laboradors (*Krawisz i col., 1984*). La quantitat d'activitat MPO és directament proporcional al nombre de neutròfils presents en la mostra. Aquesta s'expressa en unitats d'activitat MPO per gram de teixit (UMPO/g), considerant-se 1 UMPO igual a la quantitat d'enzim capaç de degradar 1 μmol de peròxid per minut a 25°C.

* Fonament.

L'HTAB és un detergent que allibera la MPO dels grànuls primaris dels neutròfils, alhora que inhibeix (a partir de la destrucció del seu hemonucli) l'activitat d'altres peroxidases que tenen altres proteïnes del fetge com la glutatió peroxidasa, la catalasa o l'hemoglobina que competirien amb la MPO per l' H_2O_2 . La MPO catalitza l'oxidació de la O-dianisidina en presència de peròxid d'hidrogen, transformant-la en un producte colorejat que feia possible la seva lectura a una longitud d'ona de 540 nm.

* Material.

- Morter de porcellana (*AFORA*)
- Disruptor cel·lular (*Kinematica-Polytron*)
- Sonicador (*High Intensity Ultrasonic Processor - Vibra Cell*, model VC 50 T)
- Centrifuga (*SORVALL[®] RC M120 EX*)
- Plaques de poliestiré de 96 pous (*Cultek*)
- Lector de plaques d'*ELISA* (*Multiskan Plus MKII*)

* Reactius.

- Mieloperoxidasa (MPO) de leucòcits humans (E.C. 1.11.1.7) (*Sigma*)
- Tampó fosfat: KH_2PO_4 (*Panreac*) 50mM en H_2O destil·lada a pH 6
- HTAB: bromur d'hexadeciltrimetilamoni (HTAB) (*Merck*) al 0.5% en tampó fosfat.
- Solució de revelat: diclorur de o-dianisidina (O-DNS) (*Sigma*) 40 mM, H_2O_2 40 mM en tampó fosfat

* Processament de les mostres.

El fetge que havia estat congelat a -20°C era fragmentat en un morter. S'agafaven de 200 a 250 mg de teixit que s'homogeneïtzaven amb 2 mL d' HTAB en un disruptor cel·lular. La homogeneïtzació, d'aproximadament un minut, es realitzava en un tub que es mantenia en aigua amb gel per tal d'evitar l'escalfament. Posteriorment, les mostres eren sonicades durant 30 segons. Es recollia un volum d'aproximadament 1.5 mL, i es centrifugava a 12000 rpm durant 10 minuts i a 4°C . Seguidament, recollíem el sobrenedant i el congelàvem a -20°C fins la seva utilització.

* Procediment de la quantificació.

En una placa de poliestirè s'afegien per triplicat 10 μL del sobrenedant recollit. A un dels triplicats, s'afegia 290 μL de la solució de revelat a la qual encara no havíem afegit l' H_2O_2 , ja que era el blanc de cada mostra. Als altres dos pous, s'afegia 290 μL de la solució de revelat amb H_2O_2 i es deixava incubar durant 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, les mostres es llegien a una longitud d'ona de 540 nm .

* Càlculs.

El càlcul de l'activitat MPO es realitzaven a partir de la següent equació:

$$\text{UMPO/g} = [(((\text{Ab}_1 + \text{Ab}_2)/2) - \text{Ab}_0) / 15 \times 0.01] \times ((2 + P) / P) / 5$$

on:

Abo = absorbància del blanc de la mostra

Ab₁ = absorbància del pou 1 de la mostra

Ab₂ = absorbància del pou 2 de la mostra

15 = temps d'incubació (minuts)

0.01 = volum de la mostra al pou (mL)

2 = volum de tampó HTAB (mL)

P = pes de la mostra de fetge (g)

5 = Δ DO provocada per 1 unitat de MPO en 15 minuts (determinat amb una preparació comercial d'MPO).

3.11. QUANTIFICACIÓ DE CORTICOSTERONA PLASMÀTICA.

* Fonament de la quantificació.

La quantificació de corticosterona (CS) plasmàtica es va realitzar mitjançant un "Radioimmunoassaig" (RIA). Aquest mètode, descrit per Armario i Castellanos (*Armario i Castellanos, 1984*) per mostres de rata ha estat modificat i també posat a punt per a ratolí per M. Sitges del nostre departament, es basa en la competència que s'estableix entre l'hormona present a la mostra (hormona freda) i una quantitat coneguda d'hormona marcada amb l'isòtop radioactiu (hormona calenta). De forma que quan menys corticosterona hi hagi present a la mostra, més corticosterona marcada trobarem unida a l'anticòs. Un cop establerta la competència, la fracció no unida a anticòs precipita amb el carbó actiu. La detecció de la radioactivitat al sobrenedant es fa mitjançant un comptador β i gràcies a la utilització d'una patró de concentracions conegudes, podem calcular la concentració de l'hormona a les mostres.

Degut al fet que a plasma existeixen proteïnes amb una elevada afinitat per la corticosterona i poden interferir en la unió als anticòssos, es fa necessari un tractament previ de les mostres per tal d'eliminar aquestes interferències.

*** Material.**

- Material de vidre (*AFORA*)
- Microcentrífuga (*Biofuge A-Heraeus Spatech*)
- Liofilitzador (*Speed-Vac[®] Plus SC110A*)
- Tubs de polipropilè de 5 mL (*FUNGILAB*)
- Vials de cintil·lació (*Ponyvial, Packard Biosciences*)
- Centrifuga (*Jouan, CR 3.12*)
- Comptador β (*LÍQUID SCINTILLATION ANALYZER 1500, TRI-CARB[®], PACKARD*)

*** Reactius.**

- Solució de gelatina tamponada amb fosfats (tampó G): NaH_2HPO_4 (*Panreac*) 0.5 M, Na_2HPO_4 (*Panreac*) 0.5 M, gelatina (*Merk*) 1% i NaCl (*Panreac*) 0.9% preparat amb aigua bidestil·lada (AbD), a pH 8.2
- Acetona puríssima (*Panreac*)
- Etanol absolut (*Panreac*)
- Nitrogen líquid
- Anticòs de conill anti-corticosterona-3-(O-carboximetil)oxime conjugat amb albúmina sèrica bobina (*AB-1090 BIOCLIN*)
- Corticosterona: C2505 (*Sigma*)
- Corticosterona radioactiva: corticosterona tritiada (1,2,3,6,7 H (N)) (*NET-399 NEW ENGLAND PRODUCTS*)
- Carbó Actiu: C5260 (*Sigma*) preparat a l'1% en tampó G
- Líquid de cintil·lació (*ECOLITE*)

*** Preparació del material i les solucions de treball.****a. Rentat del material de vidre.**

Abans de començar cada valoració tot el material de vidre era rentat amb àcid nítric al 10% (p/v) durant un mínim de 4 hores. A continuació s'esbandia amb aigua corrent abundant. Després es feien 5-6 rentats amb aigua destil·lada (AD) i 5-6 rentats amb aigua bidestil·lada (AbD).

b. Tampó G.

Per tal de preparar un volum final de 1 litre es dissolien 1.41 g de Na_2HPO_4 en 20 mL d'AbD, i s'ajustava el pH a 8.6 amb NaH_2PO_4 0.5 M, ja que el pH inicial d'aquesta solució estava al voltant de 10. Per altra banda es dissolia 1 gram de gelatina en 300 mL d'AbD. Aquesta dissolució cal fer-la en calent perquè es dissolgui bé la gelatina, i en agitació suau per tal que no faci escuma. Un cop dissolta la gelatina, afegiem 9 grams de NaCl i els 20 mL de la barreja $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$. Ajustàvem el pH a 8.2 amb NaOH i a continuació enrasàvem fins a un volum final de 1 litre. Aquest tampó es podia conservar durant un mes a 4°C, però calia ajustar el pH cada cop que era utilitzat.

c. Solució de corticosterona radioactiva.

A partir de la solució comercial de corticosterona (1 mCi/mL) es preparava l'anomenada 1F diluint 25 μL d'hormona marcada amb 500 μL d'etanol absolut. Cada vegada que era preparada aquesta 1F realitzàvem una prova per tal de comprovar la radioactivitat de la solució. Aquesta prova consistia en assecar 1 μL de la solució 1F sota corrent de nitrogen i afegir, a continuació, 500 μL de tampó G. Agitàvem aquesta nova solució, anomenada 2F, amb el vòrtex durant 1 minut. Seguidament preparàvem 4 vials amb 4 mL de líquid de cintil·lació cadascun, als quals afegíem 100 μL de la solució 2F. Tapàvem els vials i agitàvem fins a observar un doble canvi de coloració: de transparent a blanc, i de nou a transparent. Els vials eren portats al comptador β . El comptatge havia de sortir entre 6000 i 7000 cpm/min.

Si el comptatge sortia més elevat calia afegir més tampó G a la solució 1F, en canvi si el comptatge era inferior al rang indicat calia afegir més hormona radioactiva a la solució 1F. Aquesta solució 1F era mantinguda a -20°C fins al moment de la seva utilització.

d. Patró de corticosterona no radioactiva.

Inicialment es preparava la solució mare de corticosterona a partir del producte comercial en pols a una concentració 1 ng/mL amb etanol absolut a un vial de vidre. Seguidament diluíem 0.1 mL de la solució mare de corticosterona comercial no radioactiva amb 0.9 mL d'etanol absolut. A continuació passàvem 192 μL a un tub eppendorf i l'assecàvem sota corrent de N_2 líquid. Per finalitzar es resuspenia amb 1 mL de tampó G, així constituïem el punt de la patró corresponent a la concentració 1920 ng de corticosterona/mL. A partir d'aquesta concentració d'hormona es preparava un banc de dilucions com s'indica:

CS 960 ng/mL: 500 µL de CS 1920 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 480 ng/mL: 500 µL de CS 960 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 240 ng/mL: 500 µL de CS 480 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 120 ng/mL: 500 µL de CS 240 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 60 ng/mL: 500 µL de CS 120 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 30 ng/mL: 500 µL de CS 60 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 15 ng/mL: 500 µL de CS 30 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 7.5 ng/mL: 500 µL de CS 15 ng/mL + 500 µL de tampó G
CS 3.75 ng/mL: 500 µL de CS 7.5 ng/mL + 500 µL de tampó G

e. Solució mare de l'anticòs.

El producte liofilitzat comercial es dissolia amb 2 mL de tampó G. Es feien alíquotes de 100 µL i es mantenien a -20 °C fins al moment de la seva utilització.

f. Carbó actiu.

El carbó actiu comercial calia rentar-lo prèviament a la seva utilització. Es dissolien 30 grams de carbó actiu en 1 litre d'aigua bidestil·lada (AbD) i es deixava agitant durant una nit a 4 °C. Al dia següent es parava l'agitació i es deixava precipitar durant 24 hores. A continuació decantàvem el sobrenedant i afegíem de nou 1 litre d'AbD. Aquest tractament es repetia dos vegades més. Un cop acabats els 3 rentats, centrifugàvem la solució de carbó actiu decantada durant 15 minuts a 3500 rpm, per extreure el màxim d'aigua. Seguidament es posava en una safata a l'estufa a 50 °C fins que quedava totalment sec. La duració aproximada de tot aquest tractament era de 5 dies.

*** Processament de la mostra.**

Fonament.

La valoració d'esteroides circulants mitjançant *RIA* té dificultats per dues causes: **(a)** reacció creuada dels esteroides amb similitud estructural; **(b)** presència de proteïnes circulants amb una elevada afinitat pels esteroides, que interfereixen en la unió de l'hormona a l'anticòs (*Armario i Castellanos, 1984*). En el cas de la corticosterona, degut a l'elevada afinitat de l'anticòs per l'hormona, no es consideren possibles reaccions creuades amb altres esteroides però si cal

considerar l'alta afinitat de la corticosterona per proteïnes circulants. Segons el mètode descrit per Armario i Castellanos (*Armario i Castellanos, 1984*), prèviament a la valoració calia una desproteïnitació de les mostres amb tripsina, però amb treballs posteriors realitzats per M. Sitges es va resoldre realitzar una extracció de la corticosterona amb acetona perquè sinó les interferències no eren totalment eliminades.

Procediment.

A 50 μL de mostra continguts a un tub eppendorf, afegiem 150 μL d'acetona puríssima i ho barrejàvem molt bé amb el vòrtex. Seguidament centrifugàvem durant 15 minuts en una microcentrífuga a una velocitat de 12000 x g. Un cop finalitzada la centrifugació, els plasmes es guardaven a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 24 hores. Passat aquest temps se centrifugava de nou durant 15 minuts en la microcentrífuga, a una velocitat de 12000 x g. Les operacions que implicaven la utilització d'acetona es van realitzar a la cambra freda (4°C), degut a que aquesta s'evaporava ràpidament. El sobrenedant recollit s'assecava amb l'ajut d'un liofilitzador prèvia congelació amb N_2 líquid. El temps necessari per tal que la mostra quedés totalment seca era de 2 a 3 hores. Abans de la valoració es resuspensia la mostra en tampó G amb el seu volum inicial, és a dir, amb 50 μL .

*** Procediment de quantificació.**

Descongelàvem les mostres i les patrons, i posàvem 5 μL de cadascuna en tubs RIA de 5 mL mantinguts en gel. A continuació afegiem 200 μL de tampó G. Seguidament afegiem 100 μL d'anticòs (diluït 1/100 amb tampó G) a cada tub i posteriorment 100 μL de l'hormona tritiada (hormona calenta). Es van tapar tots els tubs amb parafilm abans d'agitar amb el vòrtex. Després de 30 minuts al bany amb agitació a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, tots els tubs de RIA es van mantenir en aigua-gel (4°C) durant 60 minuts. Passat aquest temps d'incubació s'afegien 500 μL de carbó actiu, per tal que precipités la corticosterona no unida a l'anticòs. De nou, tots els tubs s'agitaven amb vòrtex i es mantenien durant 11 minuts en gel. Seguidament eren centrifugades durant 15 minuts a una velocitat de 24000 rpm a 4°C .

A 4 mL de líquid de cintil·lació continguts en vials de plàstic afegiem 700 μL de sobrenedant, els tapàvem i agitàvem aquest fins que observàvem un doble canvi de color: primer a blanc que desapareixia deixant la mostra de nou transparent. Fet això, es mesurava la radioactivitat al comptador β .

*** Càlculs.**

Per tal d'ajustar els valors de radioactivitat de la corba patró a una recta, vam transformar els eixos:

$$X = \log_{10} [CS]$$

$$Y = \ln (B_i / (B_o - B_i))$$

quedant finalment la recta ajustada segons la fórmula:

$$\ln (B_i / (B_o - B_i)) = a \log_{10} [CS] + b$$

on:

B_i = radioactivitat emesa per la mostra

B_o = radioactivitat emesa per una concentració 0 de corticosterona, és a dir, la màxima radioactivitat emesa.

3.12. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES PER A MICROSCOPIA ÒPTICA.

*** Material.**

- Pots de plàstic de 50 mL (*Rubilabor*)
- Motlles de plàstic per fer blocs (3 x 2,5 x 2 mm)

*** Reactius.**

- Tampó fosfat 0.4M: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*Merck*) 0.08M, K_2HPO_4 (*Panreac*) 0.32M, a pH 7.4
- Tampó fosfat salí 0.1M (PBS 0.1M): NaCl (*Panreac*) 0.15M en tampó fosfat 0.1M

- Paraformaldehid 4%: paraformaldehid (*Panreac*) al 16% en tampó fosfat salí 0.1M.
- Etanol absolut (AA), etanol 90% (A90) i etanol 70% (A70) (*Panreac*)
- Butanol pur (*Panreac*)
- Parafina pura (*Panreac*)
- Solució de gelatina: gelatina or (*Panreac*) al 0.1% en aigua corrent

* Procediment.

El tros de fetge que havíem separat per histologia, es submergia ràpidament en paraformaldehid al 4% on es mantenia durant tota la nit a 4°C i en agitació constant. Els animals eren sacrificats al matí o bé a la tarda (depenent de l'experiment) així el període que aquestes mostres es tenien en el fixador, oscil·lava entre 17 i 21 hores. Passat aquest temps, trèiem les mostres del fixador i realitzàvem 3 rentats de 5 minuts en PBS 0.1M. Seguidament, passàvem a deshidratar les mostres fent varies incubacions, totes a temperatura ambient, en alcohols de graduació creixent (A70, A90 i AA) de la següent manera:

- A70: una primera incubació d'una hora, seguida d'una altra incubació de mitja hora més.
- A90: dues incubacions d'una hora cadascuna.
- AA: dues incubacions de mitja hora cadascuna.

Després de la sèrie d'alcohols, vam utilitzar el butanol com agent intermediari. Aquest aplicat de manera gradual, desplaça totalment l'etanol de les mostres i les prepara per la seva posterior inclusió en parafina. Vam incubar les mostres 30 minuts en butanol, per després realitzar una segona incubació en una barreja de butanol-parafina (1:1). Aquesta barreja calia preparar-la dues hores abans de la seva utilització per tal que la parafina estigués totalment dissolta, i es mantenia a 60 °C fins el moment de la seva utilització. La incubació en butanol-parafina era d'una hora i calia realitzar-la també a 60°C. Finalment, extrèiem el fetge, l'assecàvem una mica en paper per tal d'eliminar l'excés de butanol, i l'incubàvem amb parafina pura duant tota la nit. Al dia següent realitzàvem dos incubacions més amb parafina pura, una d'elles de dues hores i la següent d'una hora. Després es construïen els blocs i es deixaven solidificar a temperatura ambient, durant un mínim de dos dies.

Un cop solidificats els blocs, les mostres eren tallades a 7 µm (micròtom de rotació AS325. *Anglia Scientific. Cambridge* del Departament de Biologia Cel·lular Animal i Vegetal de la Facultat de Biologia de la UB) i disposades en un bany maria a 37°C on hi havia la solució de gelatina. Això afavoria tant la descompressió dels talls com la seva adhesió als portaobjectes. Després els portaobjectes es deixaven assecar en una estufa a 40°C i es guardaven fins a la seva posterior utilització.

3.13. TINCIÓ AMB HEMATOXILINA-EOSINA DE MOSTRES HISTOLÒGIQUES INCLOSES EN PARAFINA.

*** Fonament.**

La tinció amb hematoxilina-eosina és una tinció doble basada en l'afinitat de les estructures per un o altre colorant. L'hematoxilina, colorant bàsic extret de *Celsapina campechiana*, tenyeix de color blavós estructures predominantment àcides com ara el nucli cel·lular. En canvi, l'eosina és una tetrabromofluoresceïna de caràcter àcid i basòfil·la que tenyeix el citoplasma de la cèl·lula d'un color rosat.

*** Reactius.**

- Hematoxilina (*Sigma*)
- Eosina (*Sigma*)
- Etanol absolut (AA), etanol 90% (A90) i etanol 70% (A70) (*Panreac*)
- Xilè (*Panreac*)
- Medi de muntatge (*DPX*) (*Panreac*)

*** Procediment.**

Per tal d'afavorir que els colorants penetressin millor a la mostra, aquestes eren prèviament desparafinades en xilè (dos incubacions de 8 minuts cadascuna) i seguidament

hidratades amb una sèrie de gradients decreixents d'alcohol (AA, A90, A70) de 5 minuts cadascuna. Després realitzàvem una última incubació de 5 minuts en H₂O destil·lada, abans de submergir les mostres en hematoxilina on restaven durant 4 minuts. Passat aquest temps, es procedia a extreure l'excés de colorant de les mostres rentant-les durant 10 minuts amb aigua corrent. D'altra banda, les sals de l'aigua permeten el viratge de la solució d'hematoxilina que passa de tenir un color inicialment vermellós a blavós. A continuació, incubàvem les mostres durant 8 minuts en eosina i procedíem a la seva deshidratació mitjançant dues incubacions de 5 minuts en AA més altres dues incubacions del mateix temps en xilè. Finalment, realitzàvem el muntatge de les mostres amb DPX i les deixàvem assecar un mínim de 24 hores.

Els temps d'incubació amb els colorants calia ajustar-los cada cop que fèiem tincions degut al fet que a mida que eren més antics l'afinitat pels teixits variava.

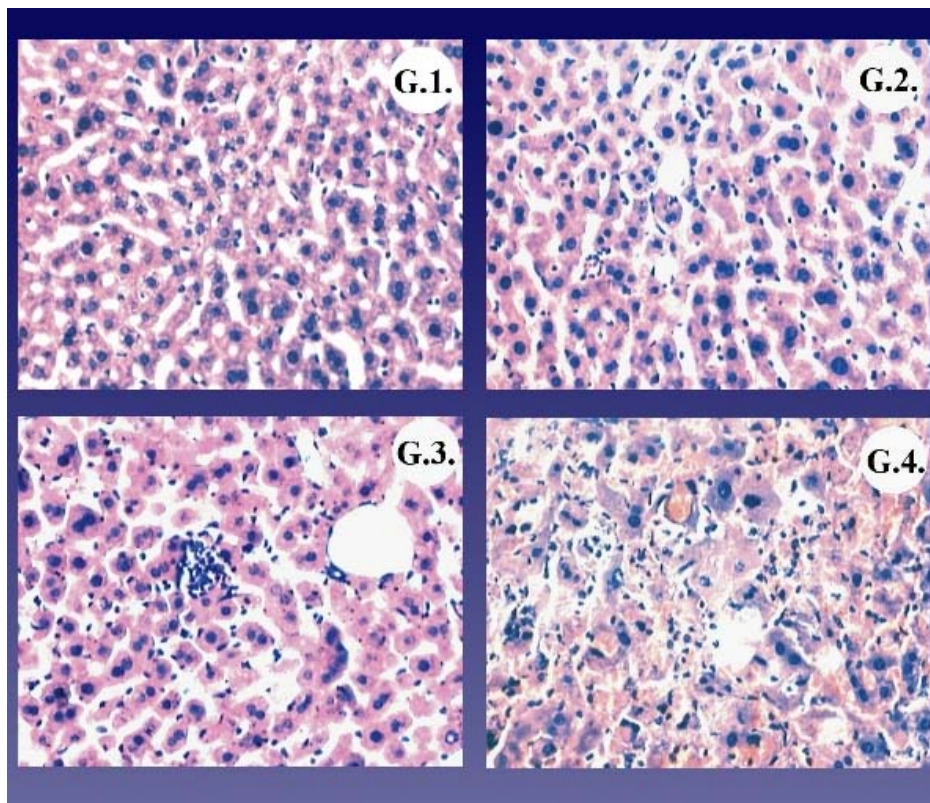
Les preparacions es van analitzar preliminarment al laboratori amb un microscopi òptic (*Olympus CH-2*). Posteriorment, es va procedir a fotografiar les mostres amb una cambra fotogràfica acoblada al microscopi òptic (*Olympus*) en els Serveis Científico-tècnics de la UB i a continuació eren transferides a l'ordinador per tal de ser analitzades.

3.14. QUANTIFICACIÓ DE DANY DE MOSTRES HISTOLÒGIQUES INCLOSES EN PARAFINA.

La quantificació del dany cel·lular en mostres tenyides amb hematoxilina-eosina es va fer per observacions directes de les mostres amb el microscopi òptic. Per cada mostra seleccionàvem 20 camps de forma aleatòria: 10 de la perifèria del tall i 10 de la part central. La selecció del camp es feia amb l'ocular de 10 (100 augments totals) i l'anàlisi del camp seleccionat es feia amb l'ocular de 40 (400 augments totals).

Per a la determinació del dany vam establir unes categories indicadores del grau de lesió existent al parènquima hepàtic:

- **grau 1 (G.1.):** aparença normal: parènquima sense evidències de dany i amb distribució dispersa de cèl·lules de Kupffer;
- **grau 2 (G.2.):** parènquima sense evidències de dany però amb aparició focal de nuclis picnòtics;
- **grau 3 (G.3.):** parènquima amb dany moderat i amb aparició de petits acúmul·ls de cèl·lules infiltrades a l'entorn d'una cèl·lula parènquimal o un petit grup de cèl·lules;
- **grau 4 (G.4.):** parènquima amb necrosi massiva, hemorràgies i acúmul·ls de cèl·lules infiltrades.



3.15. DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'IgGs DE CONILL.

3.15.1. Detecció per Western Blot.

Electroforesi.

*** Fonament de la tècnica.**

La separació de proteïnes mitjançant gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, gràcies a la presència de dodecilsulfat sòdic (SDS) i d'un agent reductor (Dithiotreitol-DTT) permet separar les proteïnes contingudes a una mostra pel seu pes molecular. En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dos gels de diferent concentració d'acrilamida: un gel concentrador i un gel separador. El primer presenta un entramat molecular més lax (en el nostre cas 3.3% de barreja acrilamida-bisacrilamida), i el gel separador forma en canvi un entramat molecular més dens (12%). Quan apliquem la corrent elèctrica, les proteïnes migren al gel concentrador i queden solapades a la interfase dels dos gels; això fa que les proteïnes entrin al gel separador al mateix temps. Dins aquest gel és on les proteïnes se separen pel seu tamany: avançant més aquelles que tenen un pes molecular més petit i quedant retingudes les d'un pes molecular més elevat. Degut a que la electroforesi es realitza en presència d'SDS i DTT no importa ni la càrrega ni la conformació nativa de les proteïnes ja que totes elles estan desnaturalitzades i tenen una càrrega negativa proporcional al seu pes molecular.

*** Material.**

- Sistema d'electroforesi Mini-PROTEAN III Cell (*BioRad*)
- Font d'electroforesi Power Pack 200 (*BioRad*)
- Paper *Whatman* 3mm (*BioRad*)
- Pipeta Hamilton (*Sigma-Aldrich*)

*** Reactius.**

- Barreja acrilamida-bisacrilamida: acrilamida (*BioRad*) 29.2% (p/v), bisacrilamida (*BioRad*) 0.8% (p/v), preparat amb aigua bidestil·lada. Un cop la barreja estava preparada era filtrada amb paper *Whatman* i era guardada a 4° C protegida de la llum.
- Tampó Tris 1.5 M: Trizma Base (*Roche*) preparat amb aigua destil·lada i ajustat el pH a 8.8.
- Tampó Tris 0.5 M: Trizma Base (*Roche*) preparat amb aigua destil·lada i ajustat el pH a 6.8.
- Solució SDS: SDS (*Merck*) preparat al 10% (p/v) amb aigua destil·lada.
- Solució de persulfat amònic (PSA) (*BioRad*) preparat al 10% (p/v) amb aigua destil·lada. Un cop preparada cal conservar-la a -20° C.
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametilediamina) (*BioRad*)
- Tampó d'electroforesi: Trizma Base (*Roche*) 25 mM, Glicina (*Sigma*) 191.8 mM i SDS (*Merck*) al 0.1% (p/v) preparat amb aigua destil·lada.
- Tampó de càrrega (concentrat x3): tampó Tris (0.5M, pH=6.8) 300 mM, Glicerol (*Panreac*) al 30% (p/v), SDS (*Merck*) al 10% (p/v) i blau de bromofenol al 0.01% preparat amb aigua destil·lada. El dia de la electroforesi afegiem DTT a una concentració de 100 mM.

*** Procediment.***Preparació de les mostres.*

Inicialment les mostres de plasma eren diluïdes amb aigua destil·lada com segueix: 1/15 les mostres provinents d'animals injectats via subcutània (sc), 1/30 les mostres provinents d'animals injectats via intraperitoneal (ip) i 1/2 les mostres provinents d'animals injectats via intravenosa (iv). A continuació preparàvem el tampó de càrrega tal i com s'indica a l'apartat anterior i l'afegiem a les mostres segons corresponia (és a dir, mantenint la proporció mostra:tampó 2:1). Un cop fetes totes les dilucions les mostres es posaven a bullir durant 5 minuts. Finalitzat aquest temps es feia un cop de centrífuga per tal de recuperar tot el volum de mostra.

Preparació dels gels i condicions de l'electroforesi.

Muntàvem els vidres (perfectament nets) on polimeritzarien els gels seguint les instruccions del fabricant, amb separadors de 1.5 mm d'amplada. A continuació comprovàvem la estanqueïtat del sistema afegint aigua destil·lada entre els dos vidres i abans de posar el gel assecàvem bé amb paper de filtre. Seguidament preparàvem la solució que en polimeritzar originaria el gel separador (12%) com segueix:

| | |
|---------------------------------|------|
| Aigua destil·lada (mL) | 3.35 |
| Acilamida-Bisacilamida 30% (mL) | 4.2 |
| Tampó Tris 1.5 mM (pH=8.8) (mL) | 2.63 |
| SDS 10% (µL) | 100 |
| PSA 10% (µL) | 150 |
| TEMED (µL) | 10.5 |

Barrejàvem tots els reactius seguint l'ordre indicat ja que quan afegim el PSA i el TEMED comença el procés de polimerització. Agitàvem per inversió i l'introduïem entre els dos vidres (aproximadament fins a uns 5 cm des de la part inferior). Ràpidament afegíem aigua destil·lada per sobre del gel (450-600 µL) per tal d'assegurar una superfície llisa al gel i també per evitar el contacte amb l'aire i excloure l'oxigen que inhibiria la polimerització. Mentre el gel separador polimeritzava, es preparava la solució que originaria el gel concentrador (3.3%), sense TEMED, com segueix:

| | |
|---------------------------------|------|
| Aigua destil·lada (mL) | 3.20 |
| Acilamida-Bisacilamida 30% (mL) | 0.60 |
| Tampó Tris 0.5 mM (pH=6.8) (mL) | 1.38 |
| SDS 10% (µL) | 55 |
| PSA 10% (µL) | 75 |
| TEMED (µL) | 5.5 |

Un cop el gel separador havia polimeritzat, eliminàvem l'aigua afegida mitjançant la introducció de Whatman entre els dos vidres. En aquest moment afegíem el TEMED a la solució que originaria el gel concentrador, agitàvem per inversió i l'abocàvem entre els dos vidres. A

continuació col·locàvem amb molta cura la pinta que originava els pouets destinats a contenir inicialment les nostres mostres.

Seguidament, i un cop polimeritzat el gel concentrador, ja podíem muntar els vidres amb el gel sobre el suport que constitueix la cubeta interna dels sistema Mini Protean III Cell. L'omplíem amb 150 mL de tampó d'electroforesi, assegurant-nos de que el gel quedava totalment submergit per la seva part superior. Retiràvem la pinta i rentàvem els pouets amb el mateix tampó d'electroforesi. Un cop nets, carregàvem les mostres (15 µL) als pouets amb una pipeta Hamilton.

A continuació tancàvem el circuit omplint la cubeta externa amb 350 mL de tampó d'electroforesi i aplicàvem un voltatge constant de 100 V durant 120-150 minuts, fins que el front (indicat pel blau de bromofenol del tampó de les mostres) sortia per la part inferior del gel.

Western Blot.

*** Fonament.**

L'anàlisi del tipus *Western Blot* és una tècnica d'immunodetecció emprada per a la detecció d'antígens específics d'interès en barreges complexes de proteïnes. La tècnica parteix d'una mostra en la que les proteïnes han estat separades prèviament en funció del seu pes molecular mitjançant tècniques d'electroforesi (*SDS-PAGE*). Aquestes proteïnes són transferides a una membrana sobre la qual es realitzarà la immunodetecció de la proteïna desitjada.

*** Material.**

- Mini Trans-Blot (*BioRad*)
- Font d'electroforesi Power Pack 200 (*BioRad*)
- Paper *Whatman* 3 mm (*BioRad*)
- Membrana de difluorur de polivinil, inmobilon-P (*Millipore*)
- Films ECL (*Amersham*)

*** Reactius.**

- Tampó de transferència: Trizma base (*Roche*) 25 mM, Glicina (*Roche*) 192 mM, SDS (*Merck*) al - 0.1 % i metanol (*Panreac*) al 10 %, preparat amb aigua destil·lada
- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució de bloqueig: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 5 % en PBS
- Anticòs: immunoglobulines G de cabra anti-IgG de conill conjugades amb peroxidasa (*Nordic Immunological*)
- MTP: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 0.5 % i Tween-20 (*Sigma*) al 0.05 % en PBS
- Kit ECL (*Amersham International*, UK)

*** Procediment.**Transferència.

Inicialment submergíem la membrana d'immobilon amb metanol durant 30 segons i després amb aigua destil·lada. Seguidament la equilibràvem uns minuts amb el tampó de transferència juntament amb les esponges i el gel. A continuació muntàvem el sistema de transferència segons les especificacions del fabricant. Quan es munta tot el sistema cal vigilar que no es formin bombolles entre el gel i la membrana, ja que dificultaria una correcta transferència. El gel quedava en contacte directe amb la membrana, en el costat més proper al càtode.

Refrigeràvem el tampó de transferència submergint parcialment la cubeta del Trans-Blot en gel alhora que introduïem dins la mateixa un petit recipient amb aigua congelada prèviament, proporcionada per *BioRad* a tal efecte. Ens ajudàrem d'una barra magnètica petita dins la cubeta de la transferència per tal que el tampó estigues continua i homogèniament fred.

La transferència es realitzava a 400 mA d'amperatge constant durant 90 minuts.

Immunodetecció.

Amb aquesta tècnica es poden identificar les proteïnes fixades sobre la membrana en el procés anterior (transferència) mitjançant el seu reconeixement específic amb anticossos. Consta de diferents fases: 1, bloqueig de la membrana; 2, incubació de la membrana amb un anticòs específic conjugat amb peroxidasa; 3, visualització del complex proteïna-anticòs.

1. Bloqueig de la membrana.

Finalitzada la transferència incubàvem la membrana amb 100 mL de la solució de bloqueig durant 60 minuts a temperatura ambient i en agitació vigorosa. Aquesta operació es realitza per tal d'ocupar els possibles llocs d'unió inespecífica de l'anticòs a la membrana mitjançant una solució de proteïna.

2. Incubació amb l'anticòs.

Després del bloqueig incubàvem la membrana amb l'anticòs, 100 mL a una concentració 1/10000 dins d'un cristal·litzador, durant 60 minuts a temperatura ambient i en agitació suau. Finalitzada aquesta incubació, fèiem 5 rentats de 5 minuts amb MTP (amb 150 mL a cristal·litzadors) i 3 rentats més de 5 minuts amb PBS.

3. Visualització.

Per a la detecció de les bandes de proteïna vam emprar el reactiu ECL seguint les especificacions del fabricant. Aquest mètode es basa en la emissió de llum després de la oxidació del luminol en presència de H_2O_2 , en una reacció catalitzada per la peroxidasa. La llum produïda es proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra i es captada sobre una pel·lícula fotogràfica. Les imatges foren digitalitzades amb l'ajut d'un escaner (*Scanner EPSON Expression 1680 Pro*).

3.15.2. Quantificació per ELISA.

* Fonament de la tècnica.

L'ELISA ("Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay") utilitzada per a la quantificació de IgG de conill en mostres de plasma de ratolins injectats amb sèrum de conill anti-EGF de ratolí, o amb anticòs neutralitzant d'EGF de ratolí, és del tipus "sandvitx" de fase sòlida. Els pous de la placa eren adsorbits amb un volum conegut de cadascuna de les mostres, per tal que les IgG de conill presents quedessin adsorbides al fons del pou. Per tal de determinar la quantitat d'immunoglobulines, es va fer servir una immunoglobulina G de cabra anti-conill conjugada amb peroxidasa. La peroxidasa catalitzava la transformació d'un substrat, la O-fenilendiamina, en presència de peròxid d'hidrogen, en un producte colorejat. Aquest permetia la lectura de la placa a una longitud d'ona de 492 nm. Així quantificàvem la quantitat de IgG de conill present a la mostra, ja que la intensitat de color obtingut era directament proporcional a la quantitat d'IgG present a la mostra.

* Material.

- Placa d'elevada adsorció de poliestirè de 96 pous per ELISA (*Costar-Cultek*, referència-3590)
- Lector de plaques d'ELISA (*Multiskan Plus MKII*)

* Reactius.

- Solució salina tamponada amb fosfats (PBS)
- Solució fixadora: isopropanol (*Fluka*) 25% en àcid acètic (*Panreac*) 10% v/v
- Solució de blocatge: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 5% en PBS
- Anticòs: immunoglobulines G de cabra anti-IgG de conill conjugades amb peroxidasa (*Nordic Immunological*)
- MTP: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 0.5% i Tween-20 (*Sigma*) al 0.1 % en PBS

- Solució de revelat: O-fenilendiamina (*Sigma*) 0.4 mg/mL, H₂O₂ (*Panreac*) 60 ppm en tampó citrat (*Panreac*) 0.15 M a pH=5
- HCl (*Panreac*) 2.5 M

* Procediment de la quantificació.

Es descongelaven les mostres de plasma i fèiem una dilució 1/5000 de cadascuna d'elles amb aigua destil·lada. Seguidament posàvem 100 µL de cadascuna de les mostres diluïdes a la placa i es deixava adsorbir durant tota la nit a 4 °C en una cambra humida.

Al dia següent es fixaven les mostres afegint 100 µL de la solució fixadora a tots els pous. La fixació es realitzava a temperatura ambient durant 15 minuts a la cambra humida. La placa es rentava a continuació 3 vegades amb PBS (1 minut per rentat). Per tal de buidar totalment els pouets, després d'abocar el líquid a la placa, es donaven uns quants cops a la placa invertida sobre un coixinet fet de paper de filtre.

Per eliminar la unió inespecífica de l'anticòs a la placa, es feia un blocatge consistent en afegir 350 µL de la solució de blocatge per pou i es mantenia així durant 30 minuts dins la cambra humida i en un bany a 37 °C amb agitació suau. Es rentava la placa 3 vegades amb MTP (1 minut per rentat). A continuació afegíem 100 µL per pou de l'anticòs (diluït 1/10000 en MTP). Així es deixava 90 minuts dins la cambra humida i en un bany a 37 °C amb agitació suau. Passat aquest temps es feien els 3 últims rentats amb MTP (1 minut per rentat) i afegíem 100 µL de solució de revelat per pou.

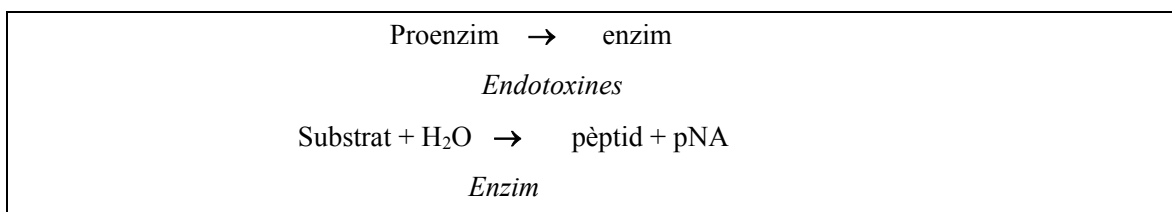
El revelat de la placa tenia lloc a les fosques i s'aturava aproximadament als 20 minuts (depenent de la intensitat del color) afegint 50 µL d'HCl 2.5 M, virant el color de groc a taronja. A continuació llegíem l'absorbància de la placa a 492 nm.

3.16. QUANTIFICACIÓ D'ENDOTOXINA EN MOSTRES DE PLASMA.

* Fonament de la tècnica.

El mètode cromogènic del lisat d'amebòcits de *Limulus* (LAL) és un mètode ràpid per a la quantificació d'endotoxina de bacteries gram-negatives.

LAL és un extracte de cèl·lules sanguínies (amebòcits) del cranc ferradura, el *Limulus polyphemus*. En presència d'endotoxines, certs proenzims presents al lisat d'amebòcits s'activen. Aquesta activació provoca una cascada proteolítica en la qual es produeix la hidròlisi d'un pèptid artificial i sense color (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA) existent al substrat cromogènic LAL (*Young i col., 1972*). La hidròlisi proteolítica d'aquest substrat allibera p-nitronilina (pNA), una substància de color groc que absorbeix a una longitud d'ona de 405 nm.



* Material.

- Plaques de valoració 96 pous estèril (*Costar-Cultek*)
- Combitips de 1.5 mL (*Rubilabor*)
- Incubador i lector de plaques: Photometer type SUNRISE (*TEKAN Austria GmbH*)

*** Reactius subministrats amb el mètode comercial QCL- 1000 Chromogenic LAL (CAMBREX, INNOGENETICS.)**

- Aigua reactiva per LAL (ARL)
- Endotoxina d'*E. Coli* per fer la corba patró
- Substrat cromogènic
- Lisat d'amebòcits de *Limulus* (LAL)

*** Reactius no subministrats amb el mètode comercial QCL- 1000 Chromogenic LAL (CAMBREX, INNOGENETICS).**

- Solució STOP: àcid acètic (*Panreac*) preparat al 25% amb aigua destil·lada
- Aigua esterilitzada

*** Procediment.**

Obtenció de les mostres.

Degut al fet que volem determinar la concentració d'endotoxina a les mostres de plasma, cal recollir-les i tractar-les amb material prèviament esterilitzat.

Preparació de la corba patró.

El vial de l'endotoxina bacteriana, que contenia aproximadament entre 15-30 UE/mL, era reconstituït afegint 1 mL d'aigua reactiva per LAL (ARL). La concentració d'endotoxina al vial era determinada pel valor indicat al certificat de qualitat. Un cop reconstituït el vial era agitat vigorosament durant 15 minuts amb l'ajut d'un vòrtex, aquest punt és important perquè l'endotoxina té la tendència d'enganxar-se al vidre.

A partir de la solució mare d'endotoxina realitàvem una primera dilució amb ARL fins a obtenir una concentració final d'endotoxina de 1 UE/mL. Seguidament es realitzava un banc de dilucions com s'indica:

0.5 UE/mL.- 500 µL de 1 UE/mL + 500 µL ARL

0.25 UE/mL.- 500 µL de 1 UE/mL + 1500 µL ARL

0.1 UE/mL.- 100 µL de 1 UE/mL + 900 µL ARL

0 UE/mL.- 1mL ARL

El rang de concentracions escollit va ser aquest perquè entre aquests punts la relació és lineal.

Procediment de la quantificació.

Degut a la existència de determinats productes inhibitoris inespecífics a les mostres (Friberger i col., 1982), es realitzava un tractament previ a la quantificació, consistent en diluir la mostra amb ARL i escalfar-les a 70 °C durant 10 minuts. En el nostre cas les mostres control es van diluir 1/5 i les mostres provinents d'animals injectats amb endotoxines es van diluir 1/500. Finalitzat el tractament de les mostres es deixaven a temperatura ambient. Seguidament preparàvem la corba patró tal i com s'ha indicat amb anterioritat i es deixava a temperatura ambient.

Començàvem la quantificació afegint 50 µL de cadascuna de les mostres i punts de la patró als pous de la placa (prèviament pre-escalfada a 37 °C). En aquest punt reconstituïem el lisat d'amebòcits de *Limulus* amb ARL, i afegíem 50 µL a tots els pous. Deixàvem incubant 10 minuts a 37 °C. Durant aquesta incubació reconstituïem el substrat cromogènic i l'escalfàvem a 37 °C.

Finalitzada la primera incubació afegíem 100 µL del substrat cromogènic a tots els pous i deixàvem incubant durant 6 minuts a 37 °C. Quan afegíem aquest reactiu es produïa l'aparició d'un color groguenc a les mostres que contenien endotoxina. Aturàvem la reacció afegint 100 µL d'àcid acètic a tots els pous i llegíem l'absorbància a 405 nm.

3.17. ANÀLISI ESTADÍSTICA.

Per cadacun dels experiments presentats es va realitzar una anàlisi estadística dels resultats. De cada grup experimental es va calcular la mitjana i el seu error estàndard, de la següent manera:

$$\bar{X} = (1/n) \sum_{i=1}^n X_i$$

$$S^2 = (1/(n-1)) \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

$$E.S. = \sqrt{(S^2/n)}$$

on:

S^2 = variància

N = nombre de dades

X_i = valors de cada dada

Alhora de determinar si les diferències existents entre els grups experimentals eren significatives o simplement eren degudes a la variabilitat biològica o experimental, vam utilitzar el test de la *t* de *Student* o el test de l'ANOVA d'un o de dos factors. Quan utilitzàvem el test de l'ANOVA d'un factor aplicàvem el post-test de Tukey. Mentre que quan utilitzàvem el test de l'ANOVA de dos factors aplicàvem el post-test de Tukey o el post-test de Bonferroni.

Calculat el valor de *t*, i en funció dels graus de llibertat, es va calcular, mitjançant les taules adients, la probabilitat (*p*) de que la diferència observada entre les mitjanes dels grups que comparàvem fos únicament deguda a l'atzar:

- si $p \geq 0.05$, la diferència observada entre els dos grups no era significativa,

- si $0.01 \leq p < 0.05$, amb una probabilitat major o igual al 95% els grups eren significativament diferents. Representat com (*)

- si $0.001 \leq p < 0.01$, amb una probabilitat major o igual al 99% els grups eren significativament diferents. Representat com (**)

- si $p < 0.001$, amb una probabilitat major a 99.9% els grups eren significativament diferents. Representat com (***)

Tot l'anàlisi estadístic presentat en aquest treball va ser realitzat amb el programa *GraphPad Prism* de *GraphPad Software, Inc.*

En alguns casos ha estat necessari un tractament de dades obtingudes als diferents experiments prèviament a la seva anàlisi estadística.

Per una banda calia determinar si la variància era homogènia perquè és una condició necessària per l'aplicació dels diferents tests seleccionats. L'aplicació dels test de Barlett (*Ramírez, 1981*) responia aquesta qüestió i en els casos en que les diferències entre variàncies fossin significatives es procedia a la transformació logarítmica de la variable. Si ara la variància era homogènia es procedia a l'aplicació del test escollit, amb les mitjanes i variàncies de la variable transformada.

Per altra banda, en els experiments de perfusió de fetge les dades van ser ajustades a l'equació d'una corba o d'una recta, per a la seva posterior comparació.

Resultats

4.1. PRIMERA PART.

**Un model d'estrès social: confrontació
entre mascles.**

L'EGF és sintetitzat i emmagatzemat a les glàndules submaxil·lars (SMG) en els ratolins mascles adults. Estudis realitzats al nostre laboratori per Grau i col.laboradors (Grau i col., 1994) van mostrar que l'estimulació dels receptors α_1 -adrenèrgics produeix una ràpida secreció de l'EGF des de les glàndules submaxil·lars, majoritàriament cap a la saliva (secreció exocrina) i també cap al plasma (secreció endocrina). Aquest fenomen havia estat ja descrit per Byyny i col.laboradors (Byyny i col., 1974) i per Tuomela (Tuomela, 1990). En el nostre laboratori però, també van poder observar com aquest EGF secretat sota l'acció d'aquests estímuls interferia en els efectes metabòlics més característics de les catecolamines, tant al fetge (Grau i col., 1997), com al teixit adipós (Tebar i col., 1993; Tebar i col., 1996; Tebar i col., 2000).

Experiments realitzats amb posterioritat per M.P. Mena al nostre laboratori van mostrar que l'estrès per immobilització també produeix una important secreció d'EGF des de les glàndules submaxil·lars cap al plasma (Tebar i col., 2000; Fernández-Varó i col., 2000). En tots aquests sistemes, la concentració d'EGF augmenta des de valors basals subnanomolars, fins a 1-3 nM. En canvi, un estudi antic de Nexo i col.laboradors (Nexo i col., 1981) mostrava que el comportament agressiu incrementava la concentració d'EGF unes 300 vegades. Nosaltres vàrem reproduir aquests resultats (Sánchez, 1999).

En els treballs fets al laboratori per obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica tant Anna Arnau com jo mateixa (Arnau, 1999; Sánchez, 1999) vàrem observar que diferents tipus d'estrès provocaven lesions tissulars de diferent intensitat i distribució. Així, per exemple, vàrem observar que en la immobilització dels animals a 4 °C (Sánchez, 1999), no hi havia secreció d'EGF des de les glàndules submaxil·lars i en canvi es produïen lesions tissulars molt importants. Per aquest motiu vam voler estudiar amb més profunditat la situació d'estrès en que s'allibera una gran quantitat d'EGF de les glàndules submaxil·lars, i la seva relació amb les lesions tissulars.

4.1.1. EXPERIMENT I.- Estudi de les alteracions durant la confrontació entre mascles.

Durant les 3 hores que duraven els nostres experiments, el pes dels animals es mantingué constant, mentre que el pes del fetge davallava de forma gairebé constant (figura 4.1).

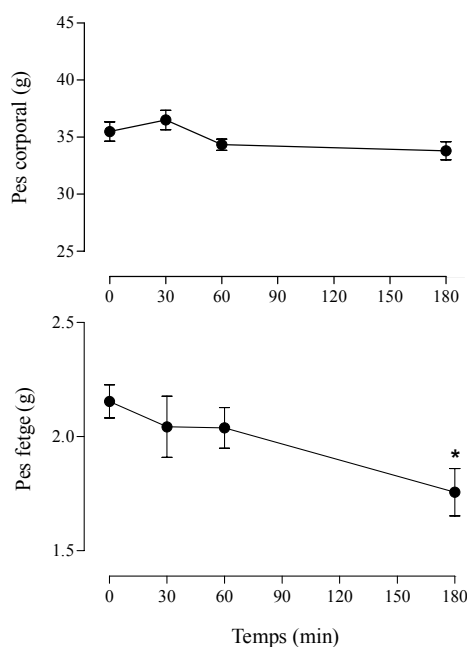


Figura 4.1.- Estrès per confrontació: paràmetres corporals. L'animal intrús era introduït a la gàbia d'un animal resident. Transcorregut el temps indicat es retirava l'intrús i era immediatament sacrificat per a la obtenció de mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 6-7 animals per grup. La significativitat de les diferències determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: *, $p < 0.05$.

La concentració de corticosterona havia augmentat 18 vegades als 30 minuts i, tot i una lleugera tendència a disminuir, es va mantenir elevada fins als 180 minuts (figura 4.2). Per altra banda, la concentració de glucosa en plasma es mantingué relativament constant, mentre que pel contrari el contingut de glicogen hepàtic davallà de forma gradual durant tot l'estudi (figura 4.2).

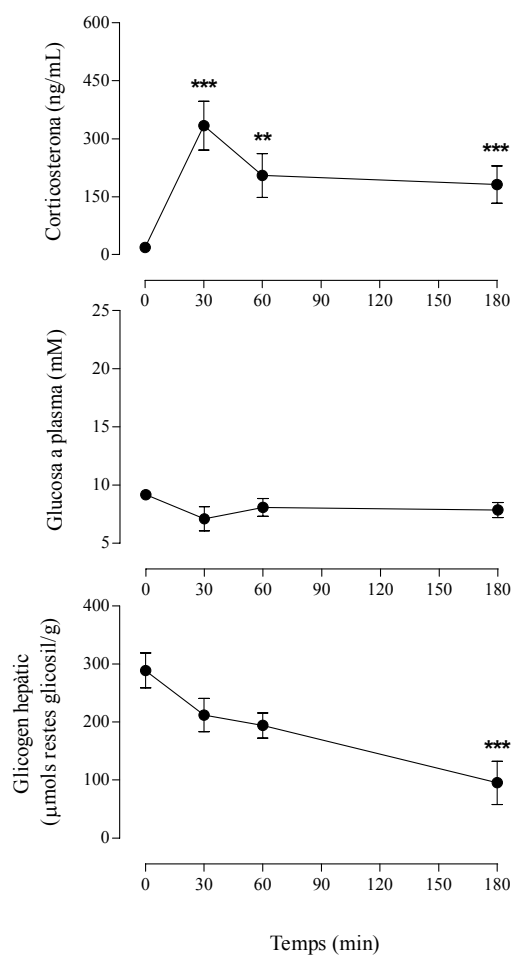


Figura 4.2.- Estrès per confrontació: paràmetres indicadors d'estrès. L'animal intrús era introduït a la gàbia d'un animal resident. Transcorregut el temps indicat es retirava l'intrús i era immediatament sacrificat per a la obtenció de mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 6-7 animals per grup. La significativitat de les diferències determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

La figura 4.3 mostra la concentració de citocines proinflamatòries al plasma. Als 30 minuts s'havia produït un lleu augment de la concentració de TNF- α però als 60 minuts ja havien retornat als nivells basals. En canvi veïem que es produïa un increment gradual de la concentració de la IL-6 al llarg del temps, arribant al seu nivell màxim després de 180 minuts de confrontació, quan la concentració d'aquesta citocina era 130 vegades superior al nivell basal.

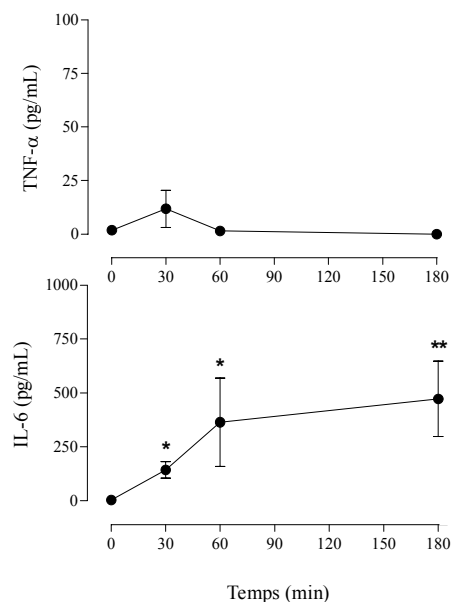


Figura 4.3.- Estrès per confrontació: citocines proinflamatòries en plasma. L'animal intrús era introduït a la gàbia d'un animal resident. Transcorregut el temps indicat es retirava l'intrús i era immediatament sacrificat per a la obtenció de mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 6-7 animals per grup. La significativitat de les diferències determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

A la figura 4.4 mostrem l'evolució de les activitats enzimàtiques a plasma. La LDH seguia un patró d'increment progressiu. Aquesta mateixa tendència s'observa a les dues transaminases estudiades: AST i ALT. Al 180 minuts, l'increment de LDH fou de 3.4 vegades, el d'AST de 3.7 i el d'ALT de 3 vegades. No vàrem observar cap variació en l'activitat CK. Per últim, es va determinar l'activitat de l'enzim α -HBDH, però només als ratolins que havien lluitat 180 minuts i als seus controls corresponents. Els valors obtinguts en els dos grups van ser: 0.70 ± 0.36 nKat/mL pels animals controls i 1.40 ± 1.17 nKat/mL pels exposats a confrontació. La diferència no era estadísticament significativa.

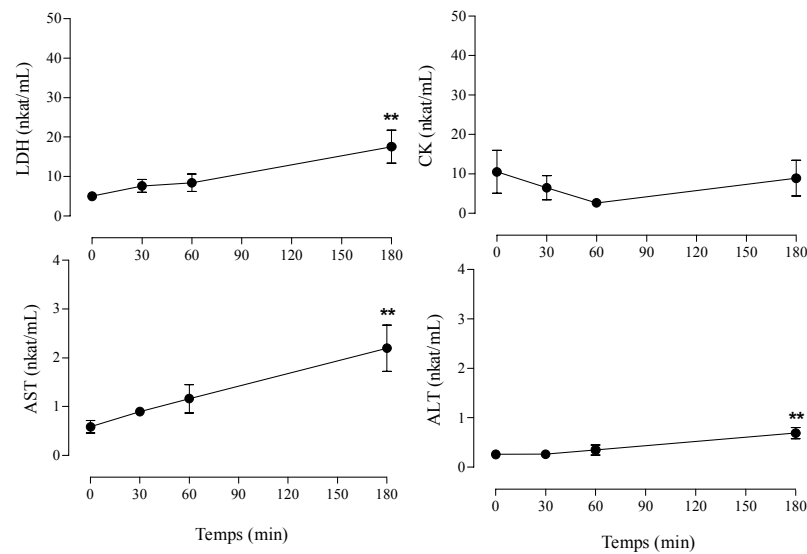


Figura 4.4.- Estrès per confrontació: activitats enzimàtiques en plasma. L'animal intrús era introduït a la gàbia d'un animal resident. Transcorregut el temps indicat es retirava l'intrús i era immediatament sacrificat per a la obtenció de mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 6-7 animals per grup. La significativitat de les diferències determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: **, $p < 0.01$.

Els resultats obtinguts de mesurar l'EGF a teixits i a plasma es mostren a la figura 4.5. Als 30 minuts ja s'havia produït una disminució del 42% en la quantitat d'EGF en les glàndules submaxil·lars. Aquests valors es van mantenir gairebé constants fins als 180 minuts. En aquest mateix temps els nivells d'EGF a plasma s'havien multiplicat per 100. Als 60 minuts s'assolien els nivells màxims de fins a 500 vegades els valors basals. Tot i haver disminuït, als 180 la concentració era encara superior al valor basal. Al fetge la concentració d'EGF augmentava de forma gradual fins als 60 minuts, i a continuació disminuïa fins a retornar als nivells basals.

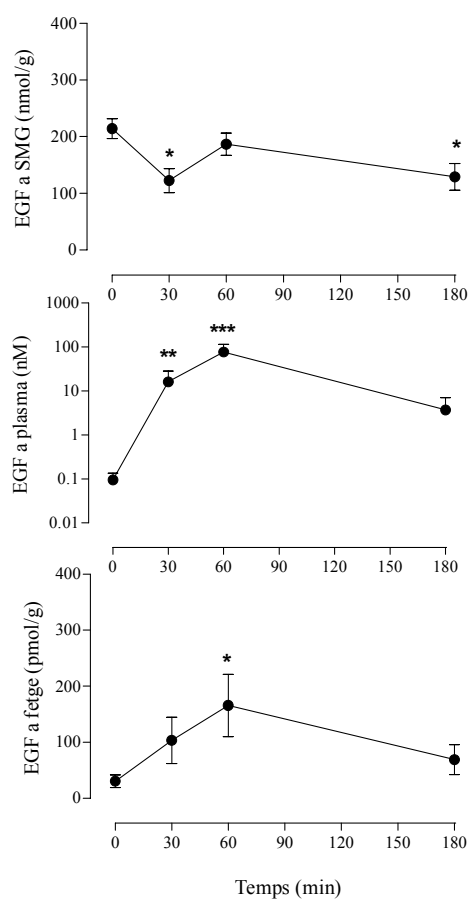


Figura 4.5.- Estrès per confrontació: concentració d'EGF. L'animal intrús era introduït a la gàbia d'un animal resident. Transcorregut el temps indicat es retirava l'intrús i era immediatament sacrificat per a la obtenció de mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 6-7 animals per grup. La significativitat de les diferències determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Finalment a la figura 4.6 mostrem l'especificitat de la nostra valoració d'EGF. Aquesta prova ja havia estat realitzada l'any 94 (*Gau i col., 1994*) i s'havia comprovat que el sèrum de conill anti-EGF no reconeixia el TGF- α , però en aquesta ocasió havíem volgut extendre l'anàlisi a un altre membre de la família de l'EGF: *Heparin Binding EGF-like Growth Factor* (HB-EGF). Tal i com es pot veure el sèrum de conill anti-EGF només reconeixia l'EGF de ratolí.

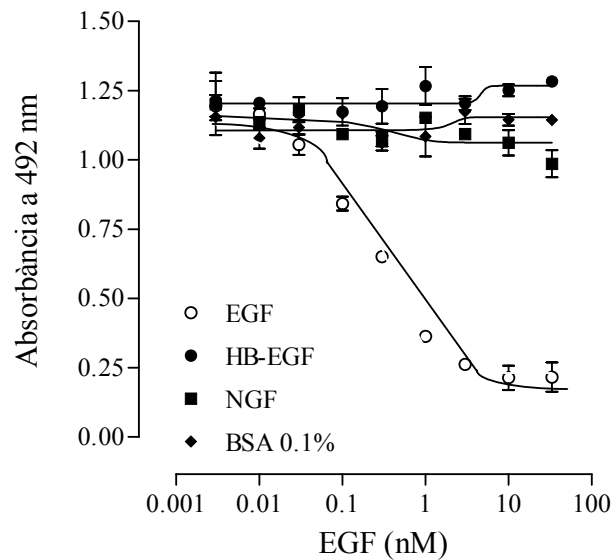


Figura 4.6.- Especificitat de l'ELISA. Concentracions creixents d'EGF de ratolí (EGF), d'*Heparin Binding EGF-like growth factor* recombinant humà (HB-EGFh), de *Nerve Growth Factor* de ratolí (NGF) i BSA al 0.1% en PBS van ser preparades amb MTP i es van utilitzar per competir amb l'EGF de ratolí adsorvit a la placa (1 ng) per la unió de l'anticòs de conill anti-EGF de ratolí. Només l'EGF de ratolí produeix en forma dosi-dependenta el desplaçament dels anticossos units a l'EGF de ratolí adsorvit.

4.1.2. EXPERIMENT II.- Estudi de la recuperació després de la confrontació entre mascles.

Un cop caracteritzat el model de confrontació entre mascles vam voler analitzar com es recuperaven els diferents paràmetres que havien estat alterats durant l'estrès social ocasionat quan desapareixia l'estímul.

La concentració de glucosa era lleugerament inferior al grup que havia lluitat durant 3 hores (figura 4.7), però es recuperava ràpidament, i es mantenia gairebé inalterada 5 i 21 hores després de la confrontació. En canvi les concentracions de glicogen hepàtic havien disminuït un 60% a les 3 hores al grup d'animals que havien lluitat. Aquesta diferència desapareixia 5 hores després de la desaparició de l'estímul estresant ja que les concentracions de glicogen dels dos grups s'igualaven, i posteriorment s'anaven recuperant de forma molt semblant.

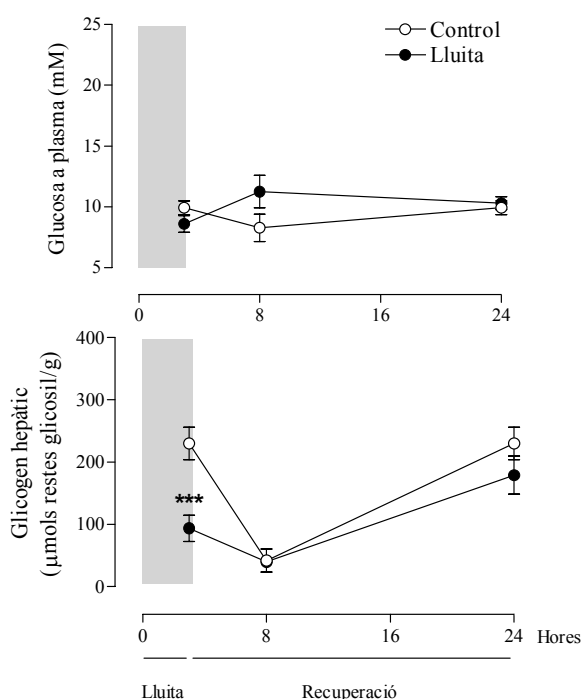


Figura 4.7.- Recuperació del glicogen hepàtic. Els animals eren sotmesos a un període de lluita de 3 hores, mentre que els animals controls eren mantinguts a les seves gàbies. Transcorregut aquest temps retornaven a les seves gàbies amb lliure accés a l'aigua i al menjar. Als temps indicats els animals eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 5-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA dos factors, i post-test de Bonferroni, venen donades per: ***, $p < 0.001$.

Les activitats LDH, AST i ALT en plasma seguien un patró semblant (figura 4.8). Després d'assolir un pic màxim d'activitat finalitzat el període de confrontació, a les 5 hores les activitats eren encara elevades (només de forma estadísticament significativa per l'AST). Passades 21 hores s'assolien els nivells basals.

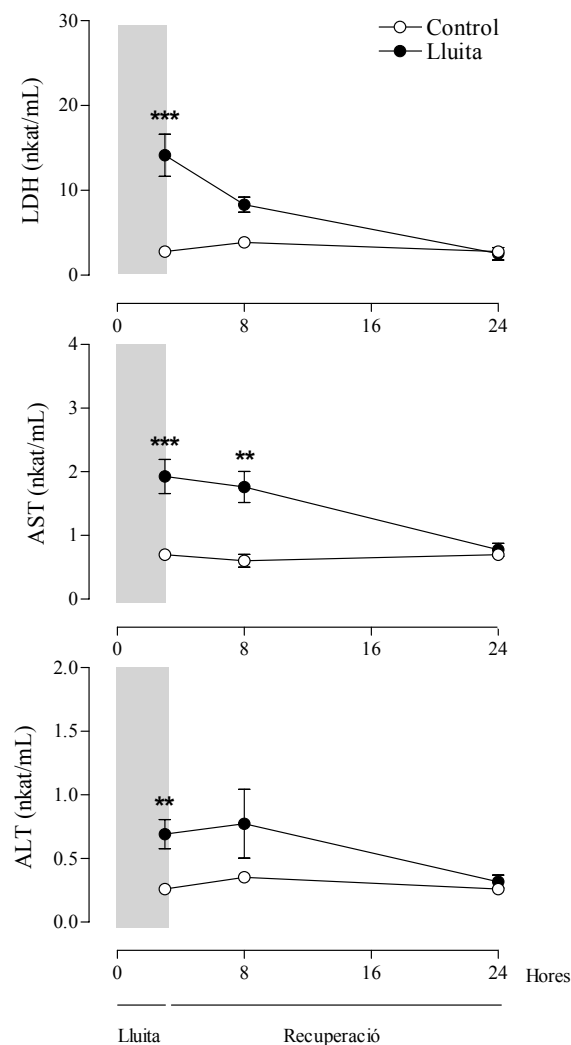


Figura 4.8.- Recuperació de les activitats enzimàtiques en plasma.

Els animals eren sotmesos a un període de lluita de 3 hores, mentre que els animals controls eren mantinguts a les seves gàbies. Transcorregut aquest temps retornaven a les seves gàbies amb lliure accés a l'aigua i al menjar. Als temps indicats els animals eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 5-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA dos factors, i post-test de Bonferroni, venen donades per: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Després de 3 hores les concentracions d'EGF a glàndules submaxil·lars havien disminuït un 48% (figura 4.9), i 21 hores després de la lluita els valors inicials encara no s'havien restablert. Per altra banda les concentracions d'EGF a plasma després de 3 hores de confrontació es trobaven augmentades, encara que no de forma estadísticament significativa, i disminuïen al llarg del període de recuperació.

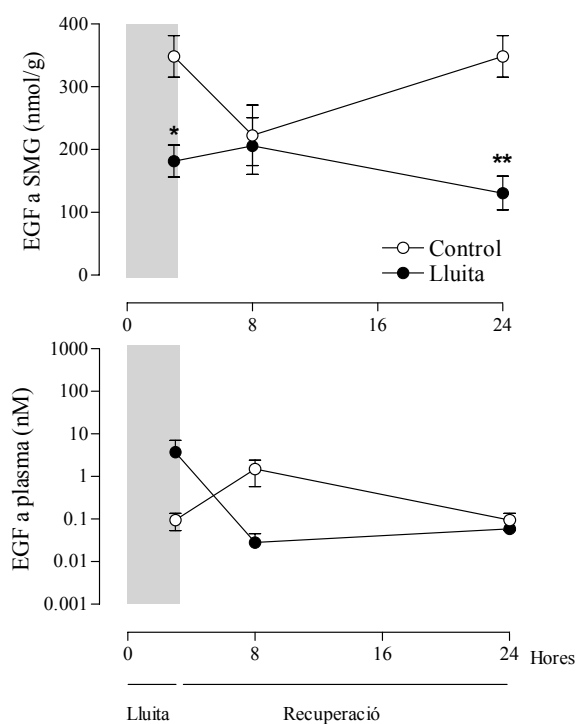


Figura 4.9.- Recuperació de la concentració d'EGF. Els animals eren sotmesos a un període de lluita de 3 hores, mentre que els animals controls eren mantinguts a les seves gàbies. Transcorregut aquest temps retornaven a les seves gàbies amb lliure accés a l'aigua i al menjar. Als temps indicats els animals eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 5-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA dos factors, i post-test de Bonferroni, venen donades per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

A la figura 4.10 es pot observar l'activitat MPO valorada a fetge. Només detectàvem un suau increment d'aquesta activitat després de 8 hores des de l'inici de l'aplicació de l'estímul estressant que encara es mantenia després de 24 hores. Les diferències però no arribaven a ser significatives.

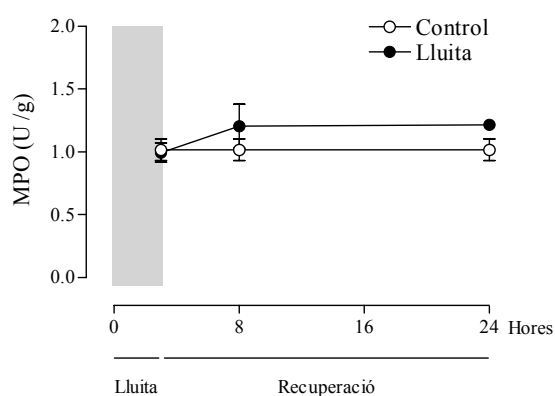


Figura 4.10.- Activitat mieloperoxidasa (MPO) en fetge després de la confrontació. Els animals eren sotmesos a un període de lluita de 3 hores, mentre que els animals controls eren mantinguts a les seves gàbies. Transcorregut aquest temps retornaven a les seves gàbies amb lliure accés a l'aigua i al menjar. Als temps indicats els animals eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 5-11 animals per grup. L'anàlisi ANOVA un factor aplicat no va detectar diferències significatives.

De tots aquests animals havíem seleccionat un tros de fetge per fer una anàlisi histològica i a la figura 4.11 es poden observar alguns exemples de les lesions aparegudes al parènquima hepàtic dels animals a les 5 o 21 hores de recuperació post-estrès. En aquestes seccions histològiques vam realitzar una anàlisi semiquantitativa del grau d'afectació segons el criteri de Camargo i col·laboradors (*Camargo i col., 1997*) que estableix 4 graus d'afectació (1: normal; 2: lesió lleu; 3: lesió clara; 4: lesió intensa). Els resultats de la quantificació en mostren a la figura 4.12. Podem observar que el grau d'afectació dels fetges provinents d'animals que havien lluitat era 1.3 vegades superior respecte als animals que no havien lluitat. Aquest grau d'afectació encara era elevat a les 21 hores després de la finalització del període de confrontació.

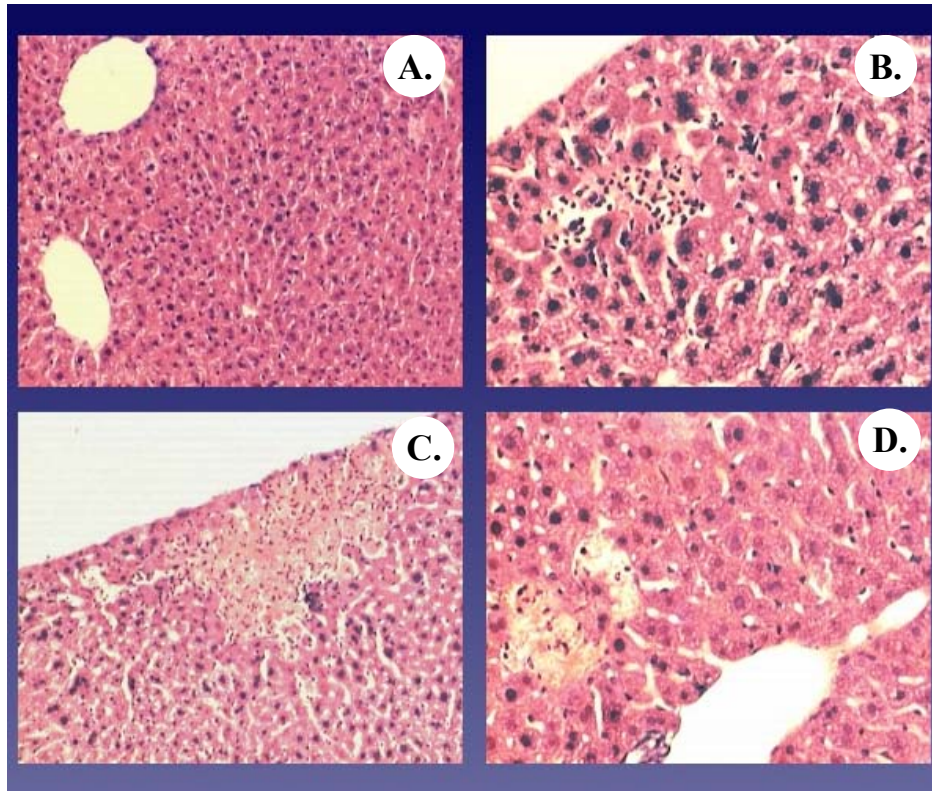


Figura 4.11.- Evidències morfològiques de lesions necròtiques en fetges provinents de ratolins sotmesos a estrès per confrontació. Les imatges corresponen a seccions ($7\mu\text{m}$) provinents de fetges inclosos amb parafina i tenyides amb hematoxilina-eosina. A: es mostra l'estructura d'un parènquima hepàtic control (x60). B: detall de zona necròtica d'un animal sotmès a 3 hores de lluita i 5 hores de recuperació (x600). C: es mostra zona necròtica d'un animal sotmès a 3 hores de lluita i 5 hores de recuperació (x300). D: detall una zona necròtica d'un animal sotmès a 3 hores de lluita i 21 hores de recuperació (x600).

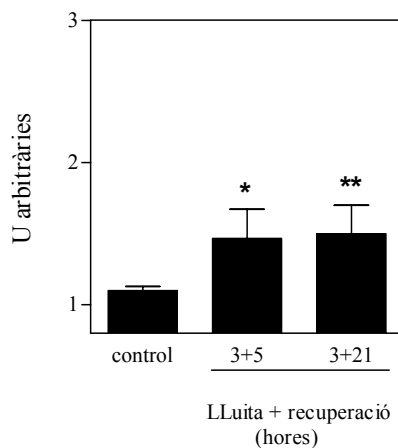


Figura 4.12.- Quantificació del grau d'afectació del fetge després de la confrontació. Es va determinar el grau d'afectació en les preparacions dels fetges d'animals sotmesos a estrès per confrontació durant 3 hores i sacrificats 5 o 21 hores després. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 3-7 animals per grup. La significativitat de les diferències respecte del temps 0 determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.1.3. EXPERIMENT III.- Habitució a l'estrès provocat per la confrontació entre mascles.

Es conegut que l'exposició a un estímul estressant de forma repetitiva provoca una disminució en la intensitat de la resposta a aquest estímul, ja que es produeix el fenomen de l'habitució (McCarty i col., 1992). Per conèixer si en l'estrès per agressió també es produeix habitució, vam dissenyar l'experiment III.

L'habitució va provocar que l'increment en la concentració de corticosterona al plasma fos menor (figura 4.13). La glucosa plasmàtica no va variar en cap dels grups estudiats. En canvi, i tal com havíem vist als experiments anteriors, es podia veure una forta davallada de la concentració del glicogen al fetge ($p < 0.001$), però sense diferències entre els animals habituats i els no habituats.

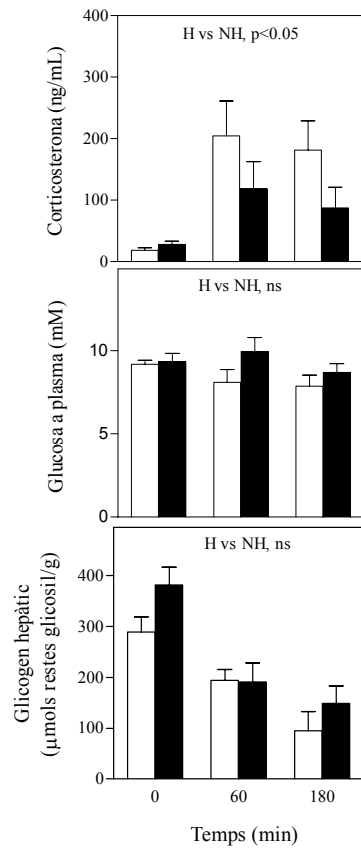


Figura 4.13.- Habitució a l'estrès per confrontació: paràmetres indicadors d'estrès. Ratolins no habituats (barres blanques) i habituats (barres negres) eren dividits en 3 grups segons el període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60 i 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 6-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els animals no habituats (NH) i els habituats (H) van ser determinades mitjançant una ANOVA de dos factors.

Els animals sotmesos a estrès de forma crònica tenien unes activitats enzimàtiques al plasma inferiors al grup estressat de forma aguda (figura 4.14). Per als tres enzims estudiats, LDH, AST i ALT, s'observava el mateix comportament: mentre que en animals no habituats, als 60 minuts ja s'aprecien increments, en els habituats, només s'observava als 180 minuts.

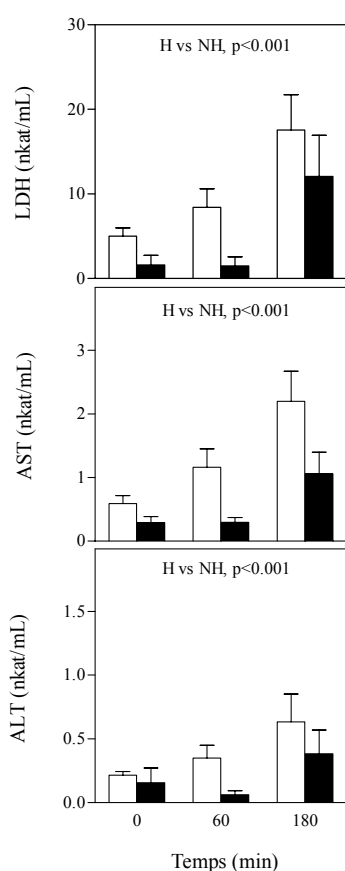


Figura 4.14.- Activitats enzimàtiques en plasma en l'habitució a l'estrès per confrontació. Ratolins no habituats (barres blanques) i habituats (barres negres) eren dividits en 3 grups segons el període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60 i 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 6-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els animals no habituats (NH) i els habituats (H) van ser determinades mitjançant una ANOVA de dos factors.

Finalment a la figura 4.15 es troben representades les variacions en la concentració d'EGF. Podem detectar que es produïa una disminució de la quantitat d'EGF ($p < 0.01$) a les glàndules submaxil·lars de forma gradual al llarg del temps en tots dos grups d'animals. És molt destacable que la concentració d'EGF al plasma en els animals habituats gairebé no augmenta ni després de 60 ni als 180 minuts de lluita.

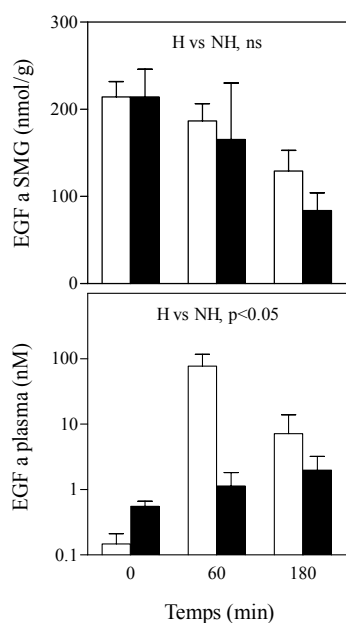


Figura 4.15.- Concentració d'EGF en l'habitució a l'estrès per confrontació. Ratolins no habituats (barres blanques) i habituats (barres negres) eren dividits en 3 grups segons el període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60 i 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 6-11 animals per grup. Les diferències significatives entre els animals no habituats (NH) i els habituats (H) van ser determinades mitjançant una ANOVA de dos factors.

4.2. SEGONA PART.

**Estudi de l'acció de l'EGF sobre les
lesions hepàtiques produïdes per la
confrontació entre mascles.**

Durant els estudis realitzats per M. Pareja al nostre laboratori per obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica, va mostrar que l'EGF exerceix una acció citoprotectora al cor (Pareja i col., 2003). Per aquest motiu vam voler observar si aquesta mateixa acció citoprotectora es produïa al teixit hepàtic. En el nostre model d'estrès observàvem l'aparició d'un dany hepàtic lleu i vam voler analitzar com evolucionarien aquestes lesions si érem capaços de bloquejar l'acció de l'EGF.

4.2.1. EXPERIMENT IV.- Sialoadenectomia.

La sialoadenectomia és una operació quirúrgica consistent en l'extracció de les glàndules submaxil·lars (SMG), principal lloc de síntesi i emmagatzematge d'EGF en el ratolí mascle (Fisher i Lakshmanan, 1990). Per tant amb la seva eliminació estàvem eliminant la major font de secreció d'EGF cap al corrent circulatori. Aquesta estratègia ha estat utilitzada per mostrar, per exemple, la importància de l'EGF en la producció de llet i el desenvolupament de les glàndules mamàries al final de la gestació (Okamoto i Oha, 1984) o la seva funció en la maduració de les espermatides i, per tant, en la funció reproductora masculina (Tsutsumi i col., 1986). Per posar de relleu la contribució a la reparació de ferides (Noguchi i col., 1991), o la funció citoprotectora en l'intestí (Rao i col., 1997).

Tal i com es pot observar l'evolució de tots els paràmetres analitzats era molt similar als resultats que havíem obtingut en anteriors experiments: disminució de glicogen hepàtic i augment de la corticosterona plasmàtica (figura 4.16); també augmentaven les activitats LDH, AST i ALT al plasma al llarg del temps d'estudi (figura 4.17). En cap cas però, la resposta es veïa alterada per la sialoadenectomia.

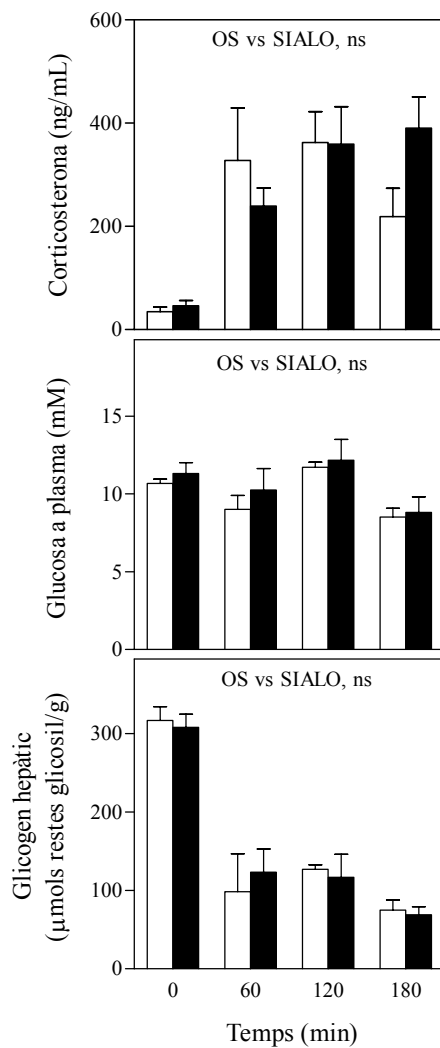


Figura 4.16.- Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: paràmetres sensibles a l'estrès. Ratolins sialoadenectomitzats (barres negres) o sotmesos a una operació simulada (barres blanques) eren dividits en 4 grups segons al període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60, 120 i 180 minuts. Inmediatament eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-18 animals per grup. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els sotmesos a una operació simulada (OS).

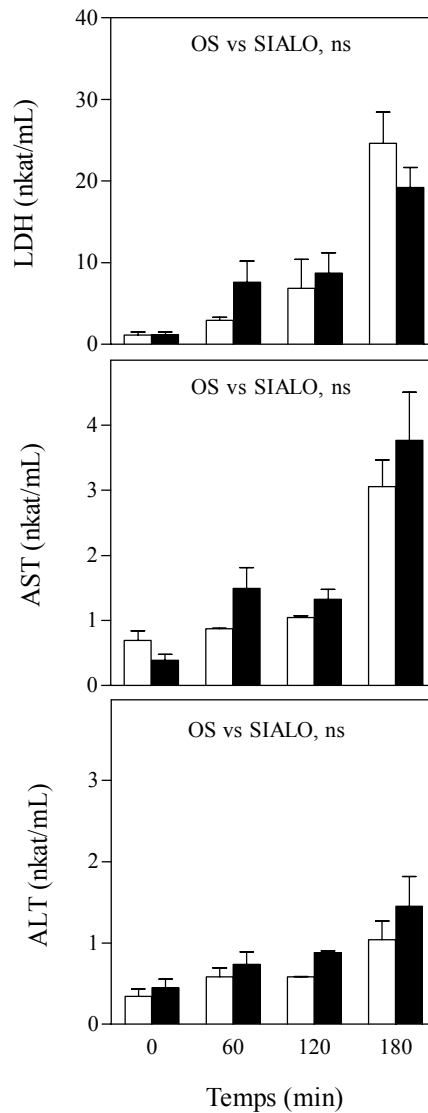


Figura 4.17.- Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: activitats enzimàtiques en plasma. Ratolins sialoadenectomitzats (barres negres) o sotmesos a una operació simulada (barres blanques) eren dividits en 4 grups segons al període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60, 120 i 180 minuts. Immediatament eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-18 animals per grup. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els sotmesos a una operació simulada (OS).

Als animals OS es produïa una suau disminució del contingut d'EGF a les glàndules submaxil·lars (figura 4.18). Però sorprenentment la concentració d'EGF plasmàtic augmentava tant als animals OS (38 vegades) com als animals SIALO (132 vegades) als 60 minuts de confrontació. Aquest efecte també es produïa a fetge, on érem capaços de detectar un augment d'EGF a tots dos grups experimentals.

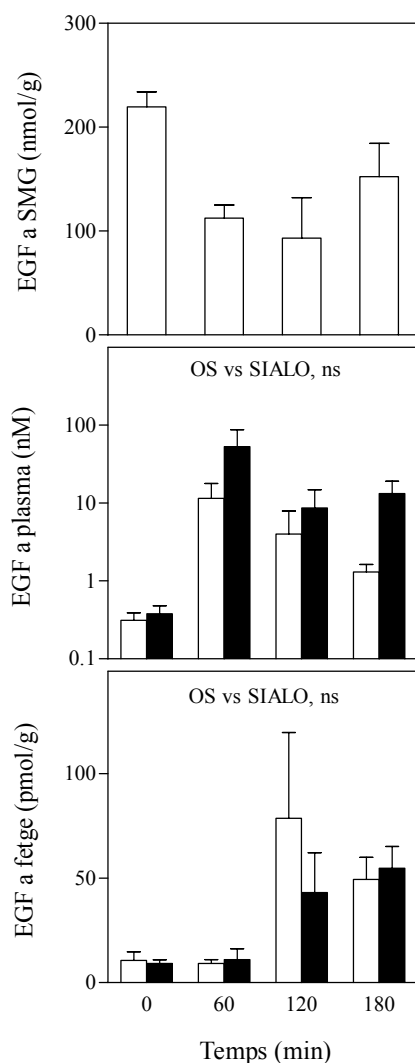


Figura 4.18.- Efecte de la sialoadenectomia en la confrontació: concentració d'EGF. Ratolins sialoadenectomitzats (barres negres) o sotmesos a una operació simulada (barres blanques) eren dividits en 4 grups segons al període de lluita al qual eren sotmesos: 0, 60, 120 i 180 minuts. Immediatament eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-18 animals per grup. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els sotmesos a una operació simulada (OS).

4.2.2. EXPERIMENT V.- Anticossos anti-EGF.

La utilització d'anticossos anti-EGF ha estat una altra estratègia àmpliament descrita a la bibliografia com un mètode efectiu per tal d'inhibir els efectes d'aquest factor de creixement, tan "in vivo" com en cultius cel·lulars, i així conèixer més acuradament els processos en els quals es troba implicat.

Per una banda l'administració d'anticossos en ratolins femella embarassades ha demostrat l'importància de l'EGF per al correcte desenvolupament del fetus (*Oohira, 1991*) i, a posteriori, com és necessari per a un desenvolupament adequat dels nounats (*Zschiesche i Eckert, 1988; Zschiesche, 1989*). Aquesta estratègia ha permès també detectar l'efecte de l'EGF sobre l'acumulació de teixit adipós en ratolins femella ovariectomitzades (*Kurachi i col., 1993*) i ratolins femella velles (*Adachi i col., 1995*). Així mateix, amb aquest mètode s'ha pogut revelar la importància de l'EGF durant la regeneració hepàtica de rates hepatectomitzades (*Vesey i col., 1992*). Per altra banda, també existeixen estudis realitzats "in vitro" mitjançant els quals s'ha pogut observar, per exemple, com l'EGF es troba implicat en els mecanismes pels quals el TGF- β potencia la síntesis de DNA induïda per la hormona estimulant dels fol·licles (FSH) en fol·licles aïllats de hámster (*Roy, 1993*). I, en estudis relacionats amb el càncer, aquesta estratègia s'ha utilitzat per estudiar el creixement de diferents cèl·lules tumorals humanes (*Chen, 1992*).

Per aquest motiu vam voler emprar aquesta nova estratègia consistent en la utilització d'anticossos anti-EGF per tal de segrestar l'EGF circulant i així bloquejar la seva acció, ja que la seva eliminació mitjançant sialoadenectomia havia estat descartada.

Les diferents activitats enzimàtiques valorades, LDH, AST i ALT, es troben representades a la figura 4.19. Podem veure que els nivells assolits per cadascuna d'elles són molt similars entre elles, independentment del tractament rebut, i sempre molt superiors als valors basals (2.4 ± 0.68 per LDH, 0.71 ± 0.09 per AST i 0.36 ± 0.04 per ALT).

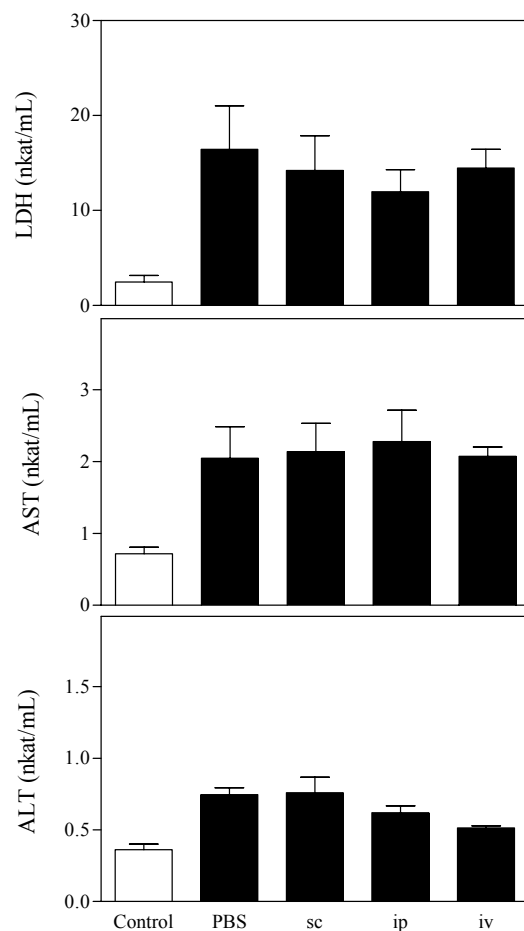


Figura 4.19.- Efecte de la injecció d'anticossos anti-EGF sobre les activitats enzimàtiques al plasma després de la confrontació. Ratolins injectats amb PBS (10 minuts abans) o amb anticossos anti-EGF per via subcutània (sc, 48 hores abans), intraperitoneal (ip, 2 hores abans) o intravenosa (iv, 1 hora abans) van ser sotmesos a 180 minuts de confrontació. Seguidament eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 4-10 animals per grup. L'anàlisi ANOVA d'un factor aplicat no va detectar diferències significatives respecte del grup PBS.

Com a control experimental, vàrem mesurar les IgGs de conill anti-EGF al plasma dels animals injectats (amb sèrum o amb IgGs purificades). En primer lloc vam realitzar una anàlisi del tipus *western-blot*. A la figura 4.20 (pannell A) s'observen les bandes corresponents a les cadenes lleugeres (24 KD) de les immunoglobulines anti-EGF al plasma dels animals injectats amb sèrum anti-EGF - tan per via subcutània, com intraperitoneal - i també al plasma dels animals que havien rebut una injecció intravenosa d'IgGs anti-EGF. A més a més, vam quantificar aquestes IgGs de

conill mitjançant una *ELISA* directa del tipus *sandvitx* de fase sòlida, i el resultat d'aquesta quantificació el podem veure a la figura 4.20 (pannell B). A l'eix ordenades es van representar els diferents grups d'animals i a l'eix abscisses la lectura de l'absorbància a 492 nm (indicadora de la concentració relativa d'immunoglobulines) assolida per cadascun dels grups estudiats. Al plasma dels animals que havien rebut una injecció de sèrum anti-EGF de ratolí, via subcutània o intraperitoneal, es detectava un important increment de l'absorbància respecte dels animals injectats amb PBS. Així mateix veiem que augmentava l'absorbància al plasma dels animals que havien rebut una injecció intravenosa d'IgGs anti-EGF, però aquest augment era molt més moderat que els anteriors.

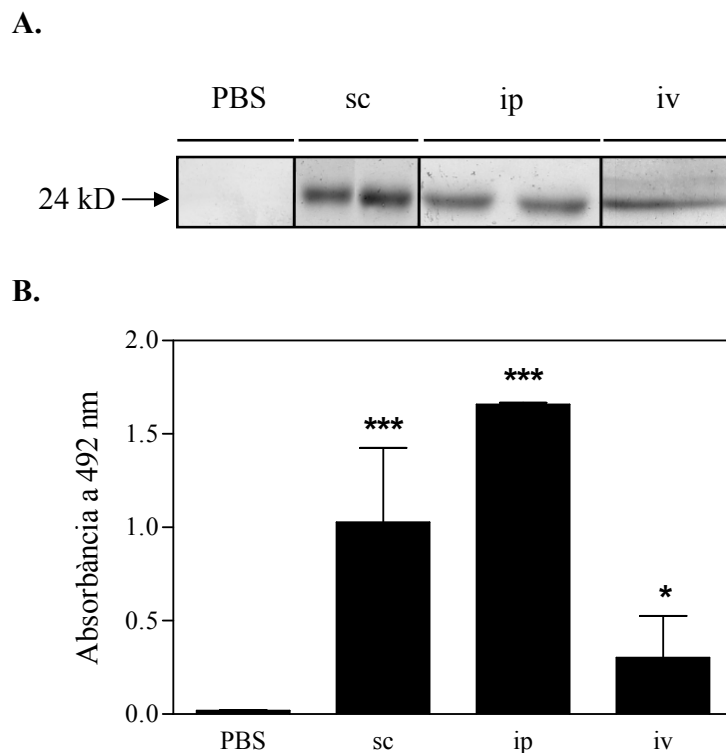


Figura 4.20.- Presència de les IgGs de conill al plasma dels animals injectats amb anticossos anti-EGF després de la confrontació. Ratolins injectats amb PBS (10 minuts abans) o amb anticossos anti-EGF per via subcutània (sc, 48 hores abans), intraperitoneal (ip, 2 hores abans) o intravenosa (iv, 1 hora abans) van ser sotmesos a 180 minuts de confrontació. Seguidament eren sacrificats. A: detecció de IgGs de conill mitjançant anàlisi western blot. B: quantificació de IgGs de conill mitjançant ELISA. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 4-10 animals per grup. Les diferències significatives respecte al grup PBS determinades mitjançant ANOVA d'un factor venen donades per: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

A la figura 4.21 mostrem les concentracions d'EGF al plasma després de 180 minuts de confrontació. La concentració d'EGF en els animals injectats amb PBS es corresponien als nivells que havíem trobat en els no tractats i sotmesos a 180 minuts de confrontació (experiments previs). Sorprenentment, en els animals injectats amb sèrum anti-EGF aquest paràmetre es trobava molt elevat: tan als injectats per via subcutània, com als injectats per via intraperitoneal. En canvi, la concentració d'EGF al plasma dels animals tractats per via intravenosa amb IgGs anti-EGF era idèntica a la detectada al grup tractat amb PBS. En un experiment complementari i en què injectàvem 10 vegades més anticòs (50 µg en comptes de 5 µg), els nivells d'EGF detectats al plasma augmentaven gairebé fins a 100 nM (dades no mostrades). En aquest experiment, les activitats enzimàtiques (LDH, AST i ALT) mesurades en plasma tampoc diferien de les observades anteriorment (dades no mostrades).

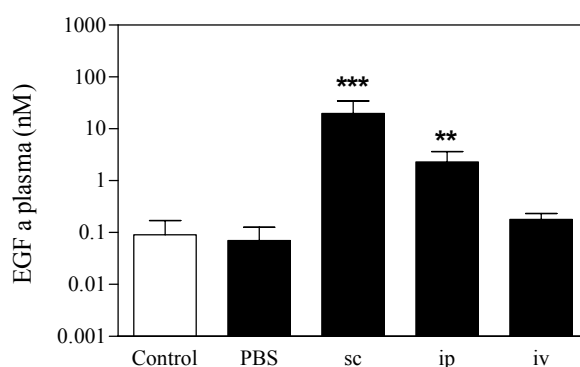


Figura 4.21.- Efecte de la injecció d'anticossos anti-EGF sobre la concentració d'EGF després de la confrontació. Ratolins injectats amb PBS (10 minuts abans) o amb anticossos anti-EGF per via subcutània (sc, 48 hores abans), intraperitoneal (ip, 2 hores abans) o intravenosa (iv, 1 hora abans) van ser sotmesos a 180 minuts de confrontació. Seguidament eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 4-10 animals per grup. Les diferències significatives respecte al grup PBS determinades mitjançant ANOVA d'un factor venen donades per: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

4.2.3. EXPERIMENT VI.- Tirfostina AG-1478.

Els experiments en què preteníem evitar l'acció de l'EGF tot impedit l'increment de concentració (sialoadenectomia) o neutralitzar-lo (anticossos) no havien tingut resultats positius. Per això, vam decidir abordar una nova estratègia consistent en la utilització de un inhibidor específic del seu receptor.

El receptor d'EGF, EGFR o ErbB1, pertany a la família dels ErbB, caracteritzada per tenir un domini citoplasmàtic amb activitat tirosina-cinasa (*Carpenter i Cohen, 1990*). La tirfostina AG-1478 és un inhibidor del receptor d'EGF que actua inhibint l'activitat tirosina-cinasa, bloquejant l'autofosforilació d'aquest receptor (*Livitzki i Gazit, 1995*). Més recentment s'ha descrit que aquesta mateixa tirfostina també pot inhibir ErbB4 (*Bowers i col., 2001; Fukazowa i col., 2003*). Al nostre laboratori Miguel Pareja havia treballat amb aquesta tirfostina durant els seus experiments per obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica i per aquest motiu sabíem que era un sistema efectiu per bloquejar l'acció de l'EGF a través d'ErbB1 (*Pareja, 2001*).

Degut al fet que la tirfostina AG-1478 s'havia de dissoldre en dimetilsulfòxid, i està descrit com un dissolvent tòxic (*Montaguti i col., 1994; Bartsch i col., 1976*), vam realitzar un assaig preliminar per tal de detectar quina concentració d'aquest dissolvent era totalment innòcua. A la taula 4.1 es pot observar com la solució de dimetilsulfòxid al 10% no provocava increment al plasma de cap dels enzims que vam seleccionar com a indicadors de dany tissular. Per aquest motiu vam seleccionar aquesta concentració per dissoldre la tirfostina AG-1478.

Taula 4.1.- Activitats enzimàtiques en plasma de ratolins injectats amb dimetilsulfòxid (DMSO) a diferents concentracions.

| | Percentatge DMSO | | |
|---------------|------------------|-------------|--------------|
| | 0% | 10% | 100% |
| LDH (nkat/mL) | 1.81 ± 0.62 | 1.81 ± 0.23 | 32.58 ± 2.66 |
| AST (nkat/mL) | 0.54 ± 0.07 | 0.61 ± 0.09 | 3.06 ± 0.64 |
| ALT (nkat/mL) | 0.31 ± 0.02 | 0.31 ± 0.05 | 2.52 ± 0.22 |

Els ratolins eren injectats amb 100 µL de dimetilsulfòxid al 0%, 10%, o 100% preparat amb aigua destil·lada. Transcorreguts 180 minuts eren sacrificats per obtenir el plasma.

Observem que la tirfostina AG-1478 no provoca cap canvi en la resposta dels paràmetres sensibles a estrès representats a la figura 4.22. Tampoc afecta als paràmetres mostrats a la figura 4.23, ja que la presència de la tirfostina no afecta a les concentracions d'EGF a glàndules submaxil·lars i plasma. En canvi, podem veure que l'activitat LDH i AST es trobaven més elevades al grup d'animals que havia estat tractat amb la tirfostina (figura 4.24). Pel contrari, l'activitat ALT no era significativament diferent en els animals que havien rebut la tirfostina, respecte dels seus controls (animals que havien lluitat després de rebre la injecció del dissolvent).

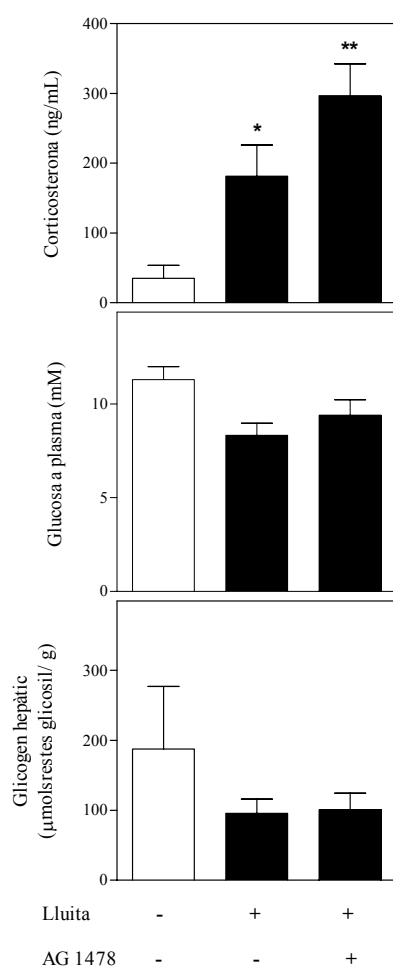


Figura 4.22.- Efecte de l'AG-1478 sobre els paràmetres sensibles a l'estrès durant la confrontació. Els ratolins eren injectats amb AG-1478 (25 mg/kg, via ip) o amb PBS just abans de ser introduïts dins la gàbia del resident. El període de lluita establert va ser de 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-8 animals per grup. La significativitat de les diferències respecte del control de lluita determinada mitjançant ANOVA d'un factor ve donada per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

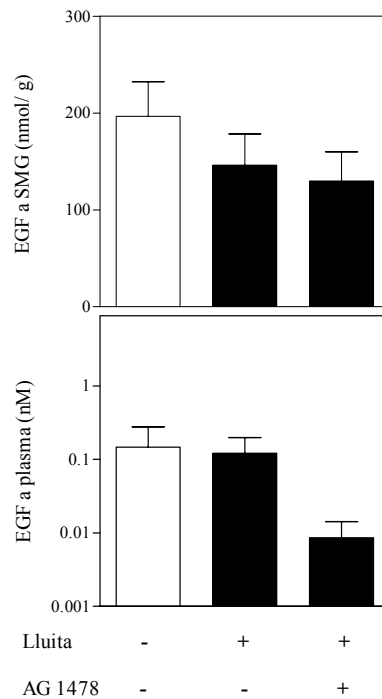


Figura 4.23.- Efecte de l'AG-1478 sobre la concentració d'EGF durant la confrontació. Els ratolins eren injectats amb AG-1478 (25 mg/kg, via ip) o amb PBS just abans de ser introduïts dins la gàbia del resident. El període de lluita establert va ser de 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-8 animals per grup. L'anàlisi ANOVA d'un factor aplicat no va detectar diferències significatives respecte del control de lluita.

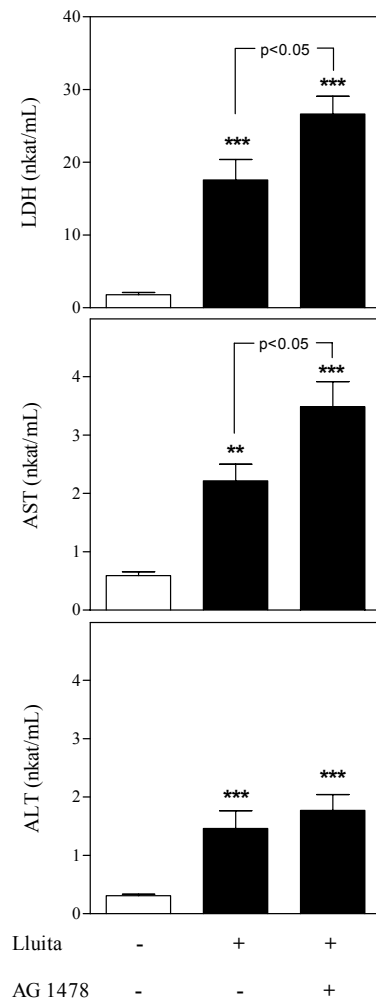


Figura 4.24.- Efecte de l'AG-1478 sobre les activitats enzimàtiques en plasma durant la confrontació. Els ratolins eren injectats amb AG-1478 (25 mg/kg, via ip) o amb PBS just abans de ser introduïts dins la gàbia del resident. El període de lluita establert va ser de 180 minuts. Immediatament després eren sacrificats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-8 animals per grup. La significativitat de les diferències respecte del control de lluita determinada mitjançant ANOVA d'un factor i post-test t-Student ve donada per: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

4.3. TERCERA PART.

**Un model d'estrès físic-immune:
injecció d'endotoxina bacteriana (LPS)**

Els estudis descrits en l'apartat anterior ens indicaven clarament que l'EGF alliberat al plasma com a conseqüència de la confrontació agressiva entre mascles, no tenia cap influència sobre l'aparició de lleus lesions hepàtiques. En una línia diferent però, Senaldi i col·laboradors (*Senaldi i col., 1998*) havien observat que l'EGF, i també l'HGF i el KGF, protegien el fetge de la acció citotòxica de l'endotoxina bacteriana. Un model en el que les lesions són molt més intenses. Anys després, mentre desenvolupàvem ja els nostres estudis de confrontació entre mascles, Deaciuc i col·laboradors (*Deaciuc i col., 2002*) va mostrar que la injecció repetida d'EGF prevenia tant les lesions provocades per l'alcohol, com la sensibilització que aquest provoca sobre l'efecte hepatotòxic de l'endotoxina. Per tot això vàrem decidir continuar els nostres estudis sobre la funció hepatoprotectora de l'EGF, en el model d'estrès físic-immune provocat per l'endotoxina bacteriana.

La injecció d'endotoxina bacteriana o lipopolisacàrid de les bactèries gram-negatives (LPS) constitueix un molt bon model per a l'estudi de l'aparició i evolució de les lesions hepàtiques ja que causa un síndrome de resposta sistèmica inflamatòria i un xoc sèptic, el qual finalment pot acabar desenvolupant una errada multiorgànica, acompanyat d'una mort cel·lular extensiva (*Bannerman i Goldblum, 2002; Jirillo i col., 2002*).

En tots els estudis realitzats, la injecció d'endotoxina bacteriana era combinada amb D-Galactosamina (D-GalN), inhibidor de la transcripció, perquè els ratolins, a diferència dels humans i dels cavalls (*Freudenberg i col., 2001*), no són tan sensibles a l'acció del LPS i així aconseguíem potenciar l'acció de la endotoxina (*Morikawa i col., 1996; Endo i col., 1999; Sass i col., 2002*).

4.3.1. EXPERIMENT VII.- Estudi preliminar: dosi letal 50.

En primer lloc, vàrem estudiar l'efecte de l'LPS sobre la supervivència dels animals (figura 4.25). Tots els animals sobreviuen 4 hores després de la injecció d'LPS (entre 1 i 300 µg/Kg). Entre les 4 i les 8 hores, observàvem una mortalitat creixent a mesura que havien rebut una dosi d'LPS més elevada. Fins a les 24 hores encara van morir alguns animals, però a partir d'aquest moment ja no vam enregistrar més morts. Per cada temps fixat, vàrem construir corbes de supervivència en funció de la dosi. Això ens permetia calcular la dosi letal 50 (DL₅₀) que va ser de 80 µg LPS/Kg a les 8 hores i 20 µg LPS/Kg a les 24 i 48 hores.

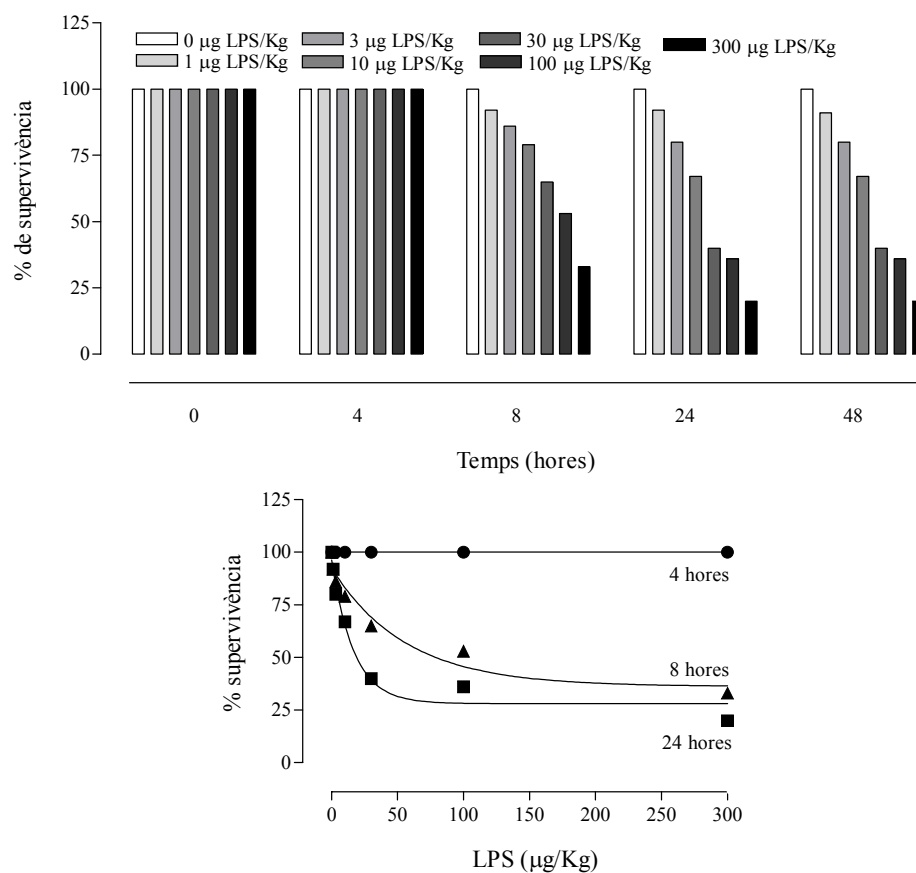


Figura 4.25.- Efecte de l'LPS sobre la supervivència dels ratolins. Els animals (3-5 per grup) varem rebre una única injecció d'LPS combinada amb D-GalN (750 mg/kg) i es va fer el seguiment de la supervivència durant les 48 hores posteriors a la injecció (pannell superior). El pannel inferior mostra la supervivència en funció de la dosi d'LPS rebuda.

4.3.2. EXPERIMENT VIII.- Estudi preliminar d'hepatotoxicitat: dosi-resposta.

Per completar la informació aportada per l'experiment anterior, en vàrem fer un altre de preliminar en el qual sacrificàvem els animals a les 8 hores de la injecció (els que no morien abans) per mesurar la disfunció hepàtica (incapacitat per mantenir la glicèmia) i la magnitud de les lesions cel·lulars (per l'alliberament d'enzims citosòlics al plasma).

Paràmetres metabòlics com la glucosa i el glicogen (figura 4.26, pannel A) es veien afectats per l'acció de la endotoxina bacteriana. La glicèmia disminuïa de forma molt important. Aquest decrement també l'observàvem a les concentracions de glicogen hepàtic, i era més acusat a mida que augmentava la dosi de lipopolisacàrid injectada.

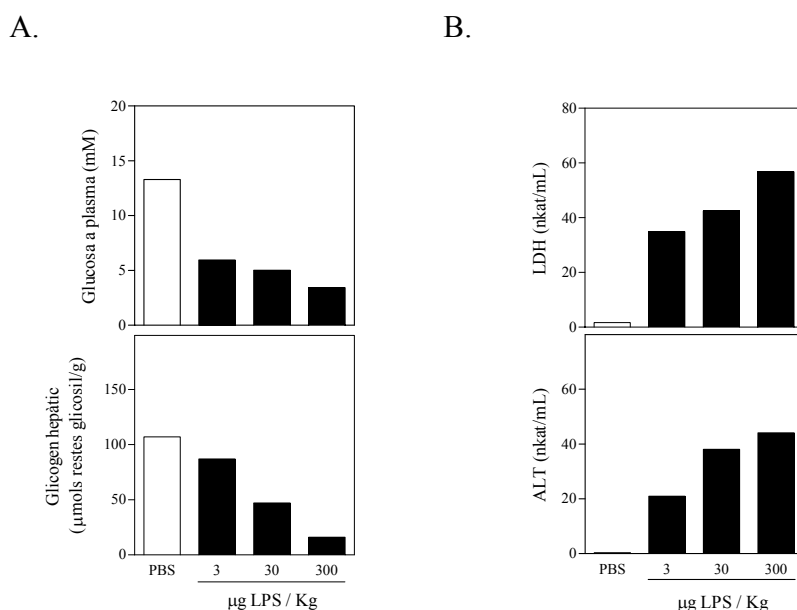


Figura 4.26.- Alteracions provocades per l'LPS: paràmetres metabòlics (A) i activitats enzimàtiques al plasma (B). Es va injectar intraperitonealment una dosi de LPS de 3, 30 i 300 μg/kg amb D-GalN (750 mg/kg) a 3 grups de ratolins. Els ratolins control van rebre un volum equivalent de PBS (PBS). Tots els animals es van sacrificar 8 hores després de la injecció. Els resultats corresponen a la mitjana de 2 animals per grup.

Els enzims intracitoplasmàtics seleccionats com a indicadors de dany tissular, LDH i ALT, havien augmentat de forma espectacular després de 8 hores (figura 4.26, pannel B). Tal i com es pot veure, aquest increment era proporcional a la quantitat de lipopolisacàrid injectat. L'augment de l'ALT era molt més important que el de l'LDH, mentre la primera augmentava, a la dosi més alta, unes 130 vegades, la segona augmentava unes 32 vegades.

4.3.3. EXPERIMENT IX.- Evolució temporal dels marcadors de lesió hepàtica.

El fet que passades les 8 primeres hores, pocs animals morien suggeria que els animals que sobreviuen es recuperaven a partir d'aquest temps. Vàrem voler comprovar-ho tot estudiant l'evolució dels paràmetres relacionats amb la funció i les lesions hepàtiques. Per aquest motiu vàrem administrar una dosi de 10 μg d'LPS/Kg, clarament subletal.

A les 8 hores d'haver rebut la injecció s'observa una important hipoglucèmia al grup tractat amb LPS (figura 4.27) però després de 24 hores els valors de glucosa estaven totalment recuperats. En quant a la concentració de glicogen hepàtic, es produïa una important disminució a les 8 hores d'haver iniciat l'experiment a tots dos grups experimentals. Paulativament els nivells es recuperaven, però aquesta recuperació era molt més lenta al grup tractat amb endotoxina bacteriana, ja que 24 hores després de la injecció encara eren significativament inferiors al grup control. A les 48 hores d'haver començat l'experiment s'assolien les concentracions inicials.

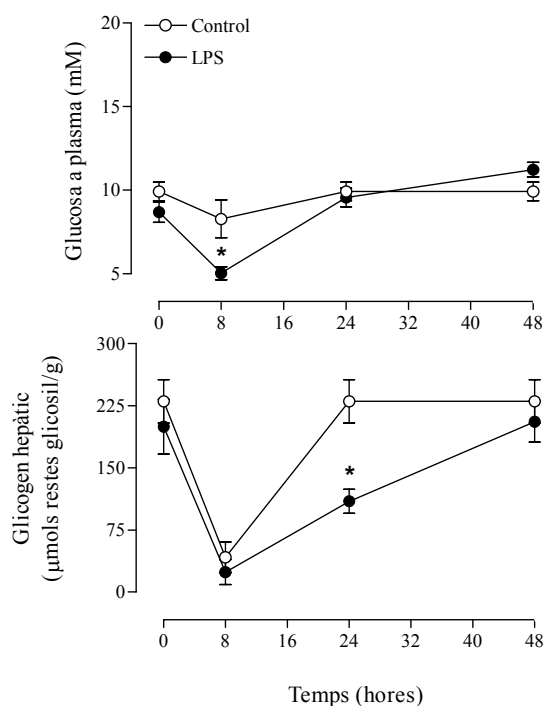


Figura 4.27.- Paràmetres metabòlics després de la injecció de LPS. Els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). El grup control va rebre un volum equivalent de PBS. Els animals es van sacrificar als temps indicats després. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard de 5 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinades mitjançant ANOVA dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: *, $p < 0.05$.

Les activitats LDH i ALT al plasma dels animals tractats amb endotoxina eren elevades a les 8 hores de la injecció (figura 4.28). A partir d'aquest moment les activitats anaven disminuint, i ja s'assolien els nivells basals 24 hores després de l'inici de l'experiment. L'activitat MPO al fetge arribava al seu nivell màxim al grup tractat amb LPS també a les 8 hores de l'administració de l'hepatotòxic i seguidament els valors es recuperaven.

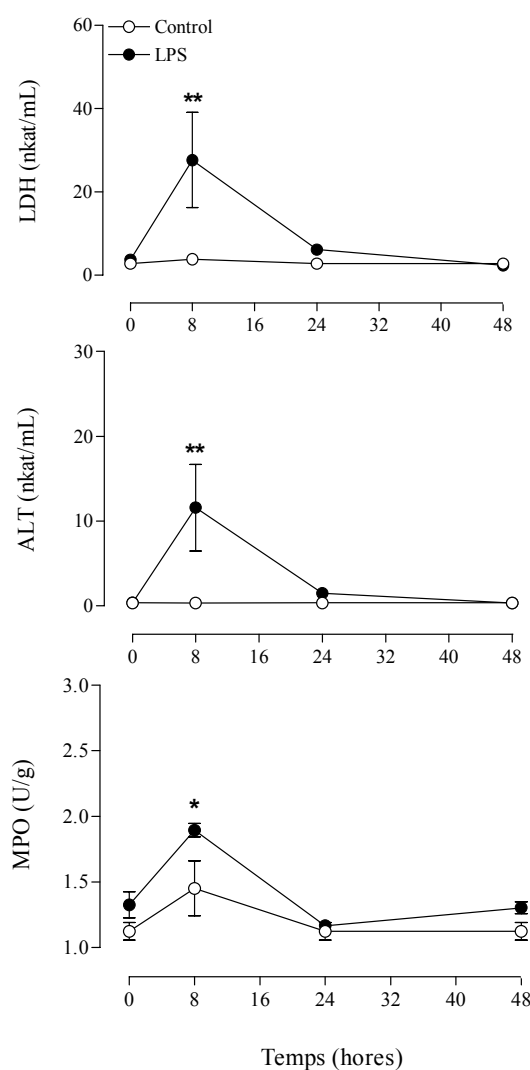


Figura 4.28.- Activitats enzimàtiques en plasma i activitat mieloperoxidasa (MPO) a fetge després de la injecció de LPS. Els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). El grup control va rebre un volum equivalent de PBS. Els animals es van sacrificar als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard de 5 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinades mitjançant ANOVA dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

En aquest experiment vàrem analitzar també l'efecte de l'endotoxina sobre la concentració d'EGF a les glàndules submaxil·lars (SMG) i al plasma. Els resultats es mostren a la figura 4.29. Tot i que l'anàlisi de la variància va mostrar la existència de diferències significatives ($p < 0.001$) en la concentració d'EGF a les SMG entre els dos grups experimentals, quan fèiem anàlisis post-test entre parelles de valors d'un mateix temps, no vam ser capaços de detectar cap diferència per cada temps estudiat. Les concentracions d'EGF al plasma oscil·laven als dos grups experimentals però les diferències no varen arribar a ser significatives.

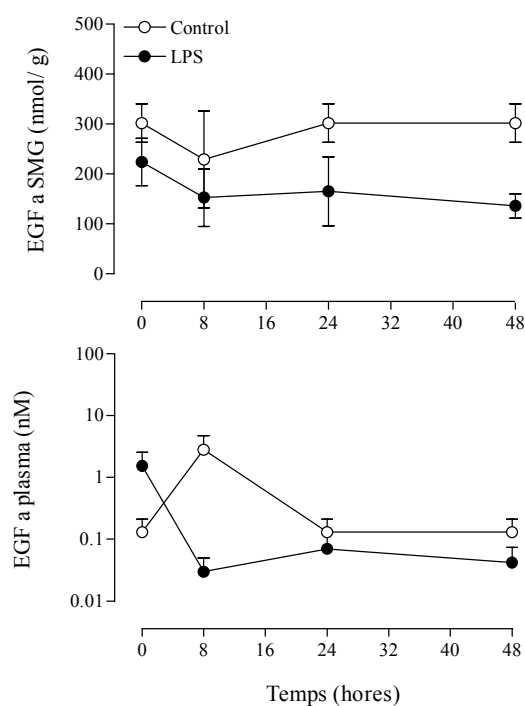


Figura 4.29.- Concentració d'EGF després de la injecció de LPS. Els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 μ g/kg) i D-GalN (750 mg/kg). El grup control va rebre un volum equivalent de PBS. Els animals es van sacrificar als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 5 animals per grup. Encara que l'ANOVA de dos factors va detectar diferències significatives per l'EGF en SMG, el post-test de Tukey realitzat no va detectar diferències significatives per cada temps.

4.3.4. EXPERIMENT X.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència dels animals tractats amb endotoxina bacteriana.

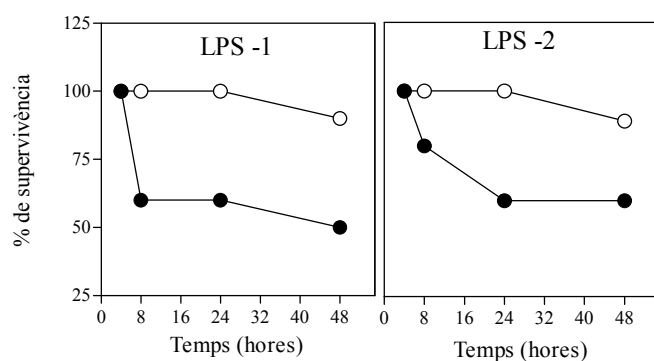
Estudis realitzats al nostre laboratori, inicialment per Enric Poch (*Poch, 1999*) i posteriorment per Irma Buira (*Buira, 2001*) i Meritxell Viladrich (*Viladrich, 2004*), han demostrat l'existència d'una diferència estructural al fetge entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els sotmesos a una operació simulada (OS). Per altra banda, Senaldi i col·laboradors (*Senaldi i col., 1998*) i després Cho i col·laboradors (*Cho i col., 2000*), han mostrat una acció hepatoprotectora de l'EGF davant les agressions provocades per l'LPS. Per això vam voler analitzar si la sialoadenectomia no només comportava un canvi en la estructura hepàtica sinó també un canvi en la seva funcionalitat.

Per realitzar aquest experiment els animals es van dividir en dos grups: un d'ells va ser sotmès a sialoadenectomia (SIALO) i l'altre a una operació simulada (OS).

Passades tres setmanes des de la intervenció quirúrgica tots els animals van rebre la injecció de 100 µg d'LPS/Kg per via intraperitoneal (LPS-1). Aquesta dosi era 10 vegades superior a la dels experiment IX. Vam anar controlant la supervivència d'aquests animals durant les 48 hores posteriors a l'administració de l'LPS. A la figura 4.30 (pannell A, LPS-1) veiem com a les 8 hores havien mort un 40% dels animals SIALO tractats amb endotoxina, mentre que no es produïa la mort de cap animal OS fins a les 48 hores. Els animals supervivents a aquesta primera injecció de lipopolisacàrid no van ser sacrificats sinó que es van deixar recuperar durant dues setmanes. Als 7 i 12 dies se'ls va extreure sang per mesurar l'activitat ALT (figura 4.30, pannel B). Després de 7 dies l'activitat ALT al grup SIALO era més elevada que al grup d'OS. Als 12, les activitats estaven totalment recuperades a tots dos grups d'animals.

Finalitzat aquest període de recuperació tots els animals, van rebre una segona injecció amb la mateixa dosi d'endotoxina bacteriana utilitzada amb anterioritat (LPS-2). Seguint el mateix protocol establert per la primera injecció vam controlar la supervivència durant les 48 hores posteriors a l'administració de l'hepatotòxic. A la figura 4.30 (pannell A, LPS-2) veiem que alguns SIALO havien mort a les 8 hores i que després de 24 hores la mortalitat arribava al 40%. En canvi, i tal i com havíem vist amb la primera injecció, cap animal OS havia mort abans de les 24 hores.

A.



B.

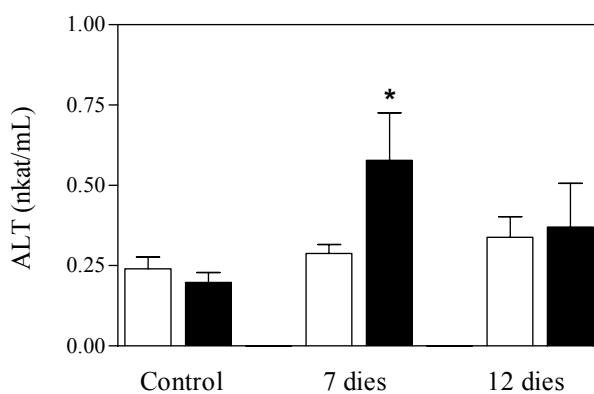


Figura 4.30.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la supervivència a l'endotoxina. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia – SIALO (punts i barres negres) o a una operació simulada – OS (punts i barres blanques). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i D-GalN (750 mg/kg). Els animals supervivents van rebre una segona injecció de la mateixa dosi de LPS dues setmanes després. A: mortalitat provocada per la primera (LPS-1) i la segona (LPS-2) administració de l'hepatotòxic. B: ALT a plasma durant els dies de l'experiment. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 10 animals per grup. Les diferències significatives entre els grups experimentals per cada temps, determinades mitjançant ANOVA de dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: *, $p < 0.05$.

4.3.5. EXPERIMENT XI.- Alteracions provocades per la sialoadenectomia en la resposta a la injecció d'endotoxina bacteriana.

Un cop havíem observat que els animals sialoadenectomitzats eren més sensibles a l'endotoxina, el següent objectiu va ser estudiar les causes d'aquesta major sensibilitat.

En primer lloc ens vàrem plantejar estudiar si la major sensibilitat era deguda a una alteració en la cinètica de l'LPS en la sang dels animals SIALO. Això ens portà a mesurar la concentració d'endotoxina en el plasma a diferents temps després de la injecció intraperitoneal. Als 90 minuts s'observava un augment molt important (entre 500-600 vegades) de la concentració d'endotoxina al plasma (Figura 4.31) a tots dos grups experimentals. Aquestes concentracions es mantenien gairebé inalterades 3 hores després de l'administració de l'hepatotòxic. A les 8 hores els nivells d'endotoxina havien disminuït, però encara es trobaven molt per sobre dels nivells basals. L'anàlisi de la variància realitzat va posar de manifest que existia una variació de les concentracions de LPS al llarg del temps ($p < 0.001$), però que aquesta variació era idèntica pels dos grups experimentals.

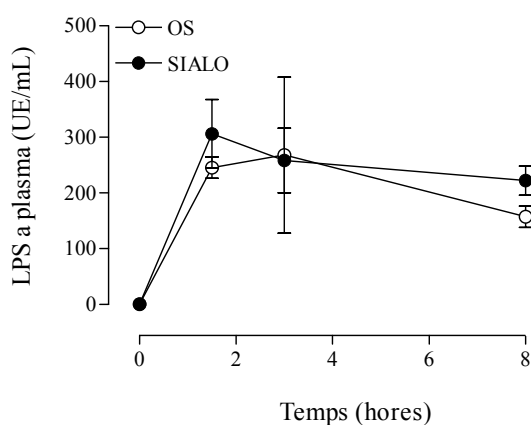


Figura 4.31.- Cinètica de desaparició de LPS en animals sialoadenectomitzats. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i D-GalN (750 mg/kg). Els animals es van sacrificar als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard de 3 animals per grup. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els grups experimentals.

En segon lloc vàrem estudiar com afectava la sialoadenectomia a la resposta dels animals a l'administració d'endotoxina en un estudi longitudinal que ens permetia analitzar les respostes primerenques i les més tardanes.

Pel que fa a la glicèmia i el glicogen hepàtic vàrem observar un efecte de l'endotoxina coincident als que ja havíem vist anteriorment (figura 4.32), però sense cap diferència entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els seus control (OS).

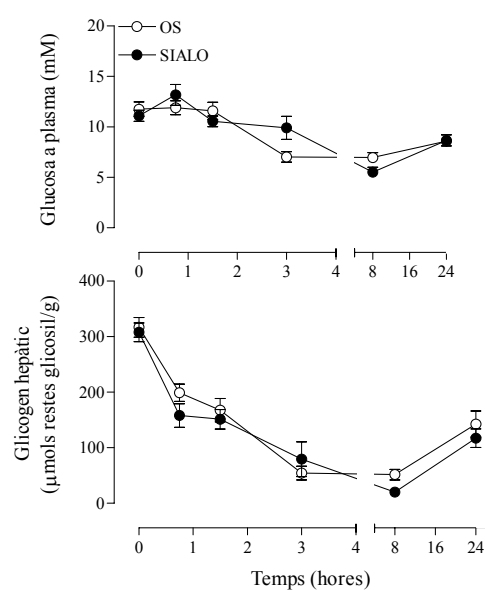


Figura 4.32.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: glicèmia i glicogen hepàtic. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 μg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Lots d'animals (5-13 ratolins per grup) foren sacrificats als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els grups experimentals.

Per tots 3 enzims valorats, LDH, AST i ALT (figura 4.33), s'observava un mateix patró de secreció: un pic màxim d'activitat 8 hores després de l'administració de l'hepatotòxic i a continuació una recuperació dels valors. L'ANOVA indicava que existien diferències significatives entre els dos grups experimentals per a les activitats AST i ALT a les 8 hores. En canvi, les diferències en l'activitat LDH no arribaven a ser significatives.

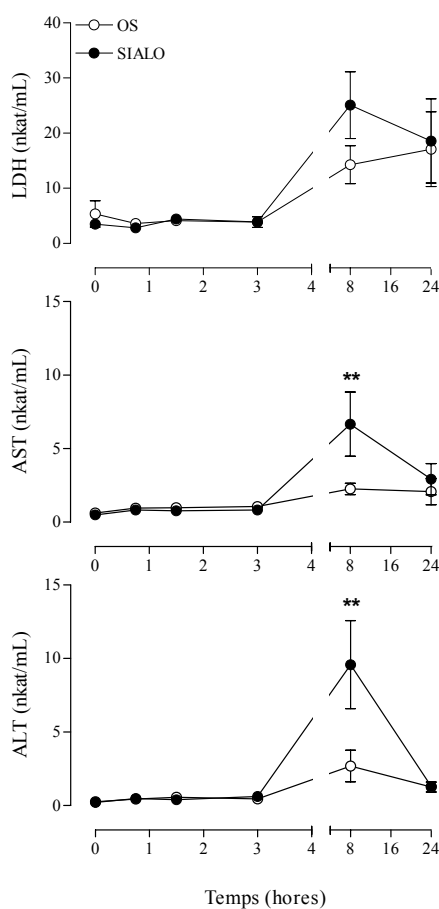


Figura 4.33.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors plasmàtics de lesions cel·lulars. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Lots d'animals (5-13 ratolins per grup) foren sacrificats als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard. La significativitat de les diferències entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA de dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: *, $p < 0.05$.

A la figura 4.34 veiem com l'activitat mieloperoxidasa anava augmentant de forma progressiva al llarg del temps en els animals OS. En els SIALO, l'increment d'activitat a les 8 hores era superior als dels seus controls. Així mateix, la mesura del grau d'afectació histopatològica indicava que el parènquima hepàtic als animals SIALO estava més danyat que als animals OS, tant al grup control com al tractat amb LPS (sacrificat a les 8 hores).

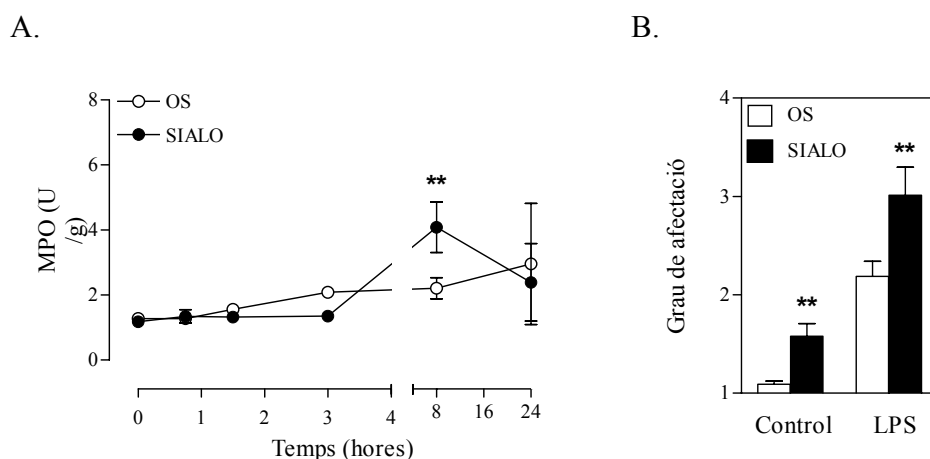


Figura 4.34.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors hepàtics de lesions cel·lulars. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Lots d'animals (5-13 ratolins per grup) foren sacrificats als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard. A: Activitat mieloperoxidasa (MPO) a fetge. B: Grau d'afectació hepàtica. La significativitat de les diferències entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: **, $p < 0.01$.

Per tal d'entendre millor l'efecte de la sialoadenectomia, en aquest experiment vàrem mesurar també les concentracions plasmàtiques de citocines (TNF- α , IL-6 i IL-10) i de corticosterona (figura 4.35). El TNF- α es trobava augmentat 45 minuts després de la injecció, però aquest increment era molt més important al grup OS que al SIALO. Als 90 minuts, les concentracions s'igualaven, assolint el pic de concentració màxima, i a partir d'aquest punt es recuperaven ràpidament els valors als dos grups d'animals. En els animals OS, la concentració d'IL-6 segueix amb un cert retard la de TNF- α . Així, als 45 minuts la concentració havia arribat al 15% del valor màxim, el dels 90 minuts. En aquest temps (45 minuts) el TNF- α era ja el 54% del valor màxim. El decrement posterior també era més lent en el cas de la IL-6: a les 3 hores la concentració només s'havia reduït al 50%. En el cas del TNF- α , a les 3 hores la concentració era gairebé

indetectable. En els animals SIALO, l'increment de la concentració de la concentració d'IL-6 fou més lent. No s'arribaven als valors màxims fins a les 3 hores de la injecció d'LPS. És destacable que als 90 minuts, la concentració d'IL-6 era aproximadament un 50% de la que tenien en aquest mateix temps, els animals OS. Un fet molt semblant al que teníem, als 45 minuts, en la concentració de TNF- α . La concentració de IL-10, evolucionava de forma molt semblant en els dos grups d'animals: assolien els nivells màxims als 90 minuts de l'administració de l'hepatotòxic i a continuació disminuïen molt ràpidament. Les concentracions sempre eren superiors al grup OS, encara que no de forma estadísticament significativa. Pel que fa a la corticosterona podem veure que augmentava a tots dos grups experimentals als 45 minuts i es mantenien elevats després de 90 minuts. De nou, els nivells assolits pel grup OS eren molt superiors al grup SIALO, i en aquest cas de forma estadísticament significativa. Als 180 minuts, encara que continuaven elevats, s'igualaven les concentracions als dos grups experimentals. D'aquest dos últims paràmetres, no disposem valors dels animals sacrificats a les 8 i 24 hores.

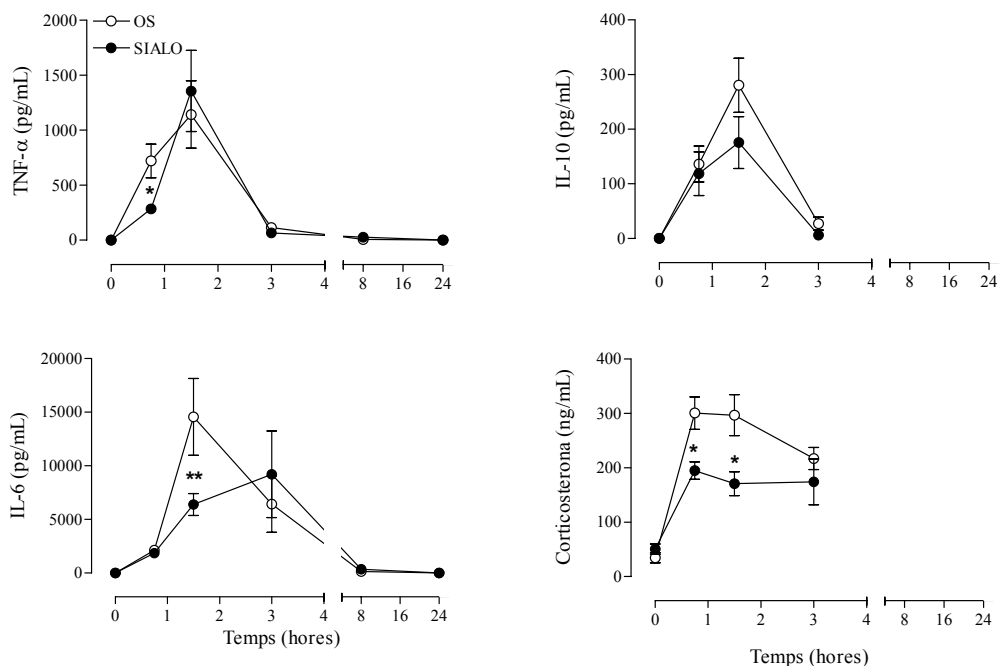


Figura 4.35.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: citocines i corticosterona plasmàtiques. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 μ g/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Lots d'animals (5-13 ratolins per grup) foren sacrificats als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. La significativitat de les diferències entre els grups experimentals per cada temps, determinada mitjançant ANOVA dos factors i post-test de Tukey, venen donades per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Les concentracions d'EGF a glàndules submaxil·lars (en animals OS) experimentaven una suau disminució durant les primeres hores després de la injecció d'endotoxina (figura 4.36), encara que aquesta disminució no arribava a ser estadísticament significativa. L'EGF plasmàtic no variava al llarg del temps en cap dels dos grups experimentals encara que al grup OS s'observava un suau increment de les concentracions circulants d'EGF però no prou important per arribar a ser estadísticament significatiu. Al fetge observàvem un petit augment de les concentracions d'EGF als 45 minuts a tots dos grups experimentals.

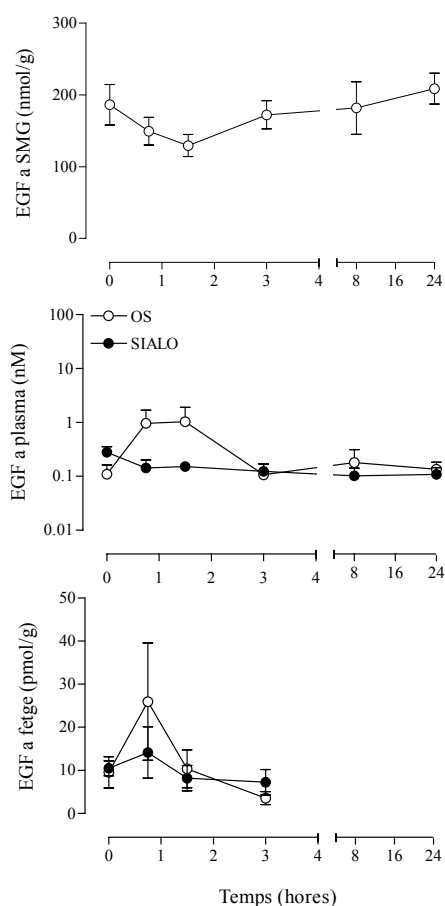


Figura 4.36.- Efecte de la sialoadenectomia sobre la resposta a l'endotoxina: EGF en plasma i teixits. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS). Tres setmanes després van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Lots d'animals (5-13 ratolins per grup) foren sacrificats als temps indicats. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'ANOVA de dos factors no va detectar diferències significatives entre els grups experimentals.

4.3.6. EXPERIMENT XII.- Modifica l'EGF l'efecte hepatotòxic de l'endotoxina bacteriana?

Observada l'existència d'una major sensibilitat a l'acció de la endotoxina bacteriana als animals sialoadenectomitzats, ja que es produïa una major mortalitat (a dosis elevades de LPS) i l'aparició de lesions hepàtiques més importants en resposta a l'LPS (a dosis baixes de LPS), juntament amb el fet que a la bibliografia hem pogut observar que l'EGF pot bloquejar les reaccions inflamatòries provocades per l'LPS en hepatocits en cultiu (*Terenzi i col., 1995*), i més recentment, que amb la injecció d'EGF s'aconseguien millorar les lesions hepàtiques a rates i ratolins tractats amb una combinació de LPS i D-Galactosamina (*Cho i col., 2000*). La qüestió que se'ns plantejava era: el petit increment d'EGF plasmàtic observat durant la resposta inflamatòria inicial només al grup OS pot explicar que les lesions aparegudes siguin menors? Si és així, l'administració d'una dosi farmacològica d'EGF hauria de tenir un efecte protector molt intens i a l'inrevés, el bloqueig del seu receptor haurà d'augmentar l'efecte hepatotòxic.

A la figura 4.37 es troben representats els paràmetres metabòlics analitzats. Veiem que la hipoglucèmia provocada per l'LPS no es veia afectada pel fet que els animals haguessin rebut EGF o l'AG-1478. En canvi, observant les concentracions de glicogen hepàtic veiem que l'EGF sí modificava la resposta a l'LPS ja que la disminució de concentració era més important en aquest grup, mentre que l'AG-1478, de nou, no afectava a la resposta normal a l'LPS.

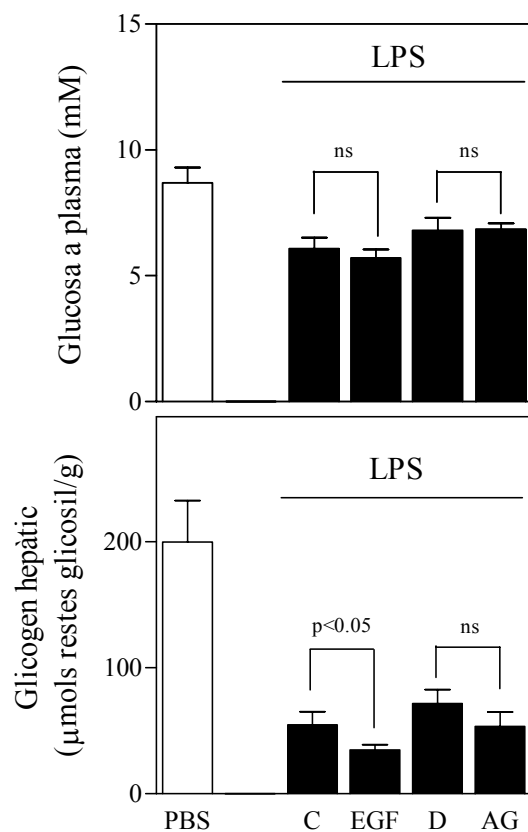


Figura 4.37.- Efecte de l'EGF i de l'AG-1478 sobre la resposta a l'endotoxina: paràmetres metabòlics. Els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de LPS (10 µg/kg) i D-GalN (750 mg/kg). Immediatament després eren dividits en 4 grups segons el tractament que rebien: una injecció intraperitoneal de 5 µg d'EGF recombinant de ratolí (EGF) o un volum equivalent de PBS (C) i una injecció intraperitoneal de l'AG-1478 (0.25 mg/kg) (AG) o un volum equivalent de dimetilsulfòxid al 10% (D). El grup control va rebre un volum equivalent PBS (PBS). Lots d'animals (10-21 ratolins per grup) foren sacrificats 8 hores després de la injecció per obtenir mostres. Els resultats corresponen a la mitjana ± error estàndard. La significativitat de les diferències detectades entre els grups experimentals van ser determinades mitjançant una T-Student.

Pels tres marcadors de dany hepàtic estudiats, i representats a la figura 4.38, s'observa en tots el mateix efecte: si bé el grup tractat amb EGF no es produïa una modificació de la resposta a l'LPS, si que detectàvem, i de forma estadísticament significativa, que el grup tractat amb l'AG-1478 es produïa una clara millora de les lesions hepàtiques produïdes, ja que les activitats AST i ALT plasmàtiques i MPO hepàtica eren molt inferiors als tractats únicament amb LPS.

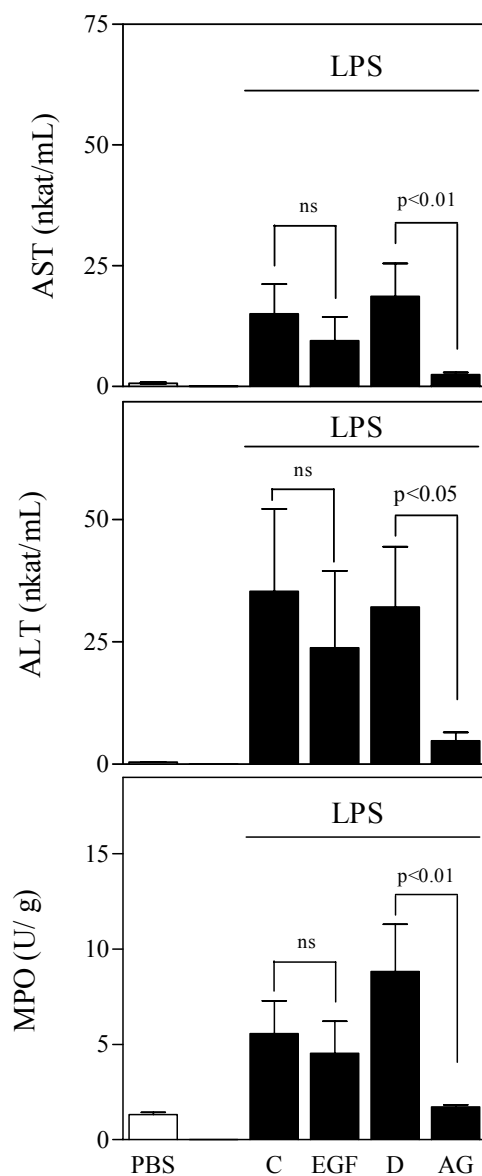


Figura 4.38- Efecte de l'EGF i de l'AG-1478 sobre la resposta a l'endotoxina: marcadors de dany hepàtic. Els ratolins van rebre una injecció intraperitoneal de 10 μ gLPS/kg amb D-GalN (750 mg/kg). Immediatament després eren dividits en 4 grups segons el tractament que rebien: una injecció intraperitoneal de 5 μ g d'EGF recombinant de ratolí (EGF) o un volum equivalent de PBS (C) i una injecció intraperitoneal de la AG-1478 (0.25 mg/kg) (AG) o un volum equivalent de dimetilsulfòxid al 10% (D). El grup control va rebre un volum equivalent PBS (PBS). Lots d'animals (10-21 ratolins per grup) foren sacrificats 8 hores després de la injecció per obtenir mostres. Els resultats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. La significativitat de les diferències detectades entre els grups experimentals van ser determinades mitjançant una T-Student

4.4. QUARTA PART.

**Estudi de l'efecte de la
sialoadenectomia sobre la producció de
citocines pel fetge perfós.**

Els últims resultats obtinguts en els experiments d'administració d'LPS suggerien que el fetge dels animals sialoadenectomitzats (SIALO) era més sensible a l'acció d'aquest hepatotòxic que els animals sotmesos a una operació simulada (OS). També vàrem observar diferències en la cinètica plasmàtica de citocines proinflamatòries (TNF- α i IL-6) i en la corticosterona. Totes aquestes diferències no eren degudes a una secreció puntual d'EGF, ja que amb l'administració exògena d'EGF no milloraven les lesions hepàtiques que l'LPS provocava.

En tant que havia estat descrit per membres del nostre grup d'investigació (*Poch, 1999; Viladrich, 2004*) que existeix una diferència en l'estructura hepàtica entre els animals OS i SIALO, vam voler estudiar si la diferent sensibilitat a l'endotoxina bacteriana detectada podria haver estat provocada per aquesta diferència estructural inicial.

A la bibliografia podem trobar com estudis realitzats amb fetge perfós, tant de rata (*Liao i col., 1995; Tran-Thi i col., 1993*) com de ratolí (*Leist i col., 1996*), han servit per demostrar que aquest òrgan és el major productor de citocines de tot l'organisme i quina és la cinètica de secreció de cadascuna d'elles. A més a més, estudis realitzats amb fetge perfós de porc (*Frank i col., 1996*) han mostrat la rellevància clínica d'aquesta tècnica, ja que és un molt bon model per tal d'estudiar i avaluar la resposta d'aquest òrgan davant l'acció d'agents infecciosos.

Per aquest motiu vam voler realitzar perfusió de fetges provinents d'animals OS i SIALO per tal d'observar el funcionament normal d'aquest òrgan (grup CONTROL) i també com responien a l'agressió provocada per l'endotoxina bacteriana (grup LPS).

4.4.1. Posta a punt del mètode de perfusió de fetge de ratolí: assajos preliminars.

Inicialment vam posar a punt un mètode de perfusió de fetge adaptat a ratolí a partir del mètode desenvolupat per Galan (*Galan, 1996*) per a fetge de rata. Tots aquest primers assajos es van realitzar amb fetges provinents d'animals no operats per tal de validar el mètode de perfusió (control) i per observar la resposta del fetge a l'endotoxina bacteriana (LPS). Després de varies proves en les que comparàvem els resultats obtinguts en perfusions en sistema obert i recirculant, vàrem optar per fer els experiments en sistema obert.

Un cop el fetge estava completament net i aïllat es procedia a la perfusió no-recirculant durant 150 minuts, recollint mostra cada 30 minuts des del minut 0. Per al grup LPS, fèiem una infusió del minut 0 al 10 amb LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) i D-GalN (7.5 mg/mL).

Després de 60 minuts veiem un fort augment de l'alliberació de la Lactat Deshidrogenasa o LDH al grup LPS que no es produeix al grup control (figura 4.39). També veiem que augmentaven les citocines alliberades pels fetges del grup LPS. El TNF- α augmentava espectacularment a partir del minut 30 i una mica més tard augmentava la IL-6. En quant a la IL-10 podem veure que no es detectava una variació important fins al minut 90. Les variacions de les concentracions d'aquestes citocines al grup control eren gairebé inapreciables.

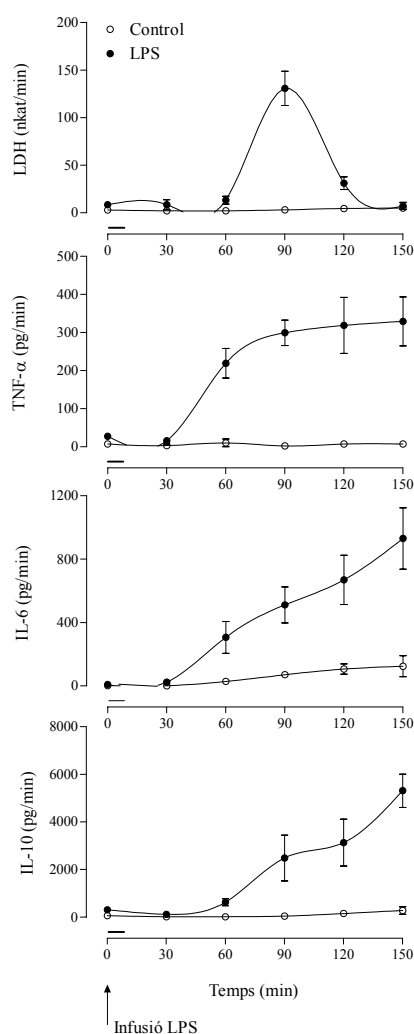


Figura 4.39.- Efecte de l'LPS sobre l'alliberament de LDH i citocines al fetge perfós. La infusió dels fetges amb LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) i D-GalN (7.5 mg/mL) es va fer durant els 10 primers minuts de perfusió i els 140 minuts restants eren perfosos amb medi de perfusió. El grup control era perfós durant els 150 minuts amb el medi adient. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 2-3 animals per grup.

4.4.2. Perfusió de fetges d'animals sialoadenectomitzats.

4.4.2.1. Secreció basal.

Presentarem en primer lloc els resultats dels fetges perfosos sense LPS. És a dir en condicions control.

Per la comparació estadística, les dades van ser ajustades a l'equació de la corba següent:

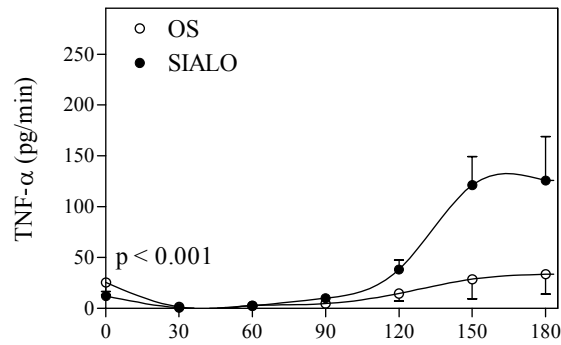
$$Y = \text{min} + \frac{(\text{Max} - \text{min})}{(1 + e^{-k(t-t_{50})})}$$

on:

Max i min corresponen al valor màxim i mínim, respectivament, de cada paràmetre mesurat, T_{50} correspon al temps necessari per tal d'arribar a la meitat del valor màxim (Max) i k és una constant.

A la figura 4.40 es troba representada l'alliberament del TNF- α i la IL-6. Al grup OS es produïa un lleuger increment de la secreció del TNF- α , però en canvi vèiem com al grup SIALO es produïa un important augment d'aquesta citocina a partir del minut 90 (pannell A). Aquest mateix efecte s'observa en l'alliberació de IL-6 (pannell B), encara que l'increment al grup SIALO no es tant important com el detectat pel TNF- α .

A.



B.

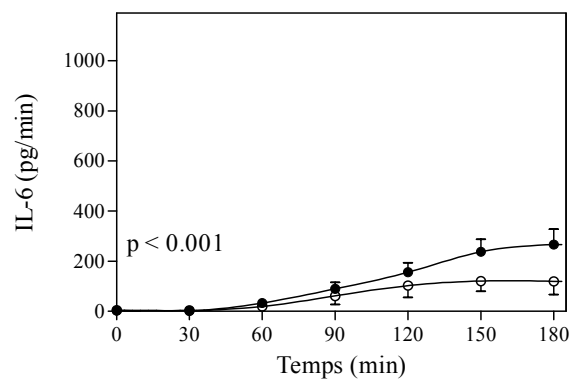
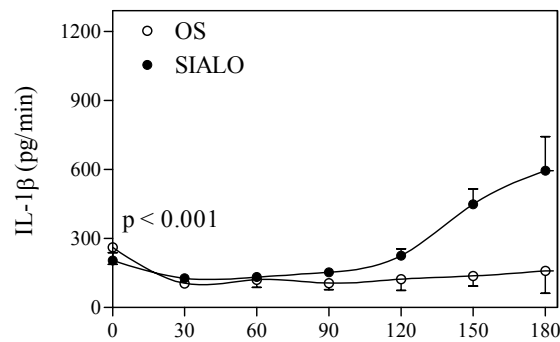


Figura 4.40.- Secreció de TNF- α i IL-6 pel fetge perfós en condicions basals. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la perfusió del seu fetge. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-6 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes.

El mateix patró de secreció es repeteix amb la IL-1 β i la IL-10 (figura 4.41). Al grup SIALO es produïa un important augment de la IL-1 β (pannell A) a partir del minut 90 mentre que al grup OS les variacions resultaven molt menors. En quan a la IL-10 (pannell B) vèiem també que al grup SIALO es produïa un increment molt important a partir dels 90 minuts, que arribava al seu nivell més alt als 150 minuts de perfusió.

A.



B.

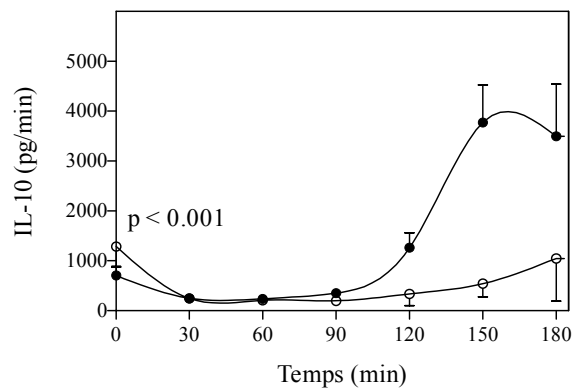


Figura 4.41.- Secreció de IL-1 β i IL-10 pel fetge perfós en condicions basals. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la perfusió del seu fetge. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-6 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes.

També vam estudiar l'alliberament de LDH al llarg de tot el període de perfusió estudiat (figura 4.42). Observem també que al grup SIALO es produïa un fort augment de l'activitat d'aquest enzim al medi de perfusió a partir del minut 90, mentre que al grup OS començava a augmentar l'activitat a partir del minut 150 però de forma menys important.

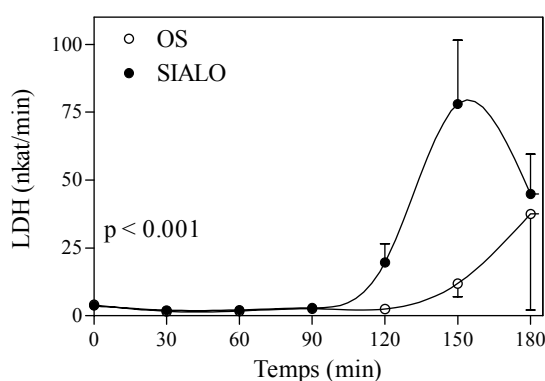


Figura 4.42.- Secreció de LDH pel fetge perfós en condicions basals. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la perfusió del seu fetge. Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 3-6 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes

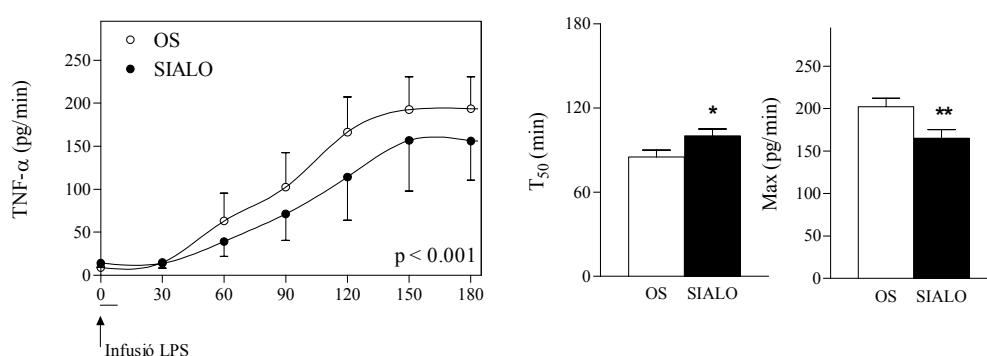
4.4.2.2. Resposta a l'endotoxina.

En segon lloc mostrem la resposta a l'endotoxina bacteriana dels fetges d'animals OS i sialoadenectomitzats (SIALO). Com en els experiments preliminars, infoníem durant els 10 primers minuts amb LPS (0.1 μ g/mL) i D-GalN (7.5mg/mL).

En aquest cas, a més de mostrar les corbes, afegim els dos paràmetres estimats de cada corba amb més significativitat biològica: el valor T_{50} i Max. Més endavant (Taula 4.6) es recullen tots els valors de tots els paràmetres estimats en tots els temps estudiats.

L'alliberament de TNF- α començava a augmentar a partir del minut 30 de perfusió tant en OS com en SIALO (figura 4.43, pannel A). Els valors assolits eren sempre superiors pels fetges OS. Aquest mateix efecte l'observem amb la IL-6 (figura 4.43, pannel B). Per altra banda, el valor de secreció màxima (Max) en les dues citocines va ser estadísticament inferior al grup SIALO. Es de destacar que el valor de T_{50} per la secreció de TNF- α era significativament més alt en SIALO que en OS.

A.



B.

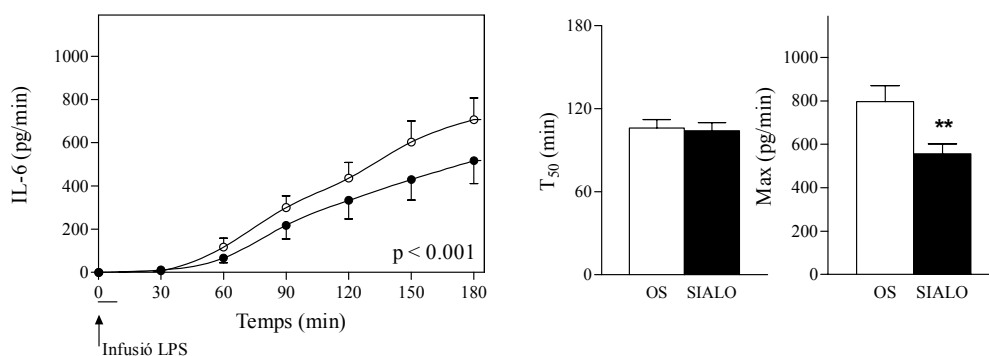
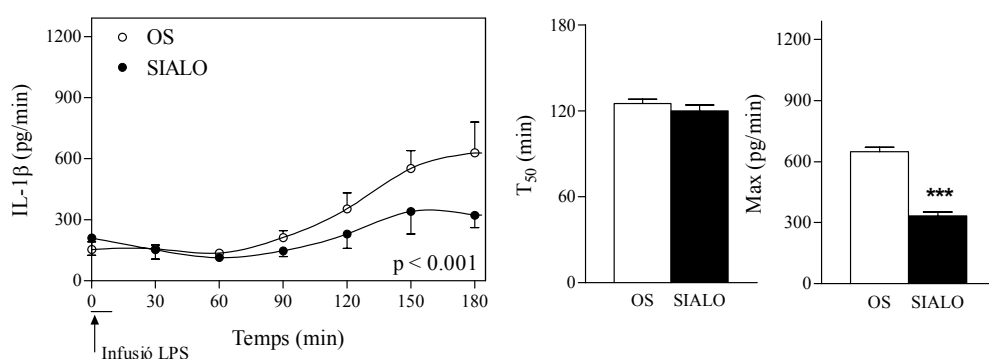


Figura 4.43.- Efecte de l'LPS sobre la secreció de TNF- α i IL-6. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la infusió del seu fetge amb LPS (0.1 μ g/mL) i D-GalN (7.5 mg/mL) durant 10 minuts i els 170 minuts restants eren perfosos amb el medi de perfusió. De cada paràmetre es representa la corba d'alliberació, el valor de concentració màxima assolit (Max) i el temps necessari per arribar a la meitat de la concentració màxima (T_{50}). Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 8-9 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes, i les diferències significatives entre els paràmetres determinades mitjançant T-Student venen representades per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

La figura 4.44 mostra els resultats de IL-1 β (pannell A) i IL-10 (pannell B). De nou es repeteix el patró de secreció observat anteriorment, ja que es produeix un augment de les dues citocines, però els valors assolits eren sempre superiors pel grup OS. És remarcable que la resposta en la secreció tant d'IL-1 β com d'IL-10 era més lenta que en el cas del TNF- α o d'IL-6. Per això, al final de la perfusió (180 minuts), encara no s'havia arribat al màxim. Tot i això, les estimacions del valor màxim van ser menors en els fetsges d'animals SIALO que en els dels OS, tal i com ja passava amb el TNF- α i l'IL-6. El valor de T_{50} estimat per la secreció d'IL-1 β i d'IL-10 fou semblant en animals OS i SIALO.

A.



B.

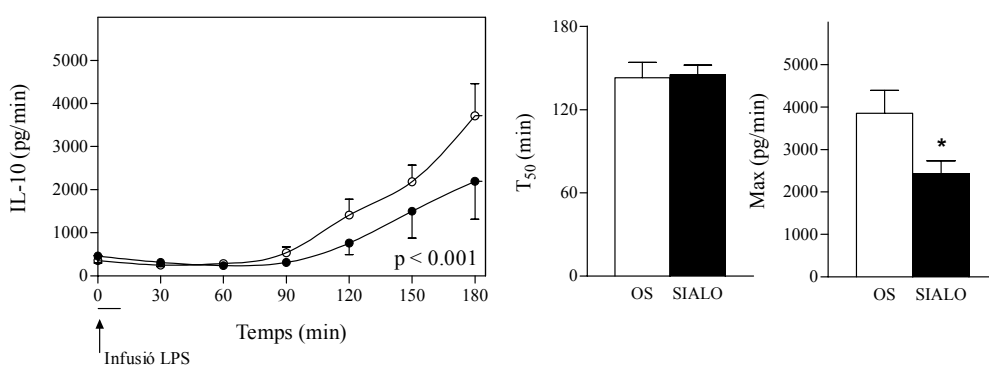


Figura 4.44.- Efecte de l'LPS sobre la secreció de IL-1 β i IL-10. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la infusió del seu fetge amb LPS (0.1 μ g/mL) i D-GalN (7.5 mg/mL) durant 10 minuts i els 170 minuts restants eren perfosos amb el medi de perfusió. De cada paràmetre es representa la corba d'alliberació, el valor de concentració màxima assolit (Max) i el temps necessari per arribar a la meitat de la concentració màxima (T_{50}). Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 8-9 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes, i les diferències significatives entre els paràmetres determinades mitjançant T-Student venen representades per: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

A la figura 4.45 representem les variacions d'activitat LDH. Els valors començaven a augmentar al grup OS a partir del minut 60, mentre que al grup SIALO no observàvem l'increment d'activitat d'aquest enzim fins després del minut 90 de perfusió. Aquest desplaçament queda reflexat a la T_{50} , estadísticament superior al grup SIALO. A més el valor màxim d'activitat (Max) assolit per aquest grup era significativament inferior a l'assolit pels OS.

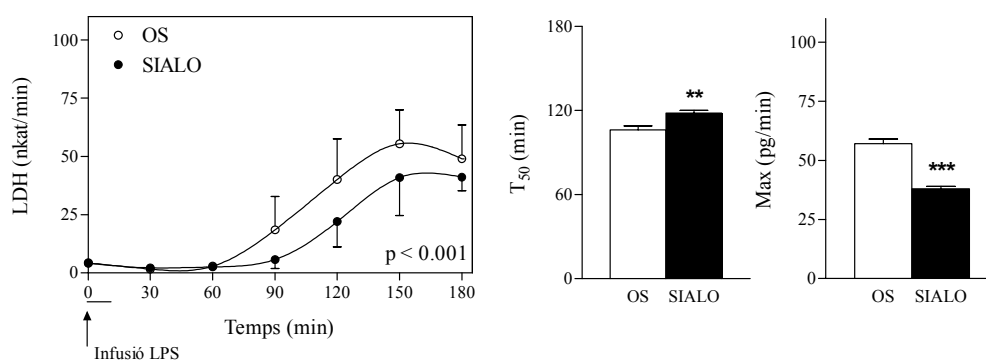


Figura 4.45.- Efecte de l'LPS sobre la secreció de LDH. Els ratolins van ser sotmesos a sialoadenectomia (SIALO) o a una operació simulada (OS) i tres setmanes després es va procedir a la infusió del seu fetge amb LPS (0.1 µg/mL) i D-GalN (7.5 mg/mL) durant 10 minuts i els 170 minuts restants eren perfosos amb el medi de perfusió. De cada paràmetre es representa la corba d'alliberació, el valor de activitat màxima assolida (Max) i el temps necessari per arribar a la meitat de la concentració màxima (T_{50}). Els resultats corresponen a la mitjana \pm l'error estàndard de 8-9 animals per grup. La significativitat de les diferències entre les corbes es va determinar mitjançant un test de comparació de corbes, i les diferències significatives entre els paràmetres determinades mitjançant T-Student venen representades per: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Per analitzar la relació en la secreció de les diferents citocines i d'aquestes amb l'alliberament d'LDH, hem integrat l'àrea de cada corba per obtenir el valor de citocina (o LDH) alliberada en cada cas. Les taules 4.2 i 4.3 recullen els resultats obtinguts en els fetges perfosos en condicions basals o estimulats amb LPS, respectivament.

Taula 4.2.- Citocines i LDH alliberades pels fetges perfosos en condicions basals.

| | OS | SIALO |
|--------------------|----------------|-----------------|
| TNF- α (ng) | 3 \pm 1 | 9 \pm 2 |
| IL-6 (ng) | 13 \pm 6 | 23 \pm 5 |
| IL-1 β (ng) | 30 \pm 10 | 57 \pm 6 |
| IL-10 (ng) | 116 \pm 55 | 302 \pm 61 |
| LDH (nkat) | 1442 \pm 549 | 4226 \pm 1113 |

Es va procedir a la integració de l'àrea sota la corba de l'activitat LDH i de les citocines inflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-1 β i IL-10) alliberades pel fetge d'animals sialoadenectomitzats durant els 180 minuts perfusió.

Taula 4.3.-Citocines i LDH alliberades pels fetges estimulats amb LPS.

| | OS | SIALO |
|--------------------|----------------|----------------|
| TNF- α (ng) | 22 \pm 5 | 17 \pm 6 |
| IL-6 (ng) | 65 \pm 11 | 47 \pm 11 |
| IL-1 β (ng) | 74 \pm 13 | 56 \pm 18 |
| IL-10 (ng) | 262 \pm 34 | 173 \pm 56 |
| LDH (nkat) | 4694 \pm 884 | 2923 \pm 761 |

Es va procedir a la integració de l'àrea sota la corba de l'activitat LDH i de les citocines inflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-1 β i IL-10) alliberades pel fetge d'animals sialoadenectomitzats sotmesos a la infusió amb LPS (0.1 μ g/mL) i D-GalN (7.5 mg/mL) durant 10 minuts i posterior perfusió amb el medi adient durant 170 minuts.

Hem analitzat les correlacions entre les diferents citocines. En primer lloc hem de dir que quan hem calculat les rectes de regressió dels animals OS i SIALO separatament, no hem trobat diferències significatives entre les rectes (veure taula 4.4). Per això, a la figura 4.46, representem conjuntament tots els resultats. Tot i ser significativa, la correlació entre TNF- α i IL-1 β és relativament baixa. Molt més altes són les correlacions TNF- α - IL-6 i IL-1 β - IL-10.

Taula 4.4.- Rectes de regressió obtingudes de l'anàlisi de les correlacions entre les diferents citocines.

| Correlació | OS | SIALO | SIALO vs OS |
|-------------------------------|------------------|------------------|-------------|
| IL-1 β vs TNF- α | Y = 1.630x + 34 | Y = 1.251x + 39 | ns |
| IL-6 vs TNF- α | Y = 1.912x + 19 | Y = 1.702x + 14 | ns |
| IL-10 vs TNF- α | Y = 3.715x + 161 | Y = 4.026x + 174 | ns |
| IL-6 vs IL-1 β | Y = 0.352x + 30 | Y = 0.308x + 20 | ns |
| IL-10 vs IL-1 β | Y = 2.497x + 67 | Y = 3.335x + 42 | ns |

Es va calcular la correlació existent entre les diferents citocines secretades pel fetges perfós d'animals OS i SIALO separatament. Analitzades les rectes mitjançant un test de comparació de rectes, no es van detectar diferències significatives entre els grups experimentals.

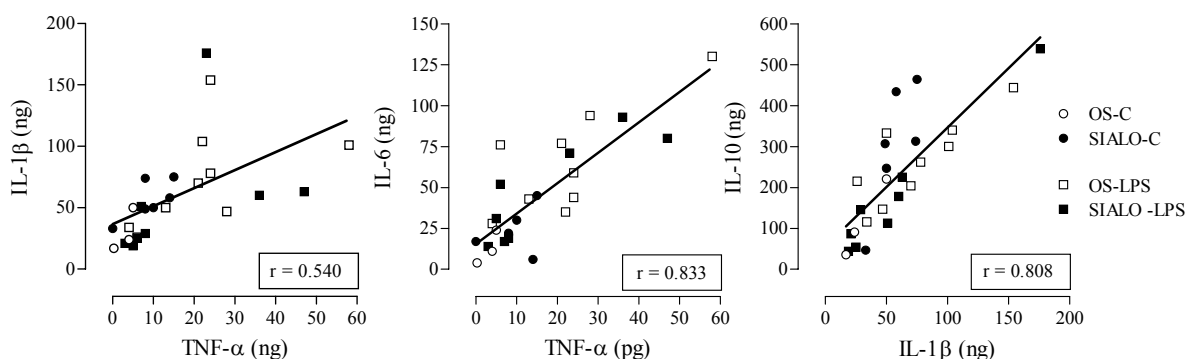


Figura 4.46.- Representació gràfica de les correlacions existents entre les citocines secretades pel fetge perfós: TNF- α – IL-1 β , TNF- α – IL-6 i IL-1 β – IL-10. Es va procedir a l'anàlisi de la correlació existent entre les diferents citocines secretades pel fetge perfós d'animals OS i SIALO conjuntament. Queden representades les correlacions que van obtenir el millor coeficient correlació (r).

Per entendre la relació entre l'alliberament d'LDH i la producció de citocines, hem estudiat la correlació amb la producció de cada citocina, individualment o per grups.

La taula 4.5 recull les rectes de regressió obtingudes d'aquesta anàlisi i la suma de quadrats residual (SQR) per cadascuna. Quan millor és l'ajust entre el valor mesurat d'LDH i l'estimat (eLDH), menor és l'SQR.

Taula 4.5.- Rectes de regressió i suma de quadrats residual (SQR) obtingudes d'estimar el valor de LDH (eLDH) en funció de les diferents citocines secretades pel fetge perfós.

| | |
|--|------------|
| $eLDH = 0.117[TNF-\alpha] + 1.8$ | SQR= 88.7 |
| $eLDH = 0.042[IL-1\beta] + 1.3$ | SQR= 86.4 |
| $eLDH = 0.036[IL-6] + 2.1$ | SQR= 125.6 |
| $eLDH = 0.014[IL-10] + 0.6$ | SQR= 63.0 |
| $eLDH = 0.073[TNF-\alpha] + 0.028[IL-1\beta] + 1.0$ | SQR= 67.3 |
| $eLDH = 0.164[TNF-\alpha] - 0.025[IL-6] + 2.2$ | SQR= 83.7 |
| $eLDH = 0.074[TNF-\alpha] + 0.011[IL-10] + 0.2$ | SQR= 39.6 |
| $eLDH = 0.037[IL-1\beta] + 0.015[IL-6] + 0.9$ | SQR= 81.7 |
| $eLDH = 0.013[IL-1\beta] + 0.011[IL-10] + 0.5$ | SQR= 60.1 |
| $eLDH = 0.025[IL-6] + 0.012[IL-10] - 0.2$ | SQR= 47.1 |
| $eLDH = 0.001[TNF-\alpha] - 6.077[IL-1\beta] - 0.001[IL-6] + 0.0$ | SQR= 63.1 |
| $eLDH = 0.078[TNF-\alpha] - 0.002[IL-6] + 0.011[IL-10] + 0.2$ | SQR= 39.5 |
| $eLDH = 0.077[TNF-\alpha] - 0.003[IL-1\beta] + 0.011[IL-10] + 0.2$ | SQR= 39.4 |
| $eLDH = -0.002[IL-1\beta] + 0.026[IL-6] + 0.013[IL-10] - 0.2$ | SQR= 47.0 |
| $eLDH = 0.079[TNF-\alpha] - 0.003[IL-1\beta] - 0.001[IL-6] + 0.011[IL-10] + 0.2$ | SQR= 39.4 |

Per tots els fetges perfosos (OS i SIALO) vàrem estimar el valor d'LDH (eLDH) a partir de les diferents citocines secretades, individualment o per grups. Els valors de SQR més baixos indiquen un millor ajust i, per tant, una millor correlació.

Preses de forma individual, és la secreció d'IL-10 la que millor estima la LDH alliberada. La figura 4.47 mostra la correlació entre el valor d'eLDH i el mesurat. L'estimació de la secreció d'LDH a partir de la secreció de TNF- α i IL-10 millora clarament l'ajust (redueix en gairebé un 40% l'SQR). La introducció de la IL-1 β i de la IL-6 o d'ambdues ja no millora l'estimació (taula 4.5). El pannel dret de la figura 4.47 mostra per això la correlació entre el valor d'eLDH (estimat a partir del TNF- α i la IL-10) i el mesurat. Aquesta representació posa clarament de manifest que els valors obtinguts amb els animals OS i SIALO es distribueixen sobre una mateixa recta.

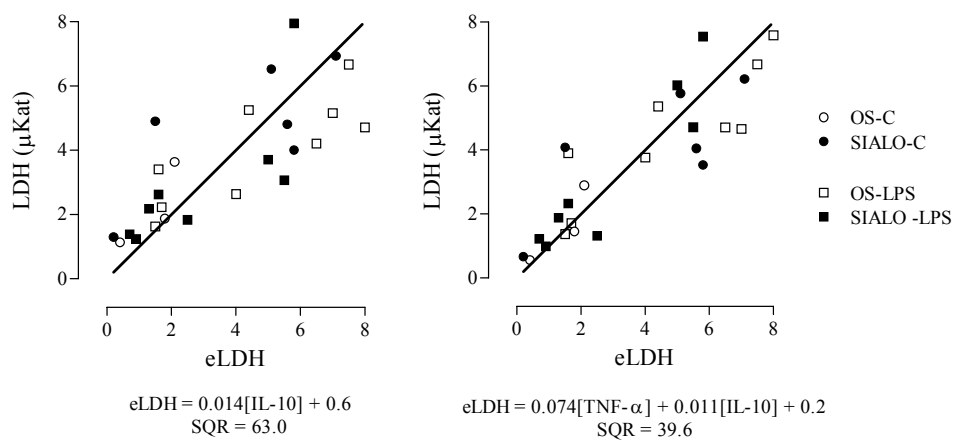


Figura 4.47.- Representació gràfica de l'ajust del valor de LDH obtingut i el valor estimat de LDH (eLDH) en funció de les diferents citocines secretades pel fetge perfós. Es va procedir al càlcul del valor estimat d'LDH (eLDH) a partir dels valors de les diferents citocines secretades pel fetge perfós d'animals OS i SIALO conjuntament. Es troben representades les rectes que millor estimen el valor d'LDH (eLDH): la IL-10 de forma individual, i el TNF- α i la IL-10, conjuntament.

Taula 4.6.- Valors de T_{50} , K, Max i min de les corbes d'alliberació de cadascun dels paràmetres mesurats en fetge perfós.

| | | Control | | LPS | |
|----------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | OS | SIALO | OS | SIALO |
| T_{50} | TNF- α | 127 \pm 1 | 127 \pm 3 | 85 \pm 5 | 100 \pm 5 |
| | IL-6 | 99 \pm 5 | 112 \pm 4 | 106 \pm 6 | 104 \pm 6 |
| | IL-1 β | 172 \pm 120 | 141 \pm 1 | 125 \pm 3 | 120 \pm 4 |
| | IL-10 | 183 \pm 40 | 125 \pm 8 | 143 \pm 11 | 145 \pm 7 |
| | LDH | 157 \pm 1 | 127 \pm 1 | 106 \pm 3 | 118 \pm 2 |
| K | TNF- α | 0,06 \pm 0,01 | 0,13 \pm 0,05 | 0,04 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 |
| | IL-6 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 |
| | IL-1 β | 0,03 \pm 0,04 | 0,06 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,04 | 0,12 \pm 0,12 |
| | IL-10 | 0,04 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,03 | 0,04 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,02 |
| | LDH | 0,11 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 | 0,12 \pm 0,02 |
| Max | TNF- α | 35 \pm 1 | 127 \pm 5 | 202 \pm 10 | 165 \pm 10 |
| | IL-6 | 145 \pm 10 | 292 \pm 16 | 796 \pm 74 | 556 \pm 47 |
| | IL-1 β | 201 \pm 185 | 632 \pm 10 | 648 \pm 23 | 333 \pm 19 |
| | IL-10 | 2039 \pm 1736 | 3546 \pm 160 | 3853 \pm 109 | 2430 \pm 305 |
| | LDH | 38 \pm 1 | 77 \pm 1 | 57 \pm 2 | 38 \pm 1 |
| min | TNF- α | 2 \pm 1 | 4 \pm 3 | 2 \pm 12 | 10 \pm 7 |
| | IL-6 | 0 \pm 7 | 0 \pm 8 | 0 \pm 44 | 0 \pm 30 |
| | IL-1 β | 108 \pm 7 | 130 \pm 3 | 146 \pm 10 | 130 \pm 12 |
| | IL-10 | 208 \pm 22 | 299 \pm 81 | 232 \pm 109 | 318 \pm 67 |
| | LDH | 2 \pm 1 | 2 \pm 1 | 1 \pm 2 | 3 \pm 1 |

Vam ajustar les dades dels diferents paràmetres mesurats en fetge perfós a l'equació de la corba següent:

$$Y = \min + \frac{(\text{Max} - \min)}{(1 + e^{-k(t - T_{50})})}$$

on Max i min corresponen al valor màxim i mínim, respectivament de cadascun dels paràmetres mesurats, T_{50} correspon al temps necessari per tal d'arribar a la meitat del valor màxim (Max) del paràmetre mesurat i K és una constant de proporcionalitat.

Discussió

5.1. LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES: UN MODEL D'ESTRÈS.

La confrontació entre mascles queda englobat dins del que es coneix com “estrès social”, el qual implica una font d’estrès que de forma natural, es pot trobar a l’habitat dels animals (Sgoifo i col., 1998; Koolhaas i col., 1997; Tamashiro i col., 2005). Molts són els estudis realitzats basant-se en aquest model ja que mimetitzava malalties humanes relacionades amb l’estrès, com l’ansietat i la depressió (Martínez i col., 1998b). El paradigma intrús-resident i el model colonial són els dos grans models animals d’estrès social (Martínez i col., 1998b; Tamashiro i col., 2005).

En el nostre estudi vàrem induir l’estrès per confrontació en ratolins mitjançant la utilització del paradigma intrús-resident, el qual es basa en l’establiment del territori per part d’un mascle, el resident, que el defensa de mascles intrusos. Per tal d’induir l’agressivitat, aquests animals eren aïllats en gàbies individuals durant un període que oscil·lava entre 15 i 21 dies (Lakshmanan, 1986; Sigg i col., 1966; Welch i Welch, 1969), ja que l’aïllament és un dels mitjans establerts per tal d’incrementar l’agressivitat (Hilakivi-Clarke i col., 1992); sembla ser que l’aïllament provoca una disminució de l’activitat adrenocortical, per la qual cosa aquests animals resulten hiperexcitables amb l’estrès (Lakshmanan, 1986; Welch i Welch, 1969). Tot i això altres autors descriuen que una elevada densitat de població produiria el mateix efecte perquè també estimula de forma important l’eix pituitari-adrenal (Sigg i col., 1966), aquest fet l’hem pogut observar al nostre laboratori quan el nombre d’animals per gàbia era igual o superior a 5. Però aquests animals resultaven ferits i no eren vàlids pel nostre estudi. També ha estat descrit que, per tal d’assolir un elevat grau d’agressivitat, el resident sigui d’una soca més agressiva (Martínez i col., 1998b; Tamashiro i col., 2005) que el futur intrús. Al nostre estudi, l’intrús i el resident eren ambdós de la mateixa soca, i induïem més agressivitat al resident augmentant el temps d’aïllament o utilitzant-lo repetidament en diversos experiments. D’aquesta última forma com l’animal obtenia experiències de victòria sobre l’intrús també augmentava la seva agressivitat (Tamashiro i col., 2005).

L’estrès, en biomedicina, es caracteritza per una activació de l’eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) i el sistema nerviós simpàtic (SNS) amb el conseqüent augment de glucocorticoides i catecolamines (McEwen, 2000). Els resultats obtinguts en el nostre estudi de

confrontació entre mascles ens confirmen que es tracta d'un bon model d'estrès. Per una banda es produeix un augment molt significatiu dels nivells de corticosterona, marcador de l'activació de l'eix HPA (*Charmandari i col., 2005*). Els nivells màxims s'assoleixen als 30 minuts de l'inici de la confrontació i van disminuint al llarg del temps, encara que després de 180 minuts són encara superiors als nivells basals. Aquest decrement en la concentració de corticosterona al llarg del temps ja havia estat descrita per Pich i col·laboradors (*Pich i col., 1993*). La immobilització és un altre model d'estrès on també es pot observar un augment important dels nivells de corticosterona de forma molt ràpida (20 minuts) seguit d'una davallada d'aquestes concentracions (*Dal Zotto i col., 2002*). Però malgrat que la immobilització és considerat un estímul estressant intens, altres autors han trobat que són necessaris 120 minuts per detectar un pic de concentració màxima de corticosterona (*Kvetňansky i McCarty, 2000*). Per tant el model d'estrès escollit en aquest treball provoca una forta estimulació, i de forma molt ràpida, de l'eix HPA, perquè així ens ho indica la corticosterona plasmàtica. Tot i això també existeixen models on s'ha mesurat un increment d'aquest glucocorticoide superior al nostre, com és la natació forçada (*Meddings i Swain, 2000*), ja que en només 20 minuts provoca un augment de corticosterona al plasma 3 vegades superior al que nosaltres detectem després de 30 minuts lluita.

Dos han estat els motius que ens han fet decidir no valorar les catecolamines secretades al plasma en aquest model d'estrès per confrontació. El primer és que els nivells circulants de catecolamines varien en qüestió de pocs minuts (*Lundberg, 2000*) i el segon es que poden quedar molt afectades per l'estat de l'animal en el moment del sacrifici. Si haguéssim volgut obtenir mostres per valorar les catecolamines hauríem hagut de implantar un catèter als animals (*Lundberg, 2000*), el que hauria interferit posteriorment durant la realització de l'experiment.

Però tot i que no hem mesurat els nivells de catecolamines circulants (marcadors de l'activació del SNS) (*Charmandari i col., 2005*), si que hem pogut observar els efectes que aquestes produeixen, sobretot a nivell hepàtic. Les catecolamines mitjançant la unió a receptors α_1 i β adrenèrgics estimulen la glicogenolisi (*Nonogaki i Iguchi, 1997*), per aquest motiu es produeix una forta disminució dels nivells de glicogen, assolint-se uns nivells mínims després de 180 minuts de lluita. Però aquesta mobilització de les reserves de glicogen no queda reflexat en un augment de la glucosa a plasma, sinó que observem una hipoglucèmia molt moderada que es manté al llarg dels 180 minuts de lluita. Aquesta situació és atribuïble a l'activitat física de l'animal que implica un elevat consum de glucosa per part del múscul. Per tant, encara que la concentració de glucosa plasmàtica és una variable metabòlica molt sensible a l'estrès, considerada un clar indicador de la

intensitat de l'estímul estressant (*Armario i col., 1985*), en aquest estudi no ens ha resultat un bon marcador. I és que a l'hora d'avaluar la concentració de glucosa plasmàtica com a indicador de l'estrès cal tenir en compte el tipus d'estrès que estem aplicant (*Armario i col., 1990*).

Els nivells de glicogen assolits després de 180 minuts de lluita són extremadament baixos si ho comparem amb altres tipus d'estrès, com per exemple la immobilització (*Mena, 1999*), on fins i tot, s'observava una lleugera recuperació. És comprensible que en una situació d'hiperglucèmia (produïda per la immobilització) la degradació de glicogen hepàtic sigui mínima ja que el mateix increment en la concentració plasmàtica de glucosa inhibeix la glicogen fosforilasa hepàtica i activa la glicogen sintasa (*Bollen i col., 1998*). Pel contrari, la lleugera hipoglucèmia produïda en el model de confrontació entre mascles permet que els estímuls glicogenolítics associats a l'estrès (l'alliberament d'adrenalina) continuïn actuant al llarg de tot el temps de confrontació.

Prèviament a la realització d'aquest treball ja havia estat determinada la relació existent entre la secreció d'EGF de les glàndules submaxil·lars i el seu posterior increment en el plasma sota els estímuls estressants. Els estudis realitzats al nostre laboratori per Grau i col·laboradors (*Grau i col., 1994*) mostraven com disminuïa la concentració d'EGF a les glàndules submaxil·lars després de 10 minuts de l'administració, per via intravenosa, de 1.7 mg/Kg de fenilefrina (agonista α_1 -adrenèrgic). El contingut glandular d'EGF es reduïa un 36% i la seva concentració a plasma augmentava de forma paral·lela, arribant a assolir una concentració de 0.96 nM. Posteriorment M.P. Mena (*Mena, 1999*), provocant estrès fisiològic per immobilització observava que després de 20 minuts la concentració d'EGF a les glàndules submaxil·lars s'havia reduït a la meitat del seu valor inicial i la concentració a plasma incrementava fins a 1 nM.

En el model d'estrès per confrontació desenvolupat en aquest treball la secreció d'EGF va ser molt més espectacular que el que s'havia descrit anteriorment. A plasma els nivells d'EGF incrementen de forma molt important als 30 minuts i assoleixen el seu nivell màxim als 60 minuts de confrontació, quan la concentració d'EGF arriba a ser unes 500 vegades major que els animals control (nivells basals). Lakshmanan (*Lakshmanan, 1986*) mitjançant l'estrès per confrontació ja havia trobat que la concentració al plasma incrementava fins a 9000 vegades els nivells basals; però cal remarcar que per tal d'induir l'agressivitat injectava testosterona, que a la vegada provoca un increment de la síntesi i emmagatzematge d'EGF a les glàndules submaxil·lars (*Siminoski i col., 1993; Sigg i col., 1966*). Per tant una major concentració a les glàndules submaxil·lars permetrà

també una més gran alliberació. Després de 180 minuts les concentracions d'EGF a plasma es redueixen molt. Aquest fet és degut a la seva eliminació (*clearance*) del torrent circulatori per part d'òrgans com el fetge o el ronyó (*Hilarie i col., 1983; Kim i col., 1991*). Estudis realitzats per Grau i col·laboradors (*Grau i col., 1994*) van mostrar que en el ratolí és el fetge l'òrgan més important implicat en l'eliminació de l'EGF del plasma. Per aquest motiu vam valorar les concentracions d'EGF en aquest teixit. Observem un suau augment en les concentracions d'EGF al fetge després de 60 minuts de lluita i aquest podria ser el resultat de la funció d'eliminació abans esmentada.

L'increment en les concentracions d'EGF plasmàtiques després d'episodis agressius entre ratolins havia estat descrit anteriorment per Nexo i col·laboradors (*Nexo i col., 1981*). Ells observaven com amb 20 minuts de lluita les concentracions d'EGF a plasma augmentaven fins arribar a ser 300 vegades superior als nivells basals, i van concloure que l'origen d'aquest EGF era glandular gràcies a la utilització d'animals sialoadenectomitzats. En el nostre model d'estrès per confrontació observem que als 30 minuts la concentració d'EGF a les glàndules submaxil·lars s'ha reduït a la meitat, i es mantenen els nivells després de 180 minuts de lluita. Però a diferència dels estudis realitzats per Nexo, quan vam utilitzar animals sialoadenectomitzats en la confrontació (resultats que seran discutits més endavant) vam observar com les concentracions d'EGF al plasma d'aquests animals eren també molt elevades. Per aquest motiu vam voler assegurar-nos que realment era EGF el que estàvem mesurant al plasma i no cap altre membre de la família de l'EGF. En el seu moment també el grup de Nexo es va plantejar si era realment EGF el que trobava a plasma i no el seu precursor, i mitjançant proves de competitivitat i cromatografia va poder concloure que era EGF madur el que es trobava al plasma dels animals sotmesos a lluita (*Nexo i col., 1981*). En el nostre cas, l'assaig d'ELISA competitiu, en el qual estudiàvem l'afinitat del nostre anticòs anti-EGF de ratolí per diferents membres de la família de l'EGF, ens va confirmar que el que estàvem valorant a les mostres de plasma d'animals sialoadenectomitzats sotmesos a estrès per confrontació era EGF. Aquest fet va mostrar que l'origen de l'EGF plasmàtic en aquest model no és només glandular, sinó que també existeix una font extra-submaxil·lar.

La diferència de temps transcorregut després de la sialoadenectomia podria explicar aquesta contradicció en els resultats del grup de Nexo i el nostre. Ells utilitzaven els animals 10 dies després de la intervenció quirúrgica i en canvi nosaltres els utilitzàvem tres setmanes després, ja que amb menys temps havíem observat diferències en les concentracions plasmàtiques basals d'EGF entre els animals sialoadenectomitzats (SIALO) i els sotmesos a una operació simulada (OS) (*Poch, 1999*).

Un altre fet destacable d'aquest model d'estrès és que es produeix el fenomen de l'*habitució* quan els ratolins són exposats a sessions de confrontació de forma repetida. Degut a aquest fenomen detectem una menor resposta a la que havíem detectat quan l'estrès social era aplicat de forma aguda. L'aparició de l'*habitució* en resposta a l'exposició repetida d'un determinat estímul estressant s'ha observat molt freqüentment en estudis realitzats en animals (*Schrader i col., 1999; De Boer i col., 1990*) i en humans (*Gunnar i col., 1989; Wüst i col., 2005*). Com a conseqüència d'aquest fenomen es detecta una alteració en la funcionalitat dels eixos implicats en la resposta aguda a l'estrès com són l'eix HPA i el sistema nerviós simpàtic (SNS). Els nostres resultats concorden amb el que es descriu a la bibliografia i dos són els marcadors que clarament ens ho indiquen: les concentracions de corticosterona i d'EGF al plasma. Per una banda els nivells de corticosterona després de 60 i 180 minuts de lluita no són tan elevats com els assolits pels animals sotmesos a confrontació de forma aguda, indicant així una menor activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA). Per altra banda, s'atenua l'activació del sistema nerviós simpàtic i ho detectem en una menor alliberació d'EGF al plasma (mesura indirecta de l'alliberament d'adrenalina). La concentració d'EGF al plasma es manté sempre inferior en el grup d'animals habituat a la confrontació en els diferents períodes de lluita estudiats.

En canvi, no veiem aquest efecte en el glicogen hepàtic, ja que les concentracions es redueixen de forma molt important tant al grup d'animals habituat a la lluita com al grup no habituat. Aquest fet pot ser degut a l'estreta vinculació que existeix entre aquest paràmetre i les necessitats metabòliques durant la lluita. El metabolisme del glicogen en el fetge es regula de forma molt primària per la glicèmia i de forma secundària per les hormones. Tal i com s'observa als resultats no es produeix hiperglucèmia, ja que l'exercici realitzat durant els episodis de lluita consumeixen la glucosa alliberada, i així no es pot inhibir la glicogen fosforilasa hepàtica (*Bollen i col., 1998*).

Tot i que en la gran majoria d'estudis on s'apliquen els estímuls estressants de forma repetida, la resposta més generalitzada és l'anteriorment esmentada, existeixen casos on no és així. Dhabhar i col·laboradors (*Dhabhar i col., 1997*) van observar que l'*habitució* en els nivells de corticosterona en resposta a l'estrès diari causat per immobilització en rates *Sprague-Dawley* i *Lewis*, no es produïa en rates *Fisher*, soca caracteritzada per una major activació del seu eix HPA davant l'estrès agut. I és que no només la intensitat (*Pitman i col., 1990*) i la freqüència (*Ma i*

Lighthman, 1998) de l'estímul estressant determinen el desenvolupament de l'habitució sinó que les diferències entre individus també tenen un impacte significatiu en aquest fenomen.

A l'hora d'explicar els mecanismes que indueixen aquesta menor resposta és necessari fer una distinció entre l'*habitució* i l'*adaptació*. L'habitució es produeix perquè l'animal aprèn que l'estímul estressant no representa una amenaça real, per això la reacció es redueix i la resposta que es detecta és menor. Mentre que parlem d'adaptació quan es tracta d'un mecanisme més fisiològic: els eixos implicats disminueixen la seva activació degut a la elevada estimulació que s'està produint (Ruys i col., 2004; Bugajski, 2000), hi ha una desensibilització dels eixos. En qualsevol cas, aquesta menor resposta s'entén com un mecanisme de defensa de l'organisme per tal de conservar les reserves per a un ús més immediat si fos necessari (Dallman i col., 2000). Si aquesta disminució de la resposta fos realment deguda a l'adaptació fisiològica de l'organisme, l'aplicació d'un estímul estressant diferent (heterotípic) no hauria de modificar la resposta, però en canvi s'ha observat que aquesta es recupera, i fins i tot s'accentua (Dallman i col., 2000; Aguilera, 1998), indicant que aquesta menor resposta és deguda a l'aprenentatge dels animals i la denominem *habitució*. Però malgrat aquest fet, s'ha proposat que la desregulització/desensibilització de l'eix HPA sigui deguda a que les concentracions de ACTH i de glucocorticoides estan crònicament elevats, és a dir, que els nivells basals ja són més elevats que als animals no sotmesos a estrès (Bartolomucci i col., 2005). En el nostre estudi les concentracions de corticosterona al grup control dels animals habituats a la confrontació són superiors (encara que no de forma estadísticament significativa) que al grup control no habituat, per tant caldria tenir en compte aquest efecte com un altre component que afecta a la resposta de l'estrès que nosaltres finalment detectem.

5.2. LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES PROVOCA LESIONS HEPÀTIQUES.

Durant els estudis realitzats per a obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica vaig poder observar que quan els ratolins eren sotmesos a restricció de moviment (*restraint*) a 4°C es produïa una forta alliberació dels enzims intracel·lulars CK i AST al plasma, però no s'alteraven de forma significativa l'alliberació de LDH i ALT. Aquest patró d'enzims indicava l'aparició de lesions cardíques. Diferents autors han analitzat les causes d'aquest dany i

han arribat a la conclusió que és conseqüència directa de l'acció de les catecolamines sobre el cor (Downing i Chen, 1985; Cruickshank, 1990; Hori i col., 1994). En canvi l'estrès induït per confrontació no provoca lesions cardíques ja que l'activitat CK es troba gairebé inalterada durant els diferents períodes de lluita que nosaltres hem estudiat. Tampoc no es produeix un augment de l'activitat α -HBDH, mesura dels isoenzims cardíacs de la LDH (LDH-1 i LDH-2), després de 180 minuts de lluita, demostrant que l'estrès induït no afecta al cor. Però no només els enzims indiquen que no es produeixen aquest tipus de lesions, en l'anàlisi histopatològica de cors d'animals sotmesos a confrontació no detectem cap tipus de lesió necròtica (Pareja i col., 2003). Malgrat això, Matte l'any 1975 (Matte, 1975) mostraven que la confrontació que es produeix entre els ratolins que eren reagrupats durant 60 minuts, després d'un període d'aïllament, provocava que l'activitat CK augmentés 13 vegades el seus nivells basals.

En el nostre model d'estrès per confrontació els resultats ens suggereixen que s'estan produint lesions hepàtiques i diverses són les evidències que així ens ho indiquen. Observem que es produeix un augment de l'activitat ALT al plasma un cop finalitzat el període de 180 minuts de confrontació, i la relació AST/ALT es mantenen més o menys constants durant els diferents períodes de lluita establerts (entre 2.5 i 3.0). A banda d'aquest fet, en mostres histològiques d'animals sotmesos a 180 minuts de lluita (i deixats recuperar de l'estrès a les seves gàbies) s'observen l'aparició de petits focus necròtics. Avui és ben conegut que el reclutament de neutròfils polimorfonuclears que observem en les preparacions histològiques requereix la producció de citocines com la IL-6. L'augment de la IL-6 s'ha detectat en models d'estrès psicològics i fisiològics com el *shock* elèctric o la immobilització (Zhou i col., 1993). Nosaltres hem observat un lleuger i transitori increment de TNF- α i més clar i sostingut d'IL-6. El fet que podria explicar perquè les concentracions de IL-6 són superiors a les que esperàriem detectar com a conseqüència del TNF- α és que la font de secreció de IL-6 varia segons el model d'estrès estudiat. Després d'un estímul inflamatori (com l'LPS) la font principal d'aquesta citocina són les cèl·lules de Kupffer activades (Ulich i col., 1991), mentre que l'alliberació de IL-6 durant la immobilització prové de les cèl·lules parenquimals, i per un mecanisme diferent a la inducció de IL-6 per l'LPS (Kitamura i col., 1997). Les lesions que observem són molt moderades si les comparem amb models hepatotòxics més agressius com l'administració d'endotoxina (Sass i col., 2002; Liaudet i col., 2002) (el qual desenvoluparem més endavant) o el tractament amb tetraclorur de carboni (Czaja i col., 1995; Swain i col., 1999) on les lesions hepàtiques produïdes són molt més greus, i fins i tot es pot produir la mort de l'animal.

El dany hepàtic produït és a més reversible. Així ens ho indiquen els resultats obtinguts d'animals sotmesos a estrès social i als quals, posteriorment, deixàvem recuperant durant unes hores. Després de la finalització dels 180 minuts de lluita els enzims marcadors de l'existència de lesions hepàtiques van disminuint al llarg del temps, assolint els nivells basals 24 hores després de l'inici de l'experiment. Aquesta disminució és deguda a que són eliminats gradualment del torrent circulatori sense que hi hagi secreció "de novo" per part de cap teixit. També es recuperen normalment els paràmetres metabòlics analitzats, glucosa i glicogen hepàtic, indicant així que les lesions produïdes en el fetge pel model d'estrès per confrontació no han afectat a la seva funcionalitat.

Tradicionalment es creia que el principal efecte de l'estrès en el teixit hepàtic era degut exclusivament a canvis en la circulació sanguínia dins el fetge. Aquesta hipòtesi suggeria que l'estrès emocional produïa vasoespasmes i hipòxia que conduïen a l'aparició de lesions hepàtiques (*Kaplan i Wheeler, 1983*). Però avui en dia, que són ben coneguts els efectes fisiològics dels mediadors de la resposta a l'estrès, aquesta explicació resulta clarament simplista. És ben conegut que la inflamació hepàtica correlaciona amb un augment del nivell d'endotoxines a la circulació portal. Per tant els models d'estrès en els quals es produeix un augment de la permeabilitat al sistema gastrointestinal, com la immobilització o la natació forçada (*Meddings i Swain, 2000*) o la ingesta crònica d'etanol (*Kono i col., 2001*), l'augment posterior d'entotoxines a la circulació portal pot produir l'aparició de lesions hepàtiques. Per altra banda també cal tenir en compte l'acció directa de les pròpies catecolamines sobre el fetge, ja que els nivells de catecolamines augmenten durant la inflamació aguda (*Brody i col., 1961*), i contribueixen a augmentar la resposta inflamatòria i a accentuar la necrosi hepatocel·lular (*Brody i col., 1961; Schwetz i Plaa, 1969*). Però tot i això l'acció de les catecolamines sobre la resposta inflamatòria no és tan coneguda com la que es produeix en el sistema cardiovascular (*Swain, 2000*).

L'*habituació* que hem observat en aquest model d'estrès també afecta a les lesions tissulars tal i com ens ho mostren els enzims intracel·lulars que utilitzem com a marcadors de dany. Als animals habituats a l'estrès per confrontació no observem cap augment significatiu dels 3 enzims analitzats als 60 minuts de lluita. A més les activitats sempre són inferiors als obtinguts als animals no habituats. Aquest fet ens indica que als animals habituats s'ha produït aquesta adaptació a l'estrès que ja hem descrit per altres paràmetres, i que es pot explicar per dos motius: **(a)** que la confrontació no els hi suposi una descàrrega important d'adrenalina, i per tant no estan sotmesos a l'agent agressor principal, o **(b)** que l'animal hagi desenvolupat mecanismes de resistència que facin

que, malgrat la descàrrega d'adrenalina, no pateixin cap dany mesurable. Tal i com hem vist que responia la secreció d'EGF, la opció **a** sembla ser la que millor ens explicaria el fet de no observar dany en aquests animals habituats. Aquesta disminució en la secreció de catecolamines després de la exposició repetida a un determinat estímul estressant concorda amb el que es descriu a la bibliografia. Kvetnansky i col·laboradors (*Kvetnansky i col., 1984*) van observar que en rates sotmeses a estrès crònic per restricció de moviment (*restraint*) es produïa una disminució de les concentracions d'adrenalina i noradrenalina, encara que detectaven un increment de la seva capacitat de síntesi i emmagatzematge a les terminals simpàtiques i a les cèl·lules cromofines de la medulla adrenal. L'aplicació de descàrregues elèctriques a les potes (*footshock*) i la natació forçada són també models d'estrès en els quals s'ha observat que quan s'apliquen de forma repetida es produeix una reducció important de la secreció d'adrenalina i noradrenalina al plasma (*McCarty i col., 1992*).

5.3. LES LESIONS HEPÀTIQUES PRODUÏDES PER LA CONFRONTACIÓ ENTRE MASCLES SÓN INDEPENDENTS DE LA SECRECIÓ D'EGF.

Al nostre laboratori hem pogut demostrar que l'EGF exerceix una acció citoprotectora aguda al cor. Els estudis realitzats per M. Pareja per obtenir el grau de Màster Experimental en Bioquímica (*Pareja, 2001*) van mostrar com les lesions cardíques que es produïen com a conseqüència de la restricció de moviment (*restraint*) a 4°C, milloraven de forma molt significativa si als ratolins se'ls hi administrava EGF per via intraperitoneal. Paral·lelament en un assaig que jo mateixa vaig realitzar, quan animals sotmesos a estrès per confrontació eren tractats amb la tirfostina AG-1478 (inhibidor del receptor d'EGF- ErbB1) (*Livitzki i Gazit, 1995*) observava que es produïa un augment de l'activitat CK i de la LDH-1, isoforma cardíaca de l'LDH, al plasma (*Pareja i col., 2003*). Indicant així l'aparició de lesions cardíques que no s'observen normalment en aquest model d'estrès.

Aquests resultats ens mostraven com un model on no es detecta una secreció important d'EGF, com és la restricció de moviment a 4°C, les lesions cardíques provocades es poden millorar amb l'administració exògena d'EGF. Mentre que en un model on es produeix una secreció

endògena molt significativa d'EGF (resultats experiment I), si bloquegem les seves accions amb la tirfostina EG-1478 aconseguim que es produeixin lesions cardíques. Així s'ens indica com l'existència d'EGF circulant durant l'aplicació de l'estímul estressant protegeix el cor de les lesions agudes induïdes per les catecolamines.

Amb aquests antecedents ens vàrem plantejar si l'EGF també exercia la seva activitat protectora al fetge. Tal i com s'ha descrit anteriorment la confrontació entre mascles és un model d'estrès en el qual les concentracions d'EGF assolides al plasma són molt importants i per aquest motiu les diferents estratègies aplicades per resoldre aquest dubte van consistir en bloquejar l'acció de l'EGF.

Una primera aproximació va consistir en sotmetre als animals a sialoadenectomia. Mitjançant aquesta operació quirúrgica consistent en l'extracció de les glàndules submaxil·lars (SMG), principal lloc de síntesis i emmagatzematge d'EGF en el ratolí mascle (*Fisher i Lakshmanan, 1990*). Volíem veure si els animals que tinguessin les glàndules submaxil·lars intactes (OS) estaven més protegits que aquells als quals els hi haguéssim extret les glàndules (SIALO). Sabem que en animals sialoadenectomitzats l'adrenalina no provoca un ràpid increment en la concentració plasmàtica d'EGF (*Grau i col., 1994; Grau i col., 1997; Tebar i col., 2000*). A més, Nexo i col·laboradors (*Nexo i col., 1981*) van descriure que la sialoadenectomia evitava l'increment d'EGF en el plasma que provoca el comportament agressiu. Tot i que no vàrem observar cap diferència en els paràmetres sensibles a l'estrès, ni en les activitats enzimàtiques al plasma, entre els animals SIALO i OS, no vam poder concloure que l'EGF no tingués cap efecte ja que la concentració plasmàtica d'EGF era molt elevada, tant als animals OS com els SIALO. Aquest resultat contrasta amb l'obtingut per M.P. Mena (*Mena, 1999*) immobilitzant animals sialoadenectomitzats. Ella no va observar cap increment en la concentració plasmàtica d'EGF.

A la bibliografia però hem pogut observar antecedents d'una situació semblant, ja que Tuomela (*Tuomela, 1990*) trobava elevades concentracions d'EGF al plasma d'animals sialoadenectomitzats 90 minuts després de l'administració de fenilefrina (agonista α_1 -adrenèrgic), força més tard que en els animals controls.

En tot cas, donats els resultats que hem obtingut hem de concloure que la sialoadenectomia no ens ha resultat útil pel nostre propòsit de determinar la funció de l'EGF.

La bibliografia recull estudis en què la injecció d'anticossos anti-EGF ha resultat una estratègia exitosa per tal de detectar diferents accions realitzades per l'EGF, tant "in vitro" (Roy, 1993; Chen, 1992) com "in vivo" (Oohira, 1991; Adachi i col., 1995; Vesey i col., 1992). Nosaltres però no hem vist cap efecte de l'administració d'anticossos anti-EGF per cap de les vies d'administració. Com hem observat que la concentració d'EGF és més elevada com més alta és la concentració d'anticossos al plasma (ja sigui analitzat per *western blot* o per *ELISA*), aquests estudis tampoc ens permeten concloure res sobre la implicació de l'EGF en les lesions hepàtiques provocades per la confrontació. No podem excloure que els anticossos no hagin aconseguit bloquejar completament l'EGF circulant. Haurien estat necessaris experiments complementaris que no hem fet ja que la tercera aproximació que vàrem fer va resultar més conclouent.

La tirfostina AG-1478 és un inhibidor d'ErbB1, que actua inhibint l'activitat tirosina-cinasa d'aquest receptor (Livitzki i Gazit, 1995), i la qual, recentment, també s'ha descrit que pot inhibir ErbB4 (Bowers i col., 2001; Fukazowa i col., 2003). L'efectivitat d'aquesta tirfostina ha quedat demostrada a la bibliografia, ja que retrasa el creixement de tumors A431 a ratolins *nude* (Busse i col., 2000) i disminueix l'acumulació d'hidroxiprolina en un model de fibrosi pulmonar de rata (Rice i col., 1999). En aquests estudis s'utilitzava una dosi de 50 mg/Kg. En els estudis realitzats per M. Pareja al nostre laboratori (Pareja i col., 2003) va observar que amb una dosi de 25 mg/Kg ja quedava bloquejada completament la fosforilació de ERK1/2 en el fetge del ratolí. Una alternativa a l'ús de l'AG-1478 hauria estat l'administració d'anticossos neutralitzants dirigits a ErbB1. Però els anticossos comercials disponibles al mercat són pels receptors humans i aquests sabem que no creuen amb els receptors murins (Herbst i Shin, 2002; Mendelsohn i Baselga, 2000).

Sabem doncs que la tirfostina és un mètode altament efectiu per tal d'inhibir el receptor ErbB1, i vam escollir la mateixa dosi emprada per M. Pareja: 25 mg/Kg. El fet que també pugui inhibir ErbB4 no resulta problemàtic perquè el fetge adult no expressa aquest receptor (Carver i col., 2002).

Els paràmetres sensibles a l'estrès no es veuen afectats per la injecció de la tirfostina. Els nivells d'aquests paràmetres són similars en els dos grups d'animals sotmesos a estrès per confrontació. Tampoc detectem cap diferència en les concentracions d'EGF a glàndules submaxil·lars ni a plasma, indicant així que la resposta a l'estrès social aplicat s'està desenvolupant amb normalitat.

Si observem amb deteniment les activitats enzimàtiques podem veure com les lesions hepàtiques no empitjoren, ja que els nivells d'ALT no són superiors al grup tractat amb la tirfostina. Però en canvi si que empitjoren de forma significativa les lesions produïdes a d'altres teixits i que queda reflexat en un augment molt més important de l'activitat LDH i AST, al grup tractat amb la tirfostina. Aquests resultats concorden amb l'obtingut per Pareja i col·laboradors (*Pareja i col., 2003*) en els què demostren que la tirfostina AG1478 empitjora les lesions cardíaques.

D'aquests últims resultats podem concloure que les elevadíssimes concentracions d'EGF al plasma no tenen cap efecte citoprotector al fetge, al contrari que passa al cor. És lícit plantejar-nos el perquè d'aquesta diferència. Potser l'explicació estigui en la diferent vulnerabilitat dels teixits i òrgans davant les agressions induïdes pels estímuls estresants. El fetge és un òrgan amb una elevada capacitat de regeneració i per aquest motiu es pot recuperar amb èxit de les petites lesions que l'estrès li pugui provocar, però el cor no té aquesta capacitat i per tant es pot entendre que tingui major necessitat d'estar protegit.

Malgrat que en el model d'estrès per confrontació no hem vist que l'EGF exerceixi una acció protectora al fetge, si que és cert que en altres situacions on es veu afectada la integritat hepàtica, aquest factor de creixement desenvolupa aquesta funció.

En estudis de regeneració hepàtica s'ha demostrat que l'EGF juntament amb altres factors de creixement són imprescindibles per a la correcta recuperació del teixit (*Fausto, 2000*). Després d'una hepatectomia parcial es detecta un augment molt important dels nivells d'EGF que ajuden a que les cèl·lules puguin progressar cap a la fase G1 del cicle cel·lular (*Fausto, 2000; Koniaris i col., 2003*). Altres exemples on també s'han detectat les accions beneficioses de l'EGF són dos models d'estrès físic on es provoca dany hepàtic: l'administració crònica d'etanol i l'administració d'endotoxina bacteriana. En ambdós casos es desenvolupa una resposta inflamatòria, que en el model d'administració d'etanol és deguda a que augmenten de forma molt important les concentracions de LPS a la vena porta (*Kono i col., 2001*), que l'EGF aconsegueix reduir de forma molt significativa.

En ratolins mascles de la soca C57BL/6 tractats crònicament amb etanol s'observa un augment de les activitats transaminases (ALT i AST) al plasma i dels nuclis apoptòtics al parènquima hepàtic, i mitjançant l'administració d'EGF humà es restaura l'apariència histològica del fetge i disminueixen les activitats aminotransferasa al plasma (*Deaciuc i col., 2002*). Aquesta

mateixa millora en el dany hepàtic es detecta en rates i ratolins tractats amb una combinació d'LPS i galactosamina (LPS/D-GalN) i als quals s'injecta EGF recombinant humà (*Cho i col., 2000*).

5.4. LA SIALOADENECTOMIA PRÈVIA, PERÒ NO L'ADMINISTRACIÓ AGUDA D'EGF, ALTERA LA RESPOSTA A L'ENDOTOXINA BACTERIANA.

L'administració d'endotoxina bacteriana o LPS és un model àmpliament utilitzat per tal de provocar lesions hepàtiques (*Endo i col., 1999; Morikawa i col., 1999; Nagaki i col., 1999*). Però tot i que aquest model està molt dirigit a provocar aquests tipus de lesions, en ocasions es veu sobrepassada la capacitat detoxificant del fetge i com a conseqüència es poden veure afectats altres òrgans (*Bigatello i col., 1987; Lin i col., 1995*). Si finalment té lloc una errada multiorgànica es pot produir fins i tot la mort de l'individu.

Els nostres estudis amb LPS ens han premès detectar l'aparició de lesions hepàtiques greus, encara que treballem amb dosis subletals, ja que així ens ho indiquen els valors de les activitats LDH i ALT determinades a plasma dels animals tractats amb endotoxina bacteriana. Després de 8 hores aquestes activitats enzimàtiques es troben molt elevades en totes les dosis injectades, resultat que concorda amb la bibliografia, on es descriu l'existència d'un pic màxim al plasma 8 hores després de l'administració d'endotoxina bacteriana (*Endo i col., 1999; Sass i col., 2002*). A més també hem observat com es produïa una disfunció hepàtica temporal. Diversos estudis indiquen com l'endotoxina produeix una alteració del metabolisme glucídic que es tradueix en una ràpida i transitòria hiperglucèmia, detectada de 60 a 90 minuts després de l'administració de l'LPS (*Santak i col., 1998; Sugita i col., 2002*), seguit d'una caiguda de les concentracions de glucosa a més llarg termini (*Goto i col., 1994; Lang i col., 1993*). Aquest efecte és degut a una elevada estimulació de la glicòlisi, induït inicialment per les catecolamines (*Hardgrove i col., 1988; Spitzer i col., 1989*), i a una elevada captació de glucosa per part diferents teixits (*Lang i col., 1993*). Nosaltres no detectem hiperglucèmia als animals tractats amb LPS, sinó que detectem unes concentracions de glucosa molt baixes a les 8 hores de la injecció. Tampoc quan hem mesurat la concentració de glucosa als 45 minuts (figura 4.32) hem detectat hiperglucèmia.

L'estudi de l'evolució del dany hepàtic produït ens ha permès detectar que tant la funcionalitat hepàtica com les lesions són recuperables. El nivell de glicèmia es troba totalment recuperat 24 hores després de la injecció d'LPS, però en canvi els nivells de glicogen no es recuperen fins a les 48 hores. Aquesta lenta recuperació podria explicar-se pel fet que l'LPS provoca l'aparició d'una anorèxia temporal (*Vallés i col., 2000*), que també ha estat observada en altres models d'estrès com la immobilització, i que sembla ser que està íntimament relacionat amb l'alliberació de l'hormona CRH (*Shibasaki i col., 1988; Smagin i col., 1999*). D'aquesta manera l'animal menja menys i les reserves de glicogen triguen una mica més en assolir els nivells basals. Pel que fa a les diferents activitats enzimàtiques determinades, LDH i ALT a plasma i MPO a fetge, veiem que totes elles es troben totalment recuperades 24 hores després de la injecció. Aquest resultat coincideix plenament amb el que descriuen Sass i col·laboradors (*Sass i col., 2002*), en un model d'hepatotoxicitat gairebé idèntic al nostre, ja que, a diferència de la gran majoria d'estudis, ells utilitzen LPS de *Salmonella abortus equii*. Cal indicar però, que a la bibliografia podem trobar que després de 24 hores els enzims es mantenen encara elevats (*Cho i col., 2000*), i és que la intensitat de la resposta inflamatòria depèn de l'origen de l'endotoxina utilitzada.

Les lesions que detectem són el resultat de la resposta inflamatòria generada per l'LPS. Tal i com ha quedat ben establert a la bibliografia, l'endotoxina bacteriana provoca una ràpida producció de citocines, tan proinflamatòries (TNF- α i IL-6) (*Beutler i col., 1985; Beutler i Cerami, 1986*) com antiinflamatòries (IL-10) (*Moore i col., 1993*). Nosaltres observem un augment de les tres citocines mesurades durant les 3 primeres hores després de la injecció d'LPS. A banda d'iniciar la resposta inflamatòria, les citocines també actuen a nivell del sistema nerviós central (SNC), induint l'activació de l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA) i del sistema nerviós simpàtic (SNS) (*Turnbull i Rivier, 1999; Elenkov i col., 2000*). Nosaltres hem pogut detectar aquesta activació perquè a plasma es produeix un augment molt important dels nivells de corticosterona, indicadora de l'activació de l'eix HPA.

Prèviament al nostre treball estudis realitzats per Cho i col·laboradors (*Cho i col., 2000*) havien observat com l'administració exògena d'EGF en rates i ratolins tractats amb endotoxina bacteriana ocasionava una millora molt significativa de les lesions hepàtiques. En aquest mateix sentit, Deaciuc i col·laboradors (*Deaciuc i col., 2002*) van demostrar que el pretractament durant 7 dies amb EGF reduïa les lesions provocades per l'alcohol. Per aquest motiu vam decidir estudiar l'efecte de l'EGF en el nostre model d'hepatotoxicitat. Tot i que en el model de confrontació discutit anteriorment la sialoadenectomia no ens havia resultat útil per eliminar l'EGF, ja que ens

mostrava l'existència d'una font extra-glandular d'EGF, en altres models com la immobilització (Mena, 1999) i en la injecció de fenilefrina (Grau i col., 1994) havia resultat una estratègia existosa per tal de no detectar un augment de les concentracions d'EGF al plasma.

Els primers resultats obtinguts semblaven confirmar la importància de l'EGF endogen, ja que l'LPS provoca en animals SIALO tant un major increment de transaminases al plasma, com una major mortalitat. Però com l'administració aguda d'EGF exogen no va reduir les lesions produïdes per l'LPS, hem de concloure que els resultats observats en els animals sialoadenectomitzats no s'expliquen per la manca de l'increment transitori de l'EGF al plasma.

Volíem completar aquest estudi amb l'administració de l'inhibidor del receptor d'EGF (AG-1478). Aquest inhibidor havia estat fonamental per demostrar la importància de l'EGF com a protector cardíac (Pareja, 2001). Sorprenentment, vam observar que l'AG-1478 exercia un efecte protector. Un anàlisi més exhaustiu de la bibliografia ens va mostrar que les tirfostines tenen un efecte antioxidant inespecífic (Novogrodsky i col., 1994; Sagara i col., 2002) que ens pot explicar la protecció que hem detectat.

Els nostres resultats semblen contradir els ja publicats, on es suggereix un efecte hepatoprotector de l'EGF. No tenim una explicació definitiva per aquesta discrepància. Per una banda Deaciuc i col·laboradors (Deaciuc i col., 2002) fan un pretractament de 7 dies i, potser, l'EGF ha activat un programa de gens protectors. Fet que no hauria estat possible en el nostre treball. Però Cho i col·laboradors (Cho i col., 2000) fan uns experiments molts semblants als nostres. L'única diferència que hem pogut constatar és la procedència de l'EGF exogen administrat: de ratolí en el nostre cas (homòleg al de l'hoste) i humà en els experiments de Cho i col·laboradors (Cho i col., 2000) (heteròleg al de l'hoste).

Buscant les causes de la major toxicitat de l'LPS en els animals SIALO, en primer lloc hem d'excloure que sigui deguda a una alteració en la cinètica de desaparició de l'LPS. Tant el pic de concentració màxima, com el pendent de la corba de desaparició de l'LPS al plasma són idèntics en els animals OS i en els animals SIALO. Tot i això hem de dir que observem una cinètica més lenta que la descrita per Mathison i Ulevitch (Mathison i Ulevitch, 1979) o Nakao i Shinohara (Nakao i Shinohara, 1985). Però cal indicar que nosaltres hem fet injeccions intraperitoneals, i en aquests estudis, l'LPS s'administrava per via intravenosa.

Per estudis realitzats al nostre laboratori per Enric Poch (*Poch, 1999*), Irma Buira (*Buira, 2001*) i, més recentment, Meritxell Viladrich (*Viladrich, 2004*), sabem que la sialoadenectomia suposa la desaparició transitòria d'EGF de la circulació i que, durant aquest temps, es produeix un augment de l'apoptosi en els hepatòcits. Aquesta pèrdua és compensada amb un creixement hipertròfic de les cèl·lules supervivents. A conseqüència d'això, a les poques setmanes de l'operació, el fetge conté menys hepatòcits però aquests són més grans. Tots els nostres experiments els hem fet 3 setmanes després de la sialoadenectomia, temps en que aquestes alteracions s'han anat produint. De fet, nosaltres mateixos tenim evidències de l'existència d'aquestes alteracions estructurals. Per començar, quan hem quantificat l'índex d'afectació histopatològica ja hem vist que, en els animals injectats amb salí, aquest era més elevat en SIALO que en OS. A més, en els darrers experiments de perfusió "ex vivo" del fetge, també hem vist que en condicions basals, els fetges provinents d'animals SIALO activen espontàniament la producció de citocines molt abans que els animals OS.

Per tot això, nosaltres pensem que la major resposta a l'LPS detectada als animals SIALO és conseqüència de les alteracions prèvies que aquesta operació quirúrgica ha provocat en el fetge.

Existeix un ampli consens en que les lesions hepàtiques provocades per l'endotoxina són conseqüència de la resposta inflamatòria (*Su, 2002*) i en que, si la resposta inflamatòria és inhibida o disminuïda es produeix una millora considerable de les lesions. Així si s'inactiven les cèl·lules de Kupffer, mitjançant l'administració de clorur de gadolini ($GdCl_3$), la resposta inflamatòria no progressa i es poden prevenir l'aparició de lesions tissulars (*Adachi i col., 1994; Gloor i col., 1998*). Una altra estratègia utilitzada amb èxit ha estat actuar directament sobre el TNF- α . La inhibició de la seva activitat amb l'administració de receptors solubles (*Czaja i col., 1995*) o amb anticossos (*Tracey i col., 1987; Iimuro i col., 1997*) han demostrat ser una eina altament efectiva per prevenir l'aparició de les lesions provocades per la inflamació. Tot i això, nosaltres hem observat que la resposta inflamatòria desenvolupada "in vivo" pels animals SIALO és lenta. De la mateixa manera, també "ex vivo" la resposta inflamatòria del fetge d'animals SIALO és més lenta (valor de T_{50} per la secreció de TNF- α més elevat) i menys intensa (valors Max més baixos per a totes les citocines).

Hem de destacar que en el fetge perfós d'animals SIALO, l'alliberació d'LDH és més tardana (major T_{50}) i de menor magnitud (menor Max). L'anàlisi de correlacions entre producció de

citocines i l'alliberament d'LDH ens indica que aquest depèn majoritàriament de la producció de TNF- α (citocina proinflamatòria) i IL-10 (citocina antiinflamatòria). I, sobretot, que no existeixen diferències en el fetge perfós d'animals OS i SIALO pel que fa a la relació entre producció de citocines i alliberament d'LDH. És a dir, que el menor alliberament d'LDH per part dels fetges perfosos d'animals SIALO és només conseqüència de una menor producció de TNF- α i IL-10 (i de les altres citocines).

Aquesta conclusió sembla contradir el que observem en els estudis "in vivo" (major hepatotoxicitat en els animals SIALO). Però s'ha de tenir en compte que els experiments de perfusió només duraven 3 hores i, "in vivo", les diferències en LDH apareixen a les 8 hores. A més, "in vivo", a més de l'acció directa de les citocines, també és important el reclutament de neutròfils (provocat per les quimiocines) i l'estrès oxidatiu que aquests provoquen (*Li i col., 2004a*). De fet, nosaltres hem pogut observar que la infiltració de neutròfils és major als animals SIALO, ja que així ens ho indica l'activitat MPO (més elevada al grup SIALO que al grup OS injectat amb LPS).

Un altre factor que ens ajudarà a entendre el que observem "in vivo", és l'efecte de la sialoadenectomia sobre la secreció de corticosterona.

És conegut que algunes citocines estimulen l'eix hipotàl·lem-pituitària-adrenal (HPA), induint la producció de CRH (*Chrousos, 1995*). Són especialment actives el TNF- α , la IL-1 β i la IL-6. Com nosaltres no hem observat que la sialoadenectomia afecti a la secreció de corticosterona, ni en el model de confrontació ni en el d'immobilització, pensem que la menor producció de corticosterona als animals SIALO tractats amb LPS és deguda a la menor producció d'aquelles citocines pel fetge, que es tradueix en un augment de la concentració al plasma més lent.

La corticosterona té una funció antiinflamatòria molt coneguda (*Boumpas i col., 1993*). En el fetge, els glucocorticoides afecten a la producció de diferents citocines, tant pro- com antiinflamatòries. Estudiant l'efecte dels glucocorticoides en el model d'intoxicació aguda provocada pel CCl₄, Swain i col·laboradors (*Swain i col., 1999*) van arribar a la conclusió que el seu principal efecte és l'estimulació de la producció d'IL-10. Aquesta citocina disminueix la producció de quimiocines, i com a resultat es produeix una menor atracció dels neutròfils cap al teixit (*Li i col., 2004b*).

El conjunt dels nostres resultats ens porta a hipotetitzar que la major citotoxicitat de l'LPS als animals SIALO és resultat d'un desequilibri entre el conjunt dels agents pro- i antiinflamatoris. La conseqüència d'aquest desequilibri seria el reclutament d'un major nombre de neutròfils i una major extensió de la llesió tissular.

En definitiva, els nostres resultats ens porten a concloure que les alteracions provocades per la sialoadenectomia en el fetge, prèviament a l'administració de l'LPS, són la causa de la menor tolerància dels animals sialoadenectomitzats a les endotoxines.

Podem plantejar diverses hipotesis per explicar aquest fenomen. Tot i que en els estudis d'Enric Poch (*Poch, 1999*), Irma Buira (*Buira, 2001*) o Meritxell Viladrich (*Viladrich, 2004*) no s'ha quantificat el nombre de macròfags residents en el fetge d'animals sialoadenectomitzats, podria ser que aquest nombre fos menor en aquest grup i això explicaria la menor producció de citocines que detectem.

De fet, és conegut que durant el procés de regeneració hepàtica posterior a l'hepatectomia, la recuperació de les cèl·lules de Kupffer és més lenta que la dels hepatòcits (*Michalopoulos i DeFrances, 1997*). Òbviament la sialoadenectomia no suposa una agressió tan intensa sobre la cel·lularitat com l'extirpació d'un 70% de la massa hepàtica, però no descartem que es produeixi un fenomen similar. Tampoc podem descartar que, tot i no afectar el nombre de macròfags residents, la sialoadenectomia afecti l'expressió de TLR-4, principal receptor del lipopolisacàrid (*Bannerman i Goldblum, 2003; Beutler i col., 2003*).

En aquest sentit, és coneguda la importància de l'EGF pel manteniment de la integritat de la mucosa intestinal. Rao i col·laboradors (*Rao i col., 1997*) ja van demostrar que la sialoadenectomia augmentava la permeabilitat intestinal. És possible que en els animals sialoadenectomitzats augmenti la permeabilitat a les endotoxines de la flora intestinal, de forma que el fetge es vegi sotmès a una major estimulació basal. Com el principal component del receptor de l'endotoxina (TLR-4) pateix *down-regulation* per la pròpia estimulació amb LPS (*Mohammad i col., 2006*), la menor resposta del fetge perfós es podria explicar per una menor expressió del TLR-4 fruit d'aquesta *down-regulation*.

La figura 5.1 mostra de forma esquemàtica la conclusió a què arribem en relació als estudis amb endotoxines. L'LPS activa les cèl·lules de Kupffer induint la producció de citocines proinflamatòries i també antiinflamatòries. Les proinflamatòries activen l'eix HPA el que comporta l'increment de secreció de corticosterona. La corticosterona actua tant sobre les cèl·lules de Kupffer com sobre els hepatòcits amb una acció global antiinflamatòria. La sialoadenectomia altera la resposta de les cèl·lules de Kupffer a l'endotoxina. Això es tradueix en una menor producció de citocines en el fetge perfós que pot explicar el retard en l'increment de concentració plasmàtica de les citocines proinflamatòries. Creiem que aquesta és la causa de la menor producció de corticosterona i per tant, de la menor concentració plasmàtica d'aquesta hormona. Suggerim que la descompensació entre factors proinflamatoris (TNF- α , IL-6) i antiinflamatoris (IL-10, corticosterona) portarà a un major reclutament de neutròfils (increment d'MPO) i, en definitiva, a una major lesió hepàtica i mortalitat dels animals sialoadenectomitzats.

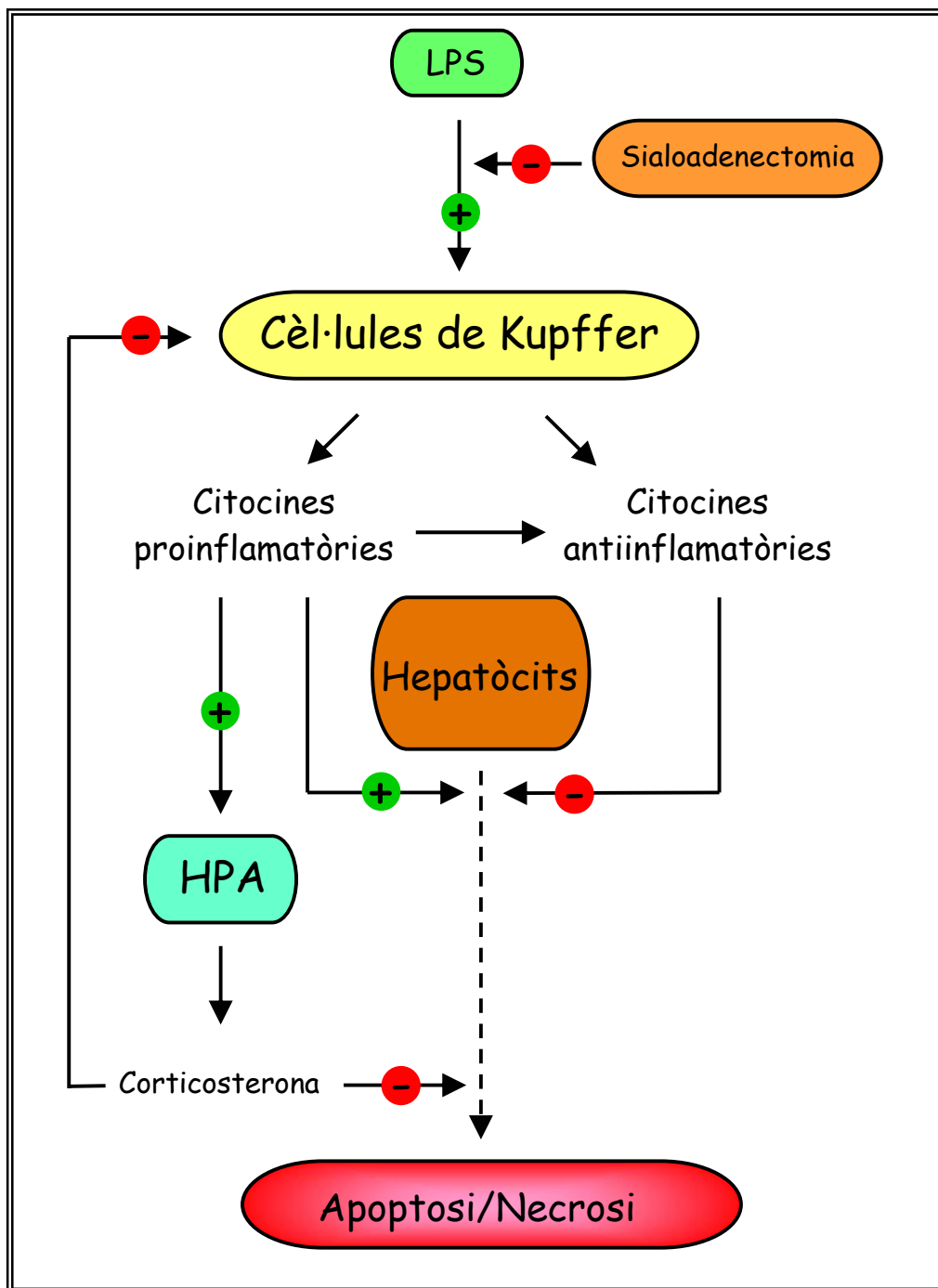


Figura 5.1.- Esquema representatiu de la resposta inflamatòria generada per l'endotoxina bacteriana o LPS.

Conclusions

- La confrontació de mascles de ratolí desencadena una intensa agressivitat que comporta una elevadíssima secreció d'EGF cap al plasma. El fet que en els animals sialoadenectomitzats també augmenti la concentració d'EGF indica que fonts alternatives poden suplir les glàndules submaxil·lars.
- El patró d'enzims alliberats al plasma i l'anàlisi histopatològica del fetge dels animals sotmesos a confrontació indiquen que l'estrès social provoca lesions hepàtiques de caràcter lleu i transitori.
- Les elevadíssimes concentracions d'EGF assolides al plasma no tenen cap efecte protector agut sobre les lesions hepàtiques provocades per la confrontació.
- Tampoc en el model d'estrès físic-immune l'EGF té cap efecte protector agut de les lesions provocades per l'endotoxina bacteriana.
- Malgrat això, en els animals sialoadenectomitzats, la resposta inflamatòria provocada per l'administració de l'endotoxina bacteriana es troba alterada, de forma que pateixen lesions hepàtiques greus i una major mortalitat.
- Els estudis en fetges perfosos ens indiquen que la major acció tòxica de les endotoxines bacterianes que s'observa en els animals sialoadenectomitzats no és deguda a una major sensibilitat del teixit hepàtic a l'acció dels mediadors de l'endotoxina.
- El conjunt dels nostres resultats suggereix que l'alteració del balanç entre agents pro- i antiinflamatoris és el responsable de la major infiltració de neutròfils, major gravetat de les lesions hepàtiques i, en últim terme, major mortalitat observada en els animals sialoadenectomitzats després de l'administració d'endotoxines bacterianes.

Bibliografia

A.

Adachi H., Kurachi H., Homma H., Adachi K., Imai T., Sakata M., Matsuzawa Y., Miyake A. Involvement of epidermal growth factor in inducing adiposity of aged female mice. *J.Endocrinology*. **1995**; 146(3): 381-193.

Adachi Y., Bradford B.U., Gao W., Bojes H.K., Thurman R.G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology*. **1994**; 20: 453-460.

Aguilera G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends. Endocrinol. Metab.* **1998**; 9: 329-336.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Biología molecular de la célula. **1992**. Editorial Omega (2ª edición).

Allen A., Flemstrom G., Garner A., Kivilaakso E. Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol. Rev.* **1993**; 73: 823-857.

Almawi W.Y., Beyhum H.N., Rahme A.A., Rieder M.J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J. Leukoc. Biol.* **1996**; 60: 563-572.

Alonzi T., Fattori E., Cappelletti M., Ciliberto G., Poli V. Impaired STAT3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6 deficient mice. *Cytokine*. **1998**; 10(1): 13-18.

Ambrosini A., Louin G., Croci N., Plotkine M., Jafarian-Tehrani M. Characterization of a rat model to study acute neuroinflammation on histopathological, biochemical and functional outcomes. *J. Neurosci. Methods*. **2005**; 144(2): 183-191.

Antoni F.A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrin. Rev.* **1986**; 7: 351-378.

Appella E., Weber I.T., Blasi F. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett.* **1988**; 231(1): 1-4.

Armario A., Castellanos J.M. A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev. Esp. Fisiol.* **1984**; 40: 437-442.

Armario A., Lopez-Calderon A., Jolin T., Balasch J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1986**; 10: 245-250.

Armario A., Marti J., Gil M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*. **1990**; 15: 341-347.

Armario A., Montero J.L., Balasch J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol. Behav.* **1985**; 37: 559-561.

Arnau, A. Dany cel·lular en l'estrès per immobilització en el ratolí. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **1999**.

Arthur M.J.P., Kowalski-Saunders P., Wright R. Effect of endotoxin on release of reactive oxygen intermediates by rat hepatic macrophages. *Gastroenterology*. **1988**; 95: 1588-1594.

Avgustinovich D.F., Gorbach O.V., Kudryavtseva N.N. Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiol. Behav.* **1996**; 61: 37-43.

Avitsur R., Stark J.L., Sheridan J.F. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm. Behav.* **2001**; 39: 247-257.

B.

Baass P. C., Di Guglielmo G.M., Authier F., Posner B.I., Bergeron J.J.M. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell. Biol.* **1995**; 5(12): 465-470.

Babul A., Gonul B., Dincer S., Erdogan D., Ozogul C. The effect of EGF application in gel form on histamine content of experimentally induced wound in mice. *Amino Acids.* **2004**; 27(3-4): 321-326.

Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* **1996**; 17: 245-261.

Bannerman D.D., Goldblum S.E. Mechanism of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2003**; 284: L899-L914.

Barnard C.J., Behnke J.M., Sewell J. Social behavior, stress and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of duration of grouping and aggressive behavior prior to infection on susceptibility to *Babesia microti*. *Parasitology.* **1993**; 107: 183-192.

Bartolomucci A., Palanza P., Sacerdote P., Panerai A.E., Sgoifo A., Dantzer R., Parmigiani S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav. Rev.* **2005**; 29: 67-81.

Bartolomucci A., Chirieleison A., Gioiosa L., Ceresini G., Parmigiani S., Palanza P. Age at group formation alters behavior and physiology in male but not female CD-1 mice. *Physiol. Behav.* **2004**; 82: 425-434.

Bartolomucci A., Palanza P., Gaspani L., Limirali E., Panerai A.E., Ceresini G., Poli M.D., Parmigiani S. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependant. *Physiol. Behav.* **2001**; 73: 401-410.

Bartsch W., Sponer G., Dietmann K., Fuchs G. Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD₅₀ of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1976**; 26: 1581-1583.

Bautista A.P., Spitzer J.J. Acute endotoxin tolerance downregulates superoxide anion release by the perfused liver and isolated hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology.* **1995**; 21: 855-862.

Bazzoni F., Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* **1996**; 334: 1717-1725.

Beg A.A., Baltimore D. An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science.* **1996**; 274: 782-784.

Bell G.I., Fong N.M., Siempien M.M., Wormsted M.A., Caput D., Ku L.L., Urdea M.S., Rall L.B., Sanchez-Pescador R. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence pressed in vitro and gene organization. *Nucleic Acids. Res.* **1986**; 14(21): 8427- 8446.

Bennett N.T., Schultz G.S. Growth factors and wound healing – biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am. J. Surg.* **1993**; 165: 728-737.

Berasain C., García-Trevijano E.R., Castillo J., Erroba E., Lee D.C., Prieto J., Avila M.A. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology.* **2005**; 128: 424-432.

- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* **2001**; 26: 112-117.
- Besedovsky H.O., del Rey A., Sorkin E., Da Prada M., Keller H.H. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* **1979**; 48: 346-355.
- Beutler B., Cerami A. Cachetin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol. Res.* **1986**; 5: 281-293.
- Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leukoc. Biol.* **2003**; 74: 479-484.
- Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C. Passive immunization against cachetin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* **1985**; 229(4716): 869-871.
- Bigatello L.M., Broitman S.A., Fattori L., Di Padi M., Pontello M., Bevilacqua G., Nespoli A. Endotoxemia, encephalopathy, and mortality in cirrhotic patients. *Am. J. Gastroenterol.* **1987**; 82: 11-15.
- Bird A.R., Croom W.J., Jr., Fan Y.K., Daniel L. R., Black B.L., McBride B.W., Eisen E.J., Bull L.S., Taylor I.L. Jejunal glucose absorption is enhanced by epidermal growth factor in mice. *J. Nutr.* **1994**; 124(2): 231-240.
- Blanchard D.C., Blanchard R.J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1990**; 14: 455-462.
- Blanchard D.C., Blanchard R.J., Rodgers R.J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: "Animal models in psychopharmacology. Advances in pharmacological sciences". Olivier B., Mas J. and Slangen J.L. (eds). Boston, Birkhauser Verlag Basel, **1991**, pp. 117-134.
- Blanchard D.C., Sakai R.R., McEwen B., Weiss S.M., Blanchard R.J. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav. Brain Res.* **1993**; 58(1-2): 113-121.
- Blanchard D.C., Spencer R.L., Weiss S.M., Blanchard R.J., McEwen B., Sakai R.R. Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. *Psychoneuroendocrinology.* **1995**; 20: 117-134.
- Blanchard R.J., McKittrick C.R., Blanchard D.C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* **2001**; 73: 261-271.
- Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* **2001**; 411: 355-365.
- Bohus B., Koolhaas J.M. Stress and the cardiovascular system: central and peripheral physiological mechanism. In: "Stress: from synapse to syndrome". Stanford S.C. and Salmon P. (eds). San Diego. Academic Press, **1993**, pp. 75-117.
- Bohus B., Koolhaas J.M., Heijnen C.J., de Boer O. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology.* **1993**; 28: 95-99.
- Bohus B., Koolhaas J.M., Korte S.M. Psychosocial stress, anxiety and depression: physiological and neuroendocrine correlated in animal models. In: "Stress and related disorders from adaptation to dysfunction". Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F. and Martignoni E. (eds). Pearl City, NY: The Parthenon Publishing Group. **1990**.
- Bollen M., Keppens S., Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* **1998**; 336: 19-31.

- Bonfini L., Migliaccio E., Pelicci G., Lanfrancone L., Pelicci P. Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem. Sci.* **1996**; 21: 257-261.
- Boulougouris P., Elder J.B. Epidermal growth factor receptor and transformation. *Surg. Today.* **2002**; 32: 667-671.
- Boumpas D.T., Chrousos G.P., Wilder R.L., Cupps T.R., Balow J.E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* **1993**; 119(12): 1198-1208.
- Bowers G., Reardon D., Hewitt T., Dent P., Mikkelsen R.B., Valerie K., Lammering G., Amir C., Schmidt-Ullrich R.K. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene.* **2001**; 20: 1388-1397.
- Bradham C.A., Plümpe J., Manns M.P., Brenner D.A., Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1998**; 275(3 Pt 1): G387- G392.
- Brain P.F., Haug M., Parmigiani S. The aggressive female rodent: redressing a "scientific" bias. In: "Of mice and women. Aspects of female aggression", Bjorkquist K. and Niemela P. (eds). London: Academic Press, **1992**, pp. 27-36.
- Breslau N., Davis G.C., Andreski P., Peterson E.L., Schultz L.R. Sex differences in posttraumatic stress disorder. *Arch. Gen. Psychiatry.* **1997**; 54: 1044-1048.
- Brocheriou V., Hagege A.A., Oubenaissa A., Lambert M., Mallet V.O., Duriez M., Wassef M., Kahn A., Menasehe P., Gilgenkrantz H. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J. Gene Med.* **2000**; 2(5): 326-333.
- Brody T.M., Calvert D.N., Schneider A.F. Alterations of carbon tetrachloride-induced pathologic changes in the rat by spinal transection, adrenalectomy and adrenergic blocking agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1961**; 131: 341-345.
- Bronson F.H. Establishment of social rank among grouped male mice: relative effects on circulating FSH, LH and corticosterone. *Physiol. Behav.* **1973**; 10: 947-1051.
- Brown G.L., Ebert M.H., Goyer P.F., Jimerson D.C., Klein W.J., Bunney W.E., Goodwin F.K. Aggression, suicide, and serotonin: relationships to CSF amine metabolites. *Am. J. Psychiatry.* **1982**; 139(6): 741-746.
- Brown G.W. The role of life events in the aetiology of depressive and anxiety disorders. In: "Stress: from synapse to syndrome". Stannford S. and Samon P. (eds). London: Academic Press, **1993**, pp. 23-50.
- Bugajski J. Social stress. In: "Encyclopedia of Stress". Fink G. (ed). Academic Press, **2000**, pp. 474-478.
- Buira i col., 2004
- Buira I. Efecte de la sialoadenectomia sobre la dinàmica cel·lular hepàtica en el ratolí. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **2001**.
- Burwen S.J., Barker M.E., Goldman I.S., Hradek G.T., Raper S.E., Jones A.L. Transport of epidermal growth factor by rat liver: evidence for a nonlysosomal pathway. *J. Cell. Biol.* **1984**; 99: 1259-1265.
- Busse D., Doughty R.S., Ramsey T.T., Russell W.E., Price J.O., Flanagan W.H., Shawver L.K., Arteaga C.L. Reversible G₁ arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor tyrosine kinase requires up-regulation of p27^{KIP1} independent of MAPK activity. *J. Biol. Chem.* **2000**; 275: 6987-6995.
- Byyny R.L., Orth D.N., Cohen S., Doayne E.S. Epidermal growth factor: effects of androgen and adrenergic agents. *Endocrinology.* **1974**; 95(3): 776-782.

C.

- Camargo C.A., Madden J.F., Gao W., Selvan R.S., Clavien P.A. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. **1997**; 26: 1513-1520.
- Cannon W.B. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. **1929**. New York. Apleton.
- Cannon W.B. The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *Am. J. Physiol.* **1914**; 25: 256-282.
- Cannon W.B., De la Paz D. Emotional stimulation of adrenal secretion. *Am. J. Physiol.* **1911**; 28: 64-70.
- Carasso R., Yehuda S., Ben-uriah Y. Personality type, life events and sudden cerebrovascular attack. *Int. J. Neurosci.* **1981**; 14(3-4): 223-225.
- Caroff M., Karibian D., Cavaillan J.M., Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **2002**; 4: 915-926.
- Carpenter G, Walh M.I. The epidermal growth factor family. In: "Peptide growth factors and their receptors I". Sporn M.B., Roberts A.B. (eds). Berlin: Springer-Verlag, **1990**, pp. 69-171.
- Carpenter G. ErbB-4: mechanism of activation and biology. *Exp. Cell Res.* **2003**; 284: 66-77.
- Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signalling. *Bioessays*. **2000**; 22: 697-707.
- Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**; 48: 193-216.
- Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **1990**; 265: 7709-7712.
- Carpenter G., Zenguei J.G. Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp. Cell Res.* **1986**; 164: 1-10.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1975**; 72: 3666-3670.
- Carver R.S., Mathew P.M., Russell W.E. Hepatic expression of ErbB is repressed by insulin in a pathway sensitive to PI-3 kinase inhibitors. *Endocrinology*. **1997**; 19: 2501-2503.
- Carver R.S., Sliwkowski M.X., Sitaric S., Russell W.E. Insulin regulates heregulin binding and ErbB3 expression in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271: 13491-13496.
- Carver R.S., Stevenson M.C., Scheving L.A., Russell W.E. Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology*. **2002**; 123: 2017-2027.
- Cato A.C.B., Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*. **1996**; 18: 371-378.
- Chagnon F., Metz C.N., Bucala R., Lesur O. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ. Res.* **2005**; 96(10): 1095-1102.
- Chang C., Sternberg P.W. C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signalling. *Cancer Metastasis Rev.* **1999**; 18: 203-213.

Charmandari E., Tsigos C. Chrousos G.P. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* **2005**; 67: 259-284.

Chen J. Effects of EGF, anti-EGF and anti-EGFR antibodies on the growth of human cancer cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuen Xue Bao.* **1992**; 14(4): 289-294.

Cho J.Y., Yeon J.D., Kim J.Y., Yoo E. S., Yu Y.H., Park M.H. Hepatoprotection by human Epidermal Growth Factor (hEGF) against experimental hepatitis induced by D-Galactosamine (D-GalN) or D-GalN/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**; 23(10): 1243-1246.

Chow J.C., Young D.W., Golenbock D.T., Christ W.J., Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 10689-10692.

Chrousos G. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* **1995**; 332(20): 1351- 1362.

Chung I.Y., Benveniste E.N. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J. Immunol.* **1990**; 144(8): 2999-3007.

Citri A., Skaria K.B., Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp. Cell Res.* **2003**; 284: 54-65.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **1962**; 237: 1555-1562.

Cohen S. Purification of a nerve-factor promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1960**; 46: 302-311.

Cohen S., Elliot G. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **1963**; 40: 1-5.

Conricode K.M., Ochs R.S. Epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulate lactate production and the pentose phosphate pathway in freshly isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1990**; 265: 20931-20937.

Countaway J.L., Nairn A.C., Davis R.J. Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **1992**; 267: 1129-1140.

Cruickshank J.M. Beta-blockers, plasma lipids, and coronary heart disease. *Circulation.* **1980**; 82: 60-65.

Cullinan W.E., Herman J.P. Battaglia D.F. Akil H., Watson S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neurosci.* **1995**; 64: 477-505.

Czaja M.J., Xu J., Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumour necrosis factor receptor. *Gastroenterology.* **1995**; 108: 1849-1854.

Czaja M.J., Xu J., Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology.* **1995**; 108(6): 1849-1854.

D.

Dal Zotto S. Efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés: relación con la adaptación al estrés crónico y factores implicados. Universidad Autónoma de Barcelona. **2002**.

- Dal Zotto S., Marti O., Armario A. Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav. Brain Res.* **2002**; 129(1-2): 187-195.
- Dallman M.F. Stress update. Adaptation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol. Metab.* **1993**; 4: 62-69.
- Dallman M.F., Bhatnagar S., Viau V. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis. In: "Encyclopedia of Stress". Fink G. (ed). Academic Press, **2000**, pp. 468-477.
- Damjanov I., Milder B., Knowless B.B. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab. Invest.* **1986**; 55: 588 – 592.
- Danielsen A.J., Maihle N.J. The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. *Growth factors.* **2002**; 20(1): 1-15.
- Daun J.M., Fenton M.J. Interleukin-1/Toll receptor family members: receptor structure and signal transduction pathways. *J. Interferon Cytokine Res.* **2000**; 20(10): 843-855.
- Davis R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268: 14553-14556.
- De Boer S.F., Koopmans S.J., Slagen J.L., Van der Gughten J. Plasma catecholamines, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol. Behav.* **1990**; 47(6): 1117-1124.
- de Groot J., van Milligen F.J., Moonen-Leusen B.W.M., Thomas G., Koolhaas J.M. A single social defeat transiently suppresses the anti-viral immune response in mice. *J. Neuroimmunol.* **1999**; 95: 143-151.
- De Kloet E.R., Oitzl M.S., Joëls M. Functional implications of brain corticosteroids receptor diversity. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1993**; 13: 433-455.
- Deaciuc I.V., D'Souza N.B., Burikhanov R., Lee E.Y., Tarba C.N., McClain C.J., de Villiers W.J.S. Epidermal growth factor protects the liver against alcohol-induced injury and sensitization to bacterial lipopolysaccharide. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2002**; 26(6): 864-874.
- DeTurck K.H., Vogel W.H. Factors influencing plasma catecholamine levels in rats during immobilization. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1980**; 13: 129-131.
- DeVries A.C., Joh H.D., Bernard O., Hattari K., Hurn P.D., Traystman R.J., Alkayed N.J. Social stress exacerbates stroke outcome by suppressing Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**; 98(20): 11824-11828.
- Dhabhar F.S., McEwen B.S., Spencer R.L. Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology.* **1997**; 65(5): 360-368.
- Dijkstra H., Tilders F.J.H., Hiehle M.A., Smelik P.G., Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defence, not during offence. *Physiol. Behav.* **1992**; 51: 961-968.
- Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation of cell function. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**; 31: 1178-1181.
- Dinarello C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **1991**; 77: 1627-1652.
- Ding W.X., Ying X.M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. *J. Cell. Mol. Med.* **2004**; 8(4): 445-454.

Downing S.E., Chen V. Miocardial injury following endogenous catecholamines release in rabbits. *J. Mol. Cell Cardiol.* **1985**; 17: 377-387.

Dreux A.C., Lamb D.J., Modjtahedi H., Ferns G.A.A. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* **2006**. 186(1): 38-53.

E.

Eisenberg S.P., Evans R.J., Arend W.P., Verderber E., Brewer M.T., Hannum C.H., Thompson R.C. Primary structure and functional expression from complimentary DNA of a known interleukin-1 receptor antagonist. *Nature.* **1990**; 343: 341-346.

Elenkov I.J., Wilder R.L., Chrousos G.P., Vizi E. S.. The symphathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain an the immune system. *Pharmacol. Rev.* **2000**; 52: 595-638.

Ely D.L., Henry J.P. Neuroendocrine response patterns in dominant and subordinate mice. *Horm. Behav.* **1978**; 10(2): 156-169.

Endo Y., Shibazaki M., Yamaguchi K., Kai K., Sugawara S., Takada H., Kukuchi H., Kumagai K. Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide (LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. *Br. J. Pharmacol.* **1999**; 128(1): 5-12.

Erickson S.L., O'Shea K.S., Ghaboosi N., Loverro L., Frantz G., Bauer M., Lu L.H., Moore M.W. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: comparison with ErbB-2 and heregulin-deficient mice. *Development.* **1997**; 124: 4999-5011.

F.

Fausto N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* **2000**; 32(suppl 1): 19-31.

Fausto N., Laird A.D., Webber E.M. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* **1995**; 9: 1527-1536.

Fearns C., Kravchenko V.V., Ulevitch R.J., Loskutoff D.J. Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* **1995**; 181(3): 857-866.

Ferguson K.M., Berger M.B., Mendrola J.M., Cho H.S., Leahy D.J., Lemmon M.A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell.* **2003**; 11: 507-517.

Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J.* **1991**; 5: 2567-2571.

Fernández-Varó G., Mena M.P., Arnau A., Sánchez O., Soley M., Ramírez I. Immobilization stress induces c-Fos accumulation in liver. *Cell Stress Chaperones.* **2000**; 5(4): 306-312.

Fisher D.A., Lakshmanan J. Metalolism and effects of epidermal growth factor and related growth factor in mammals. *Endocrine Rev.* **1990**; 1: 418-442.

Fitzgerald K.A., Palsson-McDermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **2001**; 413: 78-83.

Flannelly K.J., Blanchard R.J., Muraoka M.Y., Flannelly L. Copulation increases offensive attack in male rats. *Physiol. Behav.* **1982**; 29(2): 381-385.

Fleshner M., Laudenslager M.L., Simons L., Maier S.F. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *Physiol. Behav.* **1989**; 45: 1183-1187.

Fox E.S., Thomas P., Broitmans A. Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modifications of ^3H , ^{14}C -lipopolysaccharide by isolated kupffer cells. *Gastroenterology.* **1989**; 96: 456-461.

Frank D.E., Ahrens F.A., Kramer T.T. Cytokine release by porcine liver perfused with lipopolysaccharide or live *Salmonella choleraesuis*. *Am. J. Vet. Res.* **1996**; 57(4): 472-476.

Freudenberg M.A., Merlin T., Gumenscheimer M., Kalis C., Landmann R., Galanos C. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella Typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of gram-negative bacteria. *Microbes Infect.* **2001**; 3(14-15): 1213-1222.

Friberger P., Knos M., Mellstam, L. A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1982**; 93:195-206.

Fukazawa R., Miller T.A., Kuromochi Y., Frantz S., Kim Y.D., Marchionni M.A., Kelly R. A., Sawyer D.B. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2003**; 35: 1473-1479.

G.

Galan, F. Mecanisme de regulació de la lipasa hepàtica. Universitat de Barcelona. **1996**.

Galcheva-Gargova Z., Konstantinov K.N., Wu I.H., Klier F.G., Barret T., Davis R.J. Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor. *Science.* **1996**; 272: 1797-1802.

García S.J. Alpha 1-adrenergic action: receptor subtypes, signal transduction and regulation. *Cell. Signal.* **1993**; 5: 539-547.

Garnefski N., van Egmond M., Stroatman A. The influence of early and recent life stress on severity of depression. *Acta Psychiatr. Scand.* **1990**; 81: 3295-3302.

Gassmann M., Casagrande F., Orioli D., Simon H., Lai C., Klein R., Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the erbB4 neuregulin receptor. *Nature.* **1995**; 378: 390-394.

George L.K., Blazer D.G., Hughes D.C. Fowler N. Social support and the outcome of major depression. *Br. J. Psychiatry.* **1989**; 154: 478-485.

Gloor B., Todd K.E., Lane J.S. Hepatic kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J. Gastrointest. Surg.* **1998**; 2: 430-435.

Goldfield A.E., Strominger J.L., Doyle C. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J. Exp. Med.* **1991**; 174: 73-81.

Goldstein D.S. Catecholamines and stress. *Endocr. Regul.* **2003**; 37(2): 69-80.

Goto M., Zeller W.P., Lichtenberg R.C. Decreased gluconeogenesis and increased glucose disposal without hyperinsulinemia. *Metabolism.* **1994**; 43(10): 1248-1254.

Grans-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M., Hynes N.E. ErbB2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J.* **1997**; 16: 1647-1655.

Grau M. Paper del factor de creixement epidèrmic en el fetge. Interacció amb les catecolamines. Universitat de Barcelona. **1996**.

Grau M., Rodríguez C., Soley M., Ramírez I. Relationship between epidermal growth factor in mouse submandibular glands, plasma and bile: effects of catecholamines and fasting. *Endocrinology*. **1994**; 135: 1854-1862.

Grau M., Soley M., Ramírez I. Interaction between adrenaline and epidermal growth factor in the control of liver glycogenolysis. *Endocrinology*. **1997**; 138: 2601-2609.

Grau M., Soley M., Ramírez I. Interaction between adrenaline and epidermal growth factor in the control of liver glycogenolysis in mouse. *Endocrinology*. **1997**; 138: 2601-2609.

Grau M., Tebar F., Ramírez I., Soley M. Epidermal growth factor administration decreases liver glycogen and causes mild hyperglycaemia in mice. *Biochem. J*. **1996**; 315: 289-293.

Gray A., Dull T.J., Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature*. **1983**; 303: 722-725.

Grueters A., Alm J., Lakshmanan J., Fisher D.A. Epidermal growth factor in mouse milk during early lactation: lack of dependency on submandibular glands. *Pediatr. Res*. **1985**; 19: 853-856.

Gunnar M.R., Connors J., Isensee J. Lack of stability in neonatal adrenocortical reactivity because of rapid habituation of the adrenocortical response. *Dev. Psychobiol*. **1989**; 22(3): 21-233.

H.

Haemish A., Gärtner K. Dissociation between adrenal Tyrosinehydroxylase and Phenylethanolamine N-Methyltransferase activities following repeated experience of defeats in individually housed male DBA/2J mice. *Physiol. Behav*. **1996**; 59: 1117-1122.

Halbreich V. Hormones and depression. **1987**. New York. Raven Press

Haller J., Fuchs E., Halász J., Makara G.B. Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Res. Bull*. **1999**; 50(1): 33-39.

Ham A., Corak D. Tratado de histología. **1988**. Editorial Salvat (3ª edició).

Han D.W. Intestinal endotoxemia as pathogenetic mechanism in liver failure. *World J. Gastroenterol*. **2002**; 8(6): 961-965.

Hardgrove D.M., Bagby G.J., Lang C.H., Spitzer J.J. Adrenergic blockade prevents endotoxin-induced increases in glucose metabolism. *Am. J. Physiol*. **1988**; 255(5Pt1): E629-E635.

Hardonk M.J., Dijkhuis F.W., Hulstaert C.E., Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J. Leukoc. Biol*. **1992**; 52(3): 296-302.

Harmsen P., Rosengren A., Tsiopogianni A., Wilhelmsen L. Risk factors for stroke in middle-aged men in Goteborg, Sweden. *Stroke*. **1990**; 21(2): 223-229.

Haystead T.A.J., Hardie D.G. Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-Coa carboxylase activity in isolated adipocytes. Importance of homogeneity procedure in avoiding artefacts in acetyl-CoA carboxylase assay. *Biochem. J*. **1986**; 234: 279-284.

- Heaney M.L., Golde D.W. Soluble cytokine receptors. *Blood*. **1996**; 87: 847-857.
- Henderson, A.R. Lactate dehydrogenase, isoenzymes. LDH-1(2-Hydroxybutyrate Dehydrogenase), uv-assay. In: "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. and Grassl M (eds). Weinheim: Verlag Chemie, **1984**, III 150- III 156.
- Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **2004**; 59(2 Suppl): 21-26.
- Herbst R.S., Shin D.M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*. **2002**; 94: 1593-1611.
- Herman J.P., Cullinan W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* **1997**; 20(2): 78-84.
- Hilakivi-Clarke L., Arora K., Sabol M., Clarke R., Dickson B., Lippman M. Alterations in behavior, steroid hormones and natural killer cell activity in male transgenic TGF-alpha in mice. *Brain Res.* **1992**; 588: 97-103.
- Hilarie R.J.S., Hradek G.T., Jones A.L. Hepatic sequestration and biliary secretion of epidermal growth factor: evidence for a high-capacity uptake system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**; 80: 3797-3801.
- Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* **1998**; 16: 249-284.
- Hirschfeld M., Ma Y., Weis J.H., Vogel S.N., Weis J.J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **2000**; 165: 618-622.
- Hishinuma I., Nagakawa J., Hirota K., Miyamoto K., Tsukidate K., Yamanaka T., Katayama K., Yamatsu I. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in development of hepatic injury in galactosamine-sensitized mice. *Hepatology*. **1990**; 12(5): 1187-1191.
- Hoek J.B., Pastorino J.G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. **2002**; 27(1): 63-68.
- Holbro T., Hynes N.E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**; 44: 195-217.
- Holland R., Hardie D.G. Both insulin and epidermal growth factor stimulate fatty acid synthesis and increase phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase and ATP-citrate lyase in isolated hepatocytes. *FEBS Lett.* **1985**; 181: 308- 312.
- Holm C., Osterlund T., Laurell H., Contreras J.A. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* **2000**; 20: 365-393.
- Hom Y.K., Young P., Wiesen J.F., Miettinen P.J., Derynck R., Werb Z., Cunha G.R. Uterine and vaginal organ growth requires epidermal growth factor receptor signaling from stroma. *Endocrinology*. **1998**; 139(3): 913-921.
- Horder M., Rej R. Alanine aminotransferase (Glutamate Pyruvate Transaminase). In: "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. and Grassl M (eds). Weinheim: Verlag Chemie, **1984**, III 444- III 450.
- Hori M., Sato H., Kitakaze M., Iwai K., Takeda H., Inoue M., Kamada T. Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca²⁺ overload. *Circ. Res.* **1994**; 75(2): 324-334.

Hornig T., Barton G.M., Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immun.* **2001**; 2: 835-841.

House A., Dennis M., Mogridge L., Hawton K., Warlow C. J. Life events and difficulties preceding stroke. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **1990**; 53(12): 1024-1028.

I.

Imuro Y., Gallucci R.M., Luster M.I., Kono H., Thurman R.G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology.* **1997**; 26: 1530-1537.

Iwai M., Cui T-X, Kitamura H., Saito M., Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine.* **2001**; 13(1): 60-64.

J.

Jacobson J.R., Barnard J.W., Grigoryev D.N., Ma S.F., Tuder R.M., Garcia J.G.N. Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2005**; 288: L1026-L1032.

Jaeschke H., Fisher M.A., Lawson J.A., Simmons C.A., Farhood A., Jones D.A. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine shock model. *J. Immunol.* **1998**; 160: 3480-3486.

Jansson T., Skarland H. Maternally administered epidermal growth factor stimulates fetal growth in the rat. *Acta Physiol. Scand.* **1990**; 138: 245-246.

Jaumaat M.L., Giaccone G. Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *The oncologist.* **2003**; 8: 576-586.

Jirillo E., Caccavo D., Magrone T., Piccigallo E., Amati L., Lembo A., Kalis C., Gumenscheimer M. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res.* **2002**; 8: 319-327.

Johnson E.O., Kamilaris G.P., Chrousos G.P., Gold P.W. Mechanism of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1992**; 16: 115-130.

Johnson J.D., O'Connor K.A., Deak T., Stark M., Watkins L.R., Maier S.F. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav. Immun.* **2002**; 16: 461-476.

Johnson M.L., Billiar T.R. Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis. *World J. Surg.* **1998**; 22: 187-196.

Johnson R.M., Connelly P.A., Sisk R.B., Pobiner B.F., Hewlett E.L. Garrison J.C. Pertussis toxin or phorbol 12-myristate 13-acetate can distinguish between epidermal growth factor- and angiotensin-stimulated signals in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**; 83(7): 2032-2036.

Johnson R.M., Garrison J.C. Epidermal growth factor and angiotensin II stimulate formation of inositol 1,4,5- and inositol 1,3,4-trisphosphate in hepatocytes. Differential inhibition by pertussis toxin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* **1987**; 262(36): 17285-17293.

Jorinssen R.N., Walker F.W., Pouliot N., Garret T.P.J., Ward C.W., Burgess A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanism of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **2003**; 284: 31-53.

Jungermann K., Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev.* **1989**; 69: 708-764.

K.

Kapcala L.P., Chautard T., Eskay R.L. The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**; 771: 419-437.

Kaplan M.H., Wheeler W.F. Stress and diseases of the upper gut. I. Stress and liver disease. *Mt. Sinai. J. Med.* **1983**; 50: 225-227.

Kasayama S., Ohba Y., Oka T. Epidermal growth factor deficiency associated with diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989a**; 86: 7644-7648.

Kasayama S., Yoshimura M., Oka T. Decreased expression of hepatic epidermal growth factor receptor gene in diabetic mice. *J. Mol. Endocrinol.* **1996**; 3: 49-59.

Kasayama S., Yoshimura M., Oka T. The regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthesis in the submandibular gland and its plasma concentrations in mice. *J. Endocrinol.* **1989b**; 121: 269-275.

Keane K.M., Giegel D.A., Lipinski W.J., Callahan M.J., Shivers B.D. Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin 1 β converting enzyme. *Cytokine.* **1995**; 7: 105-110.

Keppler D., Decker K. Glycogen. In: "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. and Grassl M (eds). Weinheim: Verlag Chemie, **1984**, VI 11- VI 18.

Kim D.C., Hanano M., Sawada Y., Iga T., Sugiyama Y. Kinetic analysis of clearance of epidermal growth factor in isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* **1991**; 261: F988-F997.

Kino T., Chrousos G.P. Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J. Endocrinol.* **2001**; 169: 437-445.

Kirschning C.J., Wesche H., Merrill Ayres T., Rothe M. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **1998**; 188: 2091-2097.

Kiso S., Kawata S., Tamura S., Inui Y., Yoshida Y., Sawai Y., Umeki S., Ito N., Yamada A., Miyagawa J., Higashiyama S., Iwawaki T., Saito M., Taniguchi N., Matsuzawa Y., Kohno K. Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology.* **2003**; 124: 701-707.

Kitamura H., Konno A., Morimatsu M., Jung B.D., Kimura K., Saito M. Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**; 238: 707-711.

Klebanoff S.J., Vadas M.A., Harlan J.M., Sparks L.H., Gamble J.R., Agosti J.M., Waltersdroph A.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **1986**; 136(11): 4420-4425.

Kochupurakkal B.S., Harari D., Di-Segni A., Maik-Rachline G., Lyass L., Gur G., Kerber G., Citri A., Lavi S., Eilam R., Chalifa-Caspi V., Eshhar Z., Pikarsky E., Pinkas-Kramarski R., Baccus S.S., Yarden Y. Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity. *J. Biol. Chem.* **2005**; 280(9): 8503-8512.

Koniaris L.G., McKillop I.H., Schwartz S.I., Zimmers T.A. Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* **2003**; 197: 634-659.

- Kono H., Uesugi T., Froh M., Rusyn I., Bradford B.U., Thurman R.G. ICAM-1 is involved in the mechanism of alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**; 280: G1289-G1295.
- Kono H., Wheeler M.D., Rusyn I., Lin M., Seabra V., Rivera C.A., Bradford B.U., Forman D.T., Thurman R.G. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF- κ B, and TNF- α . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**; 278: G652-G661.
- Konturek S.J., Brozozowski t., Konturek P.K., Majka J., Dembinski A. Role of salivary glands and epidermal growth factor (EGF) in gastric secretion and mucosal integrity in rats exposed to stress. *Regul. Peptides.* **1991**; 32: 203-215.
- Koolhaas J.M., De Boer S.F., De Rutter A.J., Meerlo P., Sgoifo A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **1997**; 640: 69-72.
- Koolhaas J.M., Fokkema D.S., Bohus V., van Oortmerseen G.A. Individual differences in blood pressure reactivity and behavior in male rats. In: "Biological and psychological factors in cardiovascular disease". Schmidt T.H., Dembrosk T.M. and Blumchen G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, **1986**, pp. 515-526.
- Koolhaas J.M., Meerlo P., De Boer S.F., Strubbe J.M., Bohus B. Social stress in rats: an animal model of depression? *Acta Neuropsychiatrica.* **1995**; 7: 27-29.
- Kopin I.J. Definitions of stress and symphathetic neuronal responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**; 771: 19-30.
- Kosai K.I., Matsumoto K., Funakoshi H., Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology.* **1999**; 30(1): 151-159.
- Kovacs K.J., Elenkov I.J. Differential dependence of ACTH secretion induced by various cytokines on the integrity of the paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **1995**; 7: 15-23.
- Kozak W., Kluger M.J., Saszynski D., Conn C.A., Rudolph K., Lean L.R., Zheng H. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**; 856: 33-47.
- Kramer A., Yang F., Snodgrass P., Li X., Scammell T.E., Davis F.C., Weitz C.J. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signalling. *Science.* **2001**; 294: 2511-2515.
- Krawisz J.E., Sharon P., Stenson W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* **1984**; 87: 1344-1350.
- Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **2000**; 6: 513-519.
- Kudryavtseva N.N., Bakshtanovskaya I.V., Karyakina L.A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1991**; 38(2): 315-320.
- Kurachi H., Adachi H., Ohtsuka S., Morishige K.I., Amemiya K., Keno Y., Shimomura I., Tokunaga K., Miyake A. Involvement of epidermal growth factor in inducing obesity in ovariectomized mice. *Am. J. Physiol.* **1993**; 265(2 Pt 1): E323-E331.
- Kuriyan J., Cowburn D. Modular peptide recognition domains in eukarotic signalling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**; 26: 259-288.
- Kvetňanský R., McCarty R. Immobilization stress. In: "Encyclopedia of stress". Fink G. (ed.). Academic Press, **2000**, pp. 503-506.

Kvetnansky R., Nemeth S., Vigas M., Oprsalova Z., Jurcovicova J. Plasma catecholamines in rats during adaptation to intermittent exposure to different stressors. *In*: "Stress: the role of catecholamines and other neurotransmitters". Usdin E., Kvetnansky R. And Axelrold J. (eds). New York: Gordon and Breach, **1984**, pp. 537-562.

Kwon A.H., Qiu Z., Nagahama H., Kaibori M., Kamiyama Y. Fibronectin suppresses apoptosis and protects mice from endotoxic shock. *Transplant. Proc.* **2004**; 36: 2432-2435.

L.

Lakshmanan J. Aggressive behavior in adult male mice elevates serum nerve growth factor levels. *Am. J. Physiol.* **1986**; 250: E386-E392.

Lang C.H., Spolarics Z., Ottlakan A., Spitzer J.J. Effect of high-dose endotoxin on glucose production and utilization. *Metabolism.* **1993**; 42(10): 1351-1358.

Lax I., Bellot F., Howk R., Ullrich A., Givol D., Schlessinger J. Funcional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J.* **1989**; 8: 421-427.

Lax I., Burguess W.H., Bellot F., Ullrich A., Schlessinger J., Givot D. Localization of a major receptor-domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Mol. Cell Res.* **1988**; 8: 1831-1834.

Lee J., Mira-Arbibe L., Ulevitch R.J. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* **2000**; 68: 909-915.

Lee K.F., Simon H., Chen H., Bates B., Hung M.C., Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* **1995**; 378: 394-398.

Leist M., Auer-Barth S., Wendel A. Tumor necrosis factor production in the perfused mouse liver and its pharmacological modulation by methylxantines. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **1996**; 276 (3): 968-976.

Leslie P., Gartner J., Hitt L. *Histologia texto y atlas.* **1997**. Editorial McGraw-Hill (1ª edició).

Levitzi A., Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* **1995**; 267; 1782-1788.

Li N., Batzer A., Daly R., Yajnik V., Skolnik E., Chardin P., Bar-Sagi D., Margolis B., Schlessinger J. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinase to Ras signalling. *Nature.* **1993**; 363(6424): 85-88.

Li X., Klintman D., Liu Q, Sato T., Jeppsson B., Thorlacijs H. Critical role of CXC chemokines in endotoxemic liver injury in mice. *J Leukoc. Biol.* **2004a**; 75: 443-452.

Li X., Klintman D., Sato T., Hedlund G., Schramm R., Jeppsson B, Thorlacijs H. Interleukin-10 mediates the protective effect of Linomide by reducing CXC chemokine production in endotoxin-induced liver injury. *Br. J. Pharmacol.* **2004b**; 143: 865-871.

Liao J., Keiser J.A., Scales W.E., Kunkel S.L., Kluger M.J. Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* **1995**; 268 (3 Pt 2): R699-706.

Lidauet L., Murphy K.G.K., Mabley J.G., Pacher P., Soriano F.G., Salzman A.L., Szabo C. Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* Serovar Muenchen Flagellin and Serovar Enteritidis Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **2002**; 70(1): 192-198.

Lin R.S., Lee F.Y., Lee S.D., Tsai Y.T., Lin H.C., Lu H.C., Hsu W.C., Huang C.C., Wang S.S., Lo K.J. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices and hyperdynamic circulation. *J. Hepatol.* **1995**; 22: 165-172.

Liu S., Khemlani L.S., Shapiro R.A., Johnson M.L., Liu K., Geller D.A., Watkins S.C., Goyert S.M., Billiar T.R. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokine during endotoxemia. *Infect. Immunol.* **1998**; 66(11): 5089-5098.

Lorita J., Escalona N., Faraudo S., Soley M., Ramírez I. Effects of epidermal growth factor on epinephrine-stimulated heart function in rodents. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**; 283: H1887-H1895.

Lortie M.J., Satriana J., Gabbai F.B., Tharean S., Khang S., Deng A., Pizzo D.P., Thompson S.C., Blantz R.C., Munger K.A. Production of arginine by kidney is impaired in a model of sepsis: early events following LPS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**; 287: R1434-R1440.

Lowy M.T. Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Res.* **1989**; 503: 191-197.

Luger A., Calogero A.E., Kalogeras K., Gallucci W.T., Gold P.W., Loriaux D.L., Chrousos G.P. Interaction of epidermal growth factor with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: potential physiologic relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1988**; 66:334-337.

Lundberg U. Catecholamines. In: "Encyclopedia of Stress". Fink G. (ed). Academic Press, **2000**, pp. 408-413.

Luster M.I., Germolec D.R., Yoshida T., Kayama F., Thompson M. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology.* **1994**; 480-488.

Lutgemeier I., Luft F.C., Unger T., Ganten U., Lang R.E., Gless K.H., Ganten D. Blood pressure, electrolyte and adrenal responses in swim-trained hypertensive rats. *J. Hypertens.* **1987**; 5: 241-247.

Lyte M., Nelson S.G., Baissa B. Examination of the neuroendocrine basis for the social conflict-induced enhancement of immunity in mice. *Physiol. Behav.* **1990**; 48: 685-691.

M.

Ma W., Lim W., Gee K., Aucoin S., Nandan D., Kozlowski M., Diaz-Mitoma F., Kumar A. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J. Biol. Chem.* **2001**; 276(17): 13664-13674.

Ma X.M., Lighthman S.L. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J. Physiol. (Lond).* **1998**; 510(Pt1): 605-614.

Maier S.F., Goehler L.E., Fleshner M., Watkins L.R. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1998**; 840: 289-300.

Mamat U., Seydel U., Grimmecke D., Holst O., Rietschel Th. E. In: "Comprehensive Natural Products Chemistry". Barton D. and Nakanishi K. (eds). Elsevier, Amsterdam, **1999**, pp. 179-239.

Martí O., Armario A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **1998**; 16: 241-260.

Marti U., Burwen S.J., Jones A.L. Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology.* **1989**; 9:126-138.

- Martínez M., Calvo-Torrent A., Pico-Alfonso M.A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggr. Behav.* **1998b**; 24: 241-256.
- Martínez M., Phillips P.J., Herbert J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur.J. Neurosci.* **1998a**; 10(1): 20-33.
- Mathison J.C., Ulevitch R.J. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J. Immunol.* **1979**; 123: 2133-2143.
- Matsuoka N., Arakawa H., Kodama H., Yamaguchi I. Characterization of stress-induced sudden death in cardiomyopathic hamsters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**; 284: 125-135.
- Matte A.C. Effect of isolation induced aggression in mice on serum creatine kinase. *Physhoparmacologia.* **1975**; 42(2): 209-210.
- Mazzoni I.E., Kenigsberg R.L. Effects of epidermal growth factor in the mammalian central nervous system – its possible implication in brain pathologies and therapeutic applications. *Drug Develop. Res.* **1992**; 26:111-128.
- McCarty R., Konarska M., Stewart R.E. Adaptation to stress: a learned response? In: “Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches”. Kvetnansky R., McCarty R. and Axelrod J. (eds). Gordon and Breach Science Publishers, New York, **1992**, pp.171-179.
- McEwen B.S. Stress, definitions and concepts of. In: “Encyclopedia of Stress”. Fink G. (ed). Academic Press, **2000**, pp. 508-509.
- Meddings J. B., Swain M.G. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology.* **2000**; 119: 1019-1028.
- Meehan W.P., Tornatzky W., Miczek K.A. Blood pressure via telemetry during social confrontations in rats: effects of clonidine. *Physiol. Behav.* **1995**; 58: 81-88.
- Meerlo P., Overkamp G.J.F., Daan S., den Hoofdakker R.H., Koolhaas J.M. Changes in behavior and body weight following a single or double social defeat in rats. *Stress.* **1996**; 1: 21-32.
- Meltzer H.Y. Plasma creatine phosphokinase activity, hypothermia and stress. *Am. J. Physiol.* **1971**; 221: 896-901.
- Mena, M.P. Efecte de l'estress per immobilització sobre la secreció del factor de creixement epidèrmic (EGF) per les glàndules submaxil·lars de ratolí. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **1999**.
- Mendelsohn J., Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene.* **2000**; 19: 6650-6655.
- Merlot E., Maze E., Dantzer R., Neveu P.J. Importance of fighting in the immune effects of social defeat. *Physiol. Behav.* **2003**; 80: 351-357.
- Michalopoulos G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* **1990**; 4: 176-187.
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science.* **1997**; 276: 60-66.
- Miettinen P.J., Berger J. E., Meneses J., Phung P., Pedersen R.A., Werb Z., Derynk R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature.* **1995**; 376:337-341.
- Mikulaj L., Mitro A. Endocrine functions during adaptation to stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1972**; 33: 631-648.

- Miller D.B., O'Callaghan J.P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*. **2002**; 51 (6 suppl 1): 5-10.
- Miller V.E., Rogers K., Muirden K.D. Detection of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilage-pannus junction by immunohistochemical methods. *Rheumatol. Int.* **1993**; 13(2): 77-82.
- Mineo C., Gill G.N., Anderson R.G.W. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J.Biol. Chem.* **1999**; 274: 30636-30643.
- Mohammad M.K., Morran M., Slotterbeck B., Leaman D.W., Sun Y.P., von Grafenstein H., Hong S.C., McInerney M.F. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int. Immunol.* **2006**; 18(7): 1101-1113.
- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1991**; 43: 109-142.
- Montaguti P., Melloni E., Cavalletti E. Acute intravenous toxicity of Dimethyl Sulfoxide, Polyethylene Glycol 400, Dimethylformamide, Absolute Ethanol, and Benzyl Alcohol in inbred mouse strains. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1994**; 44(I): 566-570.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L. O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**; 19: 683-665.
- Moore K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T.R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **1993**; 11: 165-190.
- Moore K.W., Vieira P., Fiorentino D.F., Trounstein M.L., Khan T.A., Mosmann T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1. *Science*. **1990**; 248: 1230-1234.
- Morikawa A., Kato Y., Sugiyama T., Koide N., Chakravorty D., Yoshida T., Yakachi T. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect. Immun.* **1999**; 67(3): 1018-1024.
- Morikawa A., Sugiyama T., Kato Y., Koide N., Jiang G., Takahashi K., Tamada Y., Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-Galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect. Immun.* **1996**; 64(3): 734-738.
- Mosmann T.R., Schumacher J., Fiorentino D.F., Leverah J., Moore K.W., Bond M.W. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL4, IL5, IL6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. *J. Immunol.* **1990**; **145**: 2938-2945.
- Mroczkowski B., Reich M., Chen K., Bell G.I., Cohen S. Recombinant human EGF precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol. Cell. Biol.* **1989**; 9: 2771-2778.
- Mullhaupt B., Feren A., Fodor E., Jones A. Liver expression of epidermal growth factor RNA. *J. Biol. Chem.* **1994**; 269: 19667-19670.
- Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **1984**; 5: 25-44.

N.

Nadeau S., Rivest S. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and NF- κ B activity in the brain during endotoxemia. *J. Neurosci.* **2000**; 20: 3456-3468.

Nagai Y., Akashi S., Nagafuku M., Ogata M., Iwakura Y., Akira S., Kitamura T., Kosugi A., Kimoto M., Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **2002**; 3: 667-672.

Nagaki M., Tanaka M., Sugiyama A., Ohnishi H., Moriwaki H. Interleukin-10 inhibits hepatic injury and tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA expression induced by staphylococcal enterotoxin B or lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *J. Hepatol.* **1999**; 31(5): 815-824.

Nakao A., Shinohara M. Changes of circulating blood endotoxin analyzed by quantitative assay after intravenous administration of endotoxin. *Jpn. J. Gastroenterol.* **1985**; 82: 296-300.

Nexo E., Hollenberg M.D., Bing J. Aggressive behaviour in mice provokes a marked increase in both plasma epidermal growth factor and renin. *Acta Physiol. Scand.* **1981**; 111: 367-371.

Noguchi S., Ohba Y., Oka T. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am. J. Physiol.* **1991**; 260(4 Pt 1): E620-E625.

Noguchi S., Ohba Y., Oka T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Endocrinol.* **1991**; 128: 425-431.

Nonogaki K., Iguchi A. Stress, acute hyperglycemia, and hiperlipidemia. Role of the autonomic nervous system and citoquines. *Trends Endocrinol. Metab.* **1997**; 8: 192-197.

Novogrodsky, A., Vanichkin A., Patya M., Gazit A., Osherov N., Levitzki A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science.* **1994**; 264: 1319-1322.

O.

Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J.H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* **2002**; 110(6): 507-517.

Okamoto O., Oka T. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: pregestational sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1984**; 81: 6059-6063.

Olayioye M.A., Benvink I., Horsch K., Daly J.M., Hynes N.E. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 17209-17218.

Olayioye M.A., Neve R.M., Lone H.A., Hynes N.E. The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **2000**; 19(13): 3159-3167.

Olsen P.S., Poulsen S.S., Kirkegaard P. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut.* **1985**; 26: 920-927.

Oohira A. Physiological significance of epidermal growth factor on fetal and placental development. *Journal of Tokio Women's Medical College.* **1991**; 61(7): 591-597.

Opleta K., O'Loughlin E.V., Shaffer E.A., Hayden J., Hollenberg M., Call D.G. Effect of epidermal growth factor on growth and postnatal development of the rabbit liver. *Am. J. Physiol.* **1987**; 253: G622-G626.

Ostman-Smith I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exposure or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **1979**; 477: 1-118.

P.

Padgett D.A., Sheridan J.F., Dorne J., Berntson G.G., Candelora J., Glaser R. Social stress and the reactivation of latent herpes simplex type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**; 95: 7231-7235.

Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci. BioBehav. Rev.* **2001**; 25(3): 219-233.

Palanza P., van Saal F.S., Parmigiani S. Male urinary cues stimulate intrasexual aggression and urine marking in wild female house mice, *Mus musculus domesticus*. *Anim. Behav.* **1994**; 48: 245-247.

Pareja M. Efecto del factor de crecimiento epidérmico sobre las lesiones celulares producidas por el estrés en el ratón. Máster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **2001**.

Pareja M., Sánchez O., Lorita J., Soley M., Ramírez I. Activated epidermal growth factor receptor (ErbB1) protects the heart against stress-induced injury in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**; 285: R455-R462.

Parker J.L., Adams H.R. Development of myocardial dysfunction in endotoxic shock. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1985**; 248: H818-H826.

Pastorino J.G., Tafani M., Farber J.L. Tumor necrosis factor induced phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 19411-19416.

Perheentupa J., Lakshmanan J., Fisher D.A. Urine and kidney epidermal growth factor: ontogeny and sex difference in the mouse. *Pediatr. Res.* **1985**; 19: 428-432.

Pfeffer K., Matsuyama T., Kündig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Krönke M., Mak T.W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* **1993**; 73: 457-467.

Philip i Epstein L.B. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itsekf, γ -interferon and interleukin 1. *Nature* **1986**; 323: 86-89.

Piccinelli M., Simon G. Gender and cross-cultural differences in somatic symptoms associated with emotional distress. An international study in primary care. *Psychol. Med.* **1997**; 27: 433-444.

Pich M.E., Heinrichs S.C., Rivier C., Miczek K.A., Fisher D.A., Koob G.F. Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect behavioral response to social defeat stress in rats. *Psychoneuroendocrinology.* **1993**; 18: 495-507.

Pitman D.L., Ottenweller J.E., Natelson B.H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization to glucocorticoid responses in rats. *Behav. Neurosci.* **1990**; 104(1): 28-36.

Plata-Salaman C.R. Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides.* **1991**; 12: 653-663.

Poch E. Efecte de la sialoadenectomia sobre la cel·lularitat hepàtica en el ratolí. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **1999**.

Pohorecky L.A., Wurtman R.J. Adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Pharmacol. Rev.* **1971**; 23: 1-35.

Press M.F., Cordon-Carvo C., Slamon D.J. Expression of the HER-2/neu proto-oncogen in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene.* **1990**; 5: 953-962.

Pringent S.A., Lemoine N.R., Hughes C.M., Plowman G.D., Selden C., Gullick W.J. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene.* **1992**; 7: 1273-1278.

Q.

Quan N., Avitsur R., Stark J.L., He L., Shah M., Caligiuri M., Padgett D.A., Marucha P.T., Sheridan J.F. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *J. Neuroimmunol.* **2001**; 115: 36-45.

Quintana I., Grau M., Moreno F., Soler C., Ramírez I., Soley M. The early stimulation of glycolysis by epidermal growth factor in isolated rat hepatocytes is secondary to the glycogenolytic effect. *Biochem. J.* **1995**; 308: 889-894.

R.

Raab A., Dantzer R., Michaud B., Mormede P., Taghzouti K., Simon H., Le Moal M. Behavioral, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiol. Behav.* **1986**; 36: 223-228.

Rall L.B., Scott J., Bell B.I., Crawford R.J., Penschow J.D., Niall H.D., Coghlan J.P. Mouse pre pro-epidermal growth factor synthesis by kidney and other tissues. *Nature.* **1985**; 313(5999): 228-231. (x2)

Ramírez I. Contribució a l'estudi del metabolisme lipídic a la fase perinatal, mitjançant la prolongació de la gestació amb rata. Tesina. Universitat de Barcelona. **1981**.

Rao R.K., Thomas D.W., Pepperl S., Porreca F. Salivary epidermal growth factor plays a role in protection of lineal mucosal integrity. *Dig. Dis. Sci.* **1997**; 42(10): 2175-2181.

Raper S.E., Burwen S.J., Barker M.E., Jones A.L. Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology.* **1987**; 92: 1243-1250.

Rashed S.M., Patel T.B. Regulation of hepatic energy metabolism by epidermal growth factor. *Eur. J. Biochem.* **1991**; 197: 805-813.

Reich A., Shilo B.Z. Keren, a new ligand of the Drosophila epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *EMBO J.* **2002**; 21: 4287-4296.

Reisser D., Pance A., Jeannin J.F. Mechanisms of the antitumoral effect of lipid A. *Bioessays.* **2002**; 24: 284-289.

Rej R., Horder M. Aspartate aminotransferase (Glutamate Oxaloacetate Transaminase). In: "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. and Grassl M (eds). Weinheim: Verlag Chemie, **1984**, III 416-III 424.

Rice A.B., Moomaw C.R., Morgan D.L., Banner J.C. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* **1999**; 155: 213-221.

Riese D.J., Stern D.F. Specificity within the EGF family ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* **1998**; 20: 41-48.

Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology.* **2001**; 26(8): 761-788.

Rivest S., Lacroix S., Vallières L., Nadeau S., Zhang S., Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *P.S.E.B.M.* **2000**; 223: 22-38.

Romanosky A.J., Giaimo M.E., Shepherd R.E., Burns A.H. The effect of in vivo endotoxin on myocardial function in vitro. *Circ Shock.* **1986**; 19: 1-12.

Roskoski R. Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**; 319(1): 1-11.

Rosol T.J., Yanington J.T., Latendresse J., Capen C.C. Adrenal gland: structure, function, and mechanism of toxicity. *Toxicol. Pathol.* **2001**; 29(1): 41-48.

Rothe J., Lesslauer W., Lötscher H., Lang Y., Koebel P., Köntgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **1993**; 364: 798-802.

Roux-Lombard P. The interleukin-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* **1998**; 9: 565-576.

Rowinski E.K. The ErbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu. Rev. Med.* **2004**; 55: 433-457.

Roy S.K. Transforming growth factor- β potentiation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of epidermal growth factor. *Biol. Reprod.* **1993**; 48: 558-563.

Rubin R.A., O'Keefe J., Earp H.S. Alteration of epidermal growth factor-dependent phosphorylation during rat liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1982**; 79(3): 776-780

Russell W.E., Kaufmann W.K., Sitaric S., Luetkeke N.C., Lee D.C. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog.* **1996**; 15: 183-189.

Ruys J.D., Mendoza S.P., Capitanio J.P., Mason W.A. Behavioral and physiological adaptation to repeated chair restraint in rhesus macaques. *Physiol. Behav.* **2004**; 82: 205-213.

S.

Sachser N., Lick C. Social experience, behavior, and stress in guinea pigs. *Psychoneuroendocrinology.* **1991**; 50: 83-90.

Sagara Y., Ishige K., Tsait C., Maher P. Tyrphostins protect neuronal cells from oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2002**; 277(39): 36204-36215.

Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**; 19: 183-232.

Sánchez, O. Estudi comparatiu de la secreció d'EGF en diferents models d'estrès. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **1999**.

Santak B., Radermacher P., Adler J., Iber T., Rieger K.M., Wachter U., Vogt J., Georgieff M., Trager K. Effect of increased cardiac output on liver blood flow, oxygen exchange and metabolic rate during longterm endotoxin-induced shock in pigs. *Br. J. Pharmacol.* **1998**; 124: 1689-1697.

Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Plotsky P., Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* **1987**; 238(4826): 522-524.

Sapolsky R.M. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neural vulnerability to metabolic insults. *J. Neurosci.* **1985**; 5(5): 1228-1232.

Sapolsky R.M. Stress, the aging brain and the mechanism of neuron death. **1992**. Cambridge. MIT Press.

Sass G., Heinlein S., Agli A., Bang R., Schümann j., Tiegs G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine.* **2002**; 19(3): 115-120.

Savage CR., Jr, Cohen S. Epidermal growth factor and a new derivative: rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.* **1972**; 247: 7609-7611.

Sawchenko P.E., Brown E.R., Chan R.K., Ericsson A., Li H.Y., Roland B.L., Kovacs K.J. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog. Brain Res.* **1996**; 107: 201-222.

Schenk P.W., Snaar-Jagalska E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**; 1449: 1-24.

Scheuer D.A., Mifflin S.W. Repeated intermittent stress exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **1998**; 274(2 Pt 2): R470-R475.

Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **2000**; 103: 211-225.

Schlessinger J. Signal transduction. Autoinhibition control. *Science.* **2003**; 300: 750-752.

Schrader L., Ladewig J. Temporal differences in the responses of the pituitary adrenocortical axis, the sympathoadrenomedullar axis, heart rate, and behaviour to a daily repeated stressor in domestic pigs. *Physiol. Behav.* **1999**; 66(5): 775-783.

Schromm A.B., Lien E., Henneke P., Chow J.C., Yoshimura A., Heine H., Latz E., Manks B.G., Schwartz D.A., Miyake K., Golenbock D.T. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.* **2001**; 194: 79-88.

Schumann R.R., Leong S.R., Flagg G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* **1990**; 249(4975): 1429-1431.

Schwartz D., Blantz R.C. Nitric oxide, sepsis, and the kidney. *Semin. Nephrol.* **1999**; 19(3): 272-276.

Schwetz B.A., Plaa G.L. Catecholamine potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**; 14: 495-509.

Sebastian J., Richards R.G., Walker M.P., Wiesen J.F., Werb Z., Derynck R., Hom Y.K., Cunha G.R., DiAugustine R.P. Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell. Growth Differ.* **1998**; 9(9): 777-785.

- Secchi A., Ortanderl J.M., Schmidt W., Gebhard M.M., Martin E., Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J. Surg. Res.* **2000**; 89: 26-30.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **1936**. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **1998**; 10(2):230-1.
- Selzner N., Selzner M., Odermatt B., Tian Y., van Rooijen N., Clavien P.A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice. *Gastroenterology.* **2003**; 124: 692-700.
- Sen P., Maiti P.C., Puri S., Ray A., Audulov N.A., Valdman A.V. Mechanism of anti-stress activity of *Ocimum sanctum* Linn, euglenol and *Tinospora malabrica* in experimental animals. *Indian J. Exp. Biol.* **1992**; 30(7): 592-596.
- Senaldi G., Shaklee C.L., Simon B., Rowan, C.G., Lacey D.L., Hartung T. Keratinocyte growth factor protects murine hepatocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis in vivo and in vitro. *Hepatology.* **1998**; 27(6): 1584-1591.
- Serrero G. EGF inhibits the differentiation of adipocyte precursors in primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**; 146: 194-202.
- Serrero G., Mills D. Physiological role of epidermal growth factor on adipose tissue development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**; 88: 3912-3916.
- Sgoifo A., de Boer S.F., Haller J., Koolhaas J.M. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild type rats: relationships with aggression. *Physiol. Behav.* **1996**; 60: 1403-1407.
- Sgoifo A., De Boer S.F., Westenbroek C., Macs F.W., Beldhuis H., Suzuli T., Koolhaas M. Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1997**; 273: H1754-1760.
- Sgoifo A., Koolhaas J.M., Musso E., de Boer S.F. Different sympatho-vagal modulation of heart rat during social and nonsocial stress episodes in wild-type rats. *Physiol. Behav.* **1999**; 67: 733-738.
- Sgoifo A., Stilli D., de Baer S.F., Koolhaas J.P., Musso E. Acute social stress and cardiac electrical activity in rats. *Aggr. Behav.* **1998**; 24: 287-296.
- Shibasaki T., Yamauchi N., Kato Y., Masuda A., Imaki T., Hotta M., Demura H., Oono H., Shizume K. Involvement of corticotropin-releasing factor in restrain stress-induced anorexia and reversion of the anorexia by somatostatin in the rat. *Life Sci.* **1988**; 43: 1103-1110.
- Shirakawa F., Saito K., Bonagura C.A., Galson D.L. Fenton M.J., Webb A.C., Auron P.E. The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **1993**; 13: 1332-1344.
- Shively C.A., Laber-Laird K., Anton R.F. Behavior and physiology of social stress and depression in female cynomolgus monkeys. *Biol. Psychiatry.* **1997**; 41(8): 871-882.
- Shumann R.R. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res. Immunol.* **1992**; 143: 11-15.
- Sigg E.B., Day C., Colombo C. Endocrine factors in isolation-induced aggressiveness in rodents. *Endocrinology.* **1966**; 78: 679-684.

- Siminoski K., Bernanke J., Murphy R.A. Nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands – identical diurnal changes and rates of secretagogue-induced synthesis. *Endocrinology*. **1993**; 132: 2031-2037.
- Simon M.A. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell*. **2000**; 103: 13-15.
- Skutella T., Montkowski A., Stöhr T., Probst J., Landgraf R., Holsboer F., Jirikowski G.F. Corticotropin-releasing hormone (CRH) antisense oligodeoxynucleotide treatment attenuates social defeat-induced anxiety in rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1994**; 14(5): 579-588.
- Smagin G.N., Howell L.A., Redmann S.J., Ryan D.H., Harris R.B. Prevention of stress-induced weight loss by third somatostatin CRF receptor antagonist. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **1999**; 276(5 Pt 2): R1461-R1468.
- Smart R.J., Graf G.A., McNiven M.A., Sessa W.C. Engelman J.A., Scherer P.E., Okamoto T., Lisanti M.P. Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **1999**; 19: 7289-7304.
- Snodgrass-Belt P., Gilbert J.L., Davis F.C. Central administration of transforming growth factor-alpha and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. *Brain Res.* **2005**; 1038(2): 171-182.
- Soler C. Efectes contradictoris del factor de creixement epidèrmic (EGF) sobre la gluconeogenesi en hepatocits aïllats de rata. Estudi de les causes. Universitat de Barcelona. **1991**.
- Soler C., Soley M. Rapid and delayed effects of epidermal growth factor on gluconeogenesis. *Biochem. J.* **1993**; 294: 865-872.
- Soley M., Hollenberg M.D. Epidermal growth factor (urogastrone)-stimulated gluconeogenesis in isolated mouse hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**; 255(1): 136-146.
- Songyang Z., Shoelson S.E., Chandhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W.G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R.J. et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*. **1993**; 72(5): 767-778.
- Sorkin A. Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**; 29(Pt 4): 480-484.
- Sorkin A., Waters C.M. Endocytosis of growth factor receptors. *Bioessays*. **1993**; 15(6): 375-382.
- Spencer R.L., Miller A.H., Stein M., McEwen B.S. Corticosterone regulation of type I and II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res.* **1991**; 549: 236-246.
- Spitzer J.J., Bagby G.J., Meszaros K., Lang C.H. Altered control of carbohydrate metabolism in endotoxemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**; 286: 145-165.
- Spöhr F., Cornelissen A.J.M., Busch C., Gebhard M.M., Motsch J., Martin E.O., Weimann J. Role of endogenous nitric oxide in endotoxic-induced alteration of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**; 289: H823-H831.
- Srinivasan R., Poulosom R., Hurst H.C., Gullick W.J. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J. Pathol.* **1998**; 185(3): 236-245.
- Stark J.L., Avitsur R., Padgett D.A., Campbell K.A., Beck F.M., Sheridan J.F. Social stress induces glucocorticoids resistance in macrophages. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **2001**; 280: R1799-R1805.

Stefanski V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology*. **2000**; 25: 389-406.

Stefanski V., Knopf G., Schulz S. Long-term colony housing in long-evans rats: immunological, hormonal and behavioral consequences. *J. Neuroimmunol*. **2001**; 114(1-2): 122-130.

Stephens A. Stress and the cardiovascular system: a psychosocial perspective. In: "Stress: from synapse to syndrome". Stanford S.C. and Salmon P. (eds). San Diego. Academic Press, **1993**, pp. 119-141.

Stilli D., Berni R., Sgoifo A., Costoli T., Bocchi L., Caccioni F., Manghi M., Olivetti G., Musso E. Social stress, myocardial damage and arrhythmias in rats with cardiac hypertrophy. *Physiol. Behav.* **2001**; 73: 351-358.

Strasser R.H., Ihl V.R., Marquetant R. Molecular biology of adrenergic receptors. *J. Hypertens.* **1992**; 10: 501-506.

Stratakis C.A., Chrousos G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**. 771:1-18.

Su G.L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**; 283: G256-G265.

Su G.L., Gong K.Q., Fan M.H., Kelley W.M., Hsieh J., Sun J.M., Hemmila M.R., Arbabi S., Remick D.G., Wang S.C. Lipopolysaccharide-binding protein modulates acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology*. **2005**; 41: 187-195.

Su G.L., Klein R., Aminlari A., Zhang H., Steintraesser I., Alarcon W., Remick D.G., Wang S.C. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*. **2000**; 31: 932-936.

Sugita H., Kaneki M., Tokunaga E., Sugita M., Koike C., Yasuhara S., Tompkins R.G., Martyn J.A.J. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**; 282: E386-E394.

Suliburk J.K., Gonzalez E.A., Moore-Olufemi S.D., Weisbrodt N., Moore F.A., Mercer D.W. Ketamine inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced gastric luminal fluid accumulation. *J. Surg. Res.* **2005**; 127(2): 203-207.

Summers R.J., McMartin L.R. Adrenoreceptors and their second messenger system. *J. Neurochem.* **1993**; 60: 10-23.

Swain M.G. Stress and the gastrointestinal tract: I. Stress and hepatic inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**; 279: 1135-1138.

Swain M.G., Appleyard C., Wallace J., Wong H., Le T. Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis and release. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1999**; 276(1 Pt 1): G199-G205.

Swantek J.L., Tsen M.F., Cobb M.H., Thomas J.A. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J. Immunol.* **2000**; 164: 4301-4306.

Syed V., Khan S.A., Nieschalg E. Epidermal growth factor stimulates testosterone production of human Leydig cells in vitro. *J. endocrinol. Invest.* **1991**; 14: 93-97.

Szadoczky E., Rihmer Z., Papp Z., Furedi J. The prevalence of affective and anxiety disorders in primary care practice in Hungary. *J. Affective Disord.* **1997**; 43: 239-244.

Szasz G., Gruber W., Bernt E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of creatine kinase-MB in serum using inhibiting antibodies. *Klin Wochenschr.* **1976**; 54: 357-360.

T.

Taga T., Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**; 15: 797-819.

Takemura T., Makino S., Takao T., Asaba K., Suemaru S., Hashimoto K., Hypothalamic- pituitary-adrenocortical responses to single vs repeated endotoxin lipopolysaccharide administration in the rat. *Brain Res.* **1997**; 767(2): 181-191.

Tamashiro K.L.K., Nguyen M.M.N., Fujikawa T., Xu T., Ma L.Y., Woods R.J., Sakai R.R. Metabolic and endocrine consequences of social stress in a visible burrow system. *Physiol. Behav.* **2004**; 80: 683-693.

Tamashiro K.L.K., Nguyen M.M.N., Sakai R.R. Social stress: from rodents to primates. *Front. Neuroendocrinol.* **2005**; 26: 27-40.

Taylor G.T., Weiss J., Rupich R. Male rat behavior, endocrinology and reproductive physiology in a mixed-sex, socially stressful colony. *Physiol. Behav.* **1987**; 39(4): 429-433.

Taylor J.M., Cohen S., Mitchell W.M. Epidermal growth factor: high and low molecular weigh forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1970**; 67: 164-171.

Taylor J.M., Mitchell W.M., Cohen S. Epidermal growth factor: physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* **1972**; 247: 5928-5934.

Tebar F., Grau M., Mena M.P., Arnau A., Soley M., Ramírez I. Epidermal growth factor secreted from submandibular salivary glands interferes with the lipolytic effect of adrenaline in mice. *Endocrinology.* **2000**; 141 (3): 876-882.

Tebar F., Ramírez I., Soley M. Epidermal growth factor modulates the lipolytic action of catecholamines in rat adipocytes. Involvement of Gi protein. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268: 17199-17204.

Tebar F., Soley M., Ramírez I. The antilipolytic effects of insulin and epidermal growth factor in rat adipocytes are mediated by different mechanisms. *Endocrinology.* **1996**; 137: 4181-4188.

Terenzi F., Casado M., Martin-Sanz P., Boscà L. Epidermal growth factor inhibits cytokine-dependent nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *FEBS Letters.* **1995**; 368: 193-196.

Theseff I., Viinikka L., Saxen L., Lehtonen E., Perheentupa J. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life Sci.* **1988**; 43: 13-18.

Threadgill D.W., Dlugosz A.A., Hansen L.A., Temenbaun T., Lichti U., Yec D., LaMantia C., Mourton t., Herrup K., Hanis R.C. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* **1995**; 269: 230-234.

Tilders F.J.H., DeRijk R.H., Van Dam A.M., Vicent V.A.M., Schotanus K., Persoons J.H.A. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology.* **1994**; 19: 209-232.

Tilg H., Dinarello C.A., Mier J.W. IL-6 and APPs: antiinflammatory and immunosuppressive mediators (Review). *Immunol. Today*. **1997**; 18: 428-432.

Tornatzky W., Miczek K.A. Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology*. **1994**; 116(3): 346-356.

Tracey K.J. The inflammatory reflex. *Nature*. **2002**; 420: 853-859.

Tracey K.J., Lowry S.F., Fahey T.J., Albert J.D., Shires G.T. Anti-cachetin TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal endotoxemia. *Nature*. **1987**; 330: 662-664.

Tran-Thi T.A., Weinhold L., Weinstock C., Hoffmann R., Schulze-Specking A., Northoff H., Decker K. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and interleukin-6 in the perfused rat liver. *Eur. Cytokine Netw*. **1993**; 4 (5): 363-370.

Tresguerras J.A., Benitez E.A., J. D., Moreno B. Tratado de endocrinología Básica y Clínica. **2000**. Editorial Síntesis, S.A.

Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*. **1969**; 6: 24-27.

Tsutsumi O., Kubota Y., Oka T. Effect of sialoadenectomy, treatment with epidermal growth factor (EGF) antiserum and replacement of EGF on the epidermis in mice. *J. Endocrinol*. **1987**; 113: 193-197.

Tsutsumi O., Kurachi H., Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*. **1986**; 233: 975-977.

Tsutsumi O., Oka T. Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Annu. J. Obstet. Gynecolo*. **1987**; 156: 241-244.

Tuomela T. Epidermal growth factor concentrations in submandibular salivary gland, plasma, bile, kidneys and urine of male mice: dynamics after phenylephrine injection. *Life Sci*. **1990**; 46: 1197- 1206.

Turnbull A.V., Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine response to stress: CRF receptors, binding protein and related peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. **1997**; 215: 1-10.

Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanism of action. *Physiol. Rev*. **1999**; 79(1): 1-71.

Tzahar E., Waterman H., Chen X, Levkowitz G., Karunagaran D., Lavi S., Ratzkin B.J., Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol*. **1996**; 5276-5287.

U.

Uehara A., Sekiya C., Takasugi Y., Namiki M., Arimura A. Anorexia induced by interleukin-1: involvement of corticotropin-releasing factor. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol*. **1989**; 257: R613-R617.

Uesugi T., Froh M., Arteel G.E., Bradford B.U., Thurman R.G. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*. **2001**; 34: 101-108.

Ulevitch R.J., Tobias P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol*. **1995**; 13: 437-457.

Ulich T.R., Guo K., Remik D., Del Castillo J., Yin S. Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. III. IL-6 mRNA and serum protein expression and the in vivo hematologic effects of IL-6. *J. Immunol.* **1991**; 146(7): 2316-2323.

Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A., Schlessinger J., et al. Human epidermoid growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* **1984**; 309(5967): 418-425.

Ullrich A., Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* **1990**; 61: 203-212.

V.

Vale W., Speiss J., Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science.* **1981**; 213: 1394-1397.

Vallés A., Martí O., Armario A. Mapping the areas sensitive to long-term endotoxin tolerance in the rat brain: a c-fos mRNA study. *J. Neurochem.* **2005**; 93(5): 1177-1188.

Vallés A., Martí O., Harbuz M.S., Armario A. A single lipopolysaccharide administration is sufficient to induce a long-term desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neurosci.* **2002**; 112(2): 383-389.

Vallés-Sánchez A. Brain changes underlying the long-term effects of a single previous exposure to emotional or systemic stressor in rats: a view from the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Universitat Autònoma de Barcelona. **2002**.

van der Poll T., Coyle S.M., Barbosa K., Braxton C.C., Lowry S.F. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- α and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J.Clin.Invest.* **1996**; 97(3): 713-719.

Vanden Berghe W., Vermeulen L., De Wilde G., De Bosscher K., Boone E., Haegeman G. Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem. Pharmacol.* **2000**; 60(8): 1185-1195.

Vanltallie T.B. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism.* **2002**; 51(6 suppl 1): 40-45.

Vassault, A. Lactate dehydrogenase. In: "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. and Grassl M (eds). Weinheim: Verlag Chemie, **1984**, III 118- III 126.

Vesey D.A., Selden A.C., Woodman A.C., Hodgson H.J. Effect of in vivo administration of an antibody to epidermal growth factor on the rapid increase in DNA synthesis induced by partial hepatectomy in the rat. *Gut.* **1992**; 33(6): 831-835.

Vigas M. Contribution to the understanding of the stress concept. In: "Catecholamines and stress: recent advances". Udsin E., Kvetnansky R., and Kopin I.J., (eds.). New York. Elsevier North Holland, **1980**, pp. 572-581.

Viladrich M. Caracterització dels focus d'infiltració en el parènquima hepàtic en el ratolí. Efecte de la sialoadenectomia. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona. **2004**.

W.

Wajant H., Henkler F., Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell. Signal.* **2001**; 13: 389-400.

Wang H., Czura C.J., Tracey K.J., Tumor necrosis factor. In: "The cytokine handbook". Thomson A.W. and Lotze M.T. (eds). Elsevier Science Ltd, London, **2003**, pp. 837-860.

Wang W., Mitra A., Poole B., Falk S., Scott Lucia M., Tayal S., Schrier R. Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2004**; 287: F1044-F1048.

Welch B.L., Welch A.S. Sustained effects of brief daily stress (fighting) upon brain and adrenal catecholamines and adrenal spleen, and heart weights of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1969**; 64: 100-107.

Wheater P.R., Burkitt H.G., Daniels V.G. Histologia funcional. Texto y atlas en color. **1987**. Editorial Jims (2ª edició).

Wilkinson L.S., Edwards J.C. Binding of antibodies raised against tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) to blood vessels and macrophages in inflamed synovial tissue. *Rheumatol. Int.* **1991**; 11(1): 19-25.

Willenberg H.S., Bornstein S.R., Hiroi N., Path G., Goretzki P.E., Scherbaum W.A., Chrousos G.P. Effect of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type 1 antagonist on human adrenal function. *Mol. Psychiatry.* **2000**; 5: 137-141.

Woiciechowsky C., Asadullah K., Nestler D., Eberhardt B., Platzer C., Schoning B., Glockner F., Lanksch W.R., Volk H.D., Docke W.D. Sympathetic activation triggers systemic interleukin 10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nature Med.* **1998**; 4(7): 808-813.

Wurtman R.J. Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism.* **2002**; 51(6 suppl 1): 11-14.

Wurtman R.J., Axelrod J. Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science.* **1965**; 150: 1464-1465.

Wüst S., Federenko I.S., van Rossum E.F.C., Koper J.W., Hellhammer D.H. Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress-further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology.* **2005**; 30: 199-211.

X.

Xia L., Wang L., Chung A.S., Ivanov S.S., Ling M.Y., Dragov A.M., Platt A., Gilmer T.M., Fu X.Y., Chin Y.E. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *J. Biol. Chem.* **2002**; 277: 30716-30723.

Y.

Yamaguchi M., Matsuura M., Kobayashi K., Sasaki H., Yajima T., Kuwata T. Lactorferrin protects against development of hepatitis caused by sensitization of kupffer cells by lipopolysaccharide. *Clin. Diagn. Lab. Immuno.* **2001**; 8(6): 1234-1239.

Yang R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.I., Gurney A.L., Godowsky P.J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. **1998**; 395: 284-288.

Yarden Y., Sliwkowski M. X. Untangling the erbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Biol.* **2001**; 2: 127-137.

Yin X.M. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J. Mol. Med.* **2000**; 203-211.

Young N.S., Levin J., Prendergast R.A. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* **1972**; 51: 1790.

Z.

Zhou D., Kusnecov A.W., Shurin M.R., De Paoli M., Rabin B.S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. **1993**; 133(6): 2523-2530.

Zschiesche W. Retardation of growth and epithelial differentiation in suckling mice by anti-EGF antisera. *Biomed. Biochim. Acta*. **1989**; 48(1): 103-110.

Zschiesche W., Eckert K. Effects of anti-EGF serum on newborn mice. *Experientia (Basel)*. **1988**; 44(3): 249-251.

