

Els receptors ErbB en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica en el ratolí

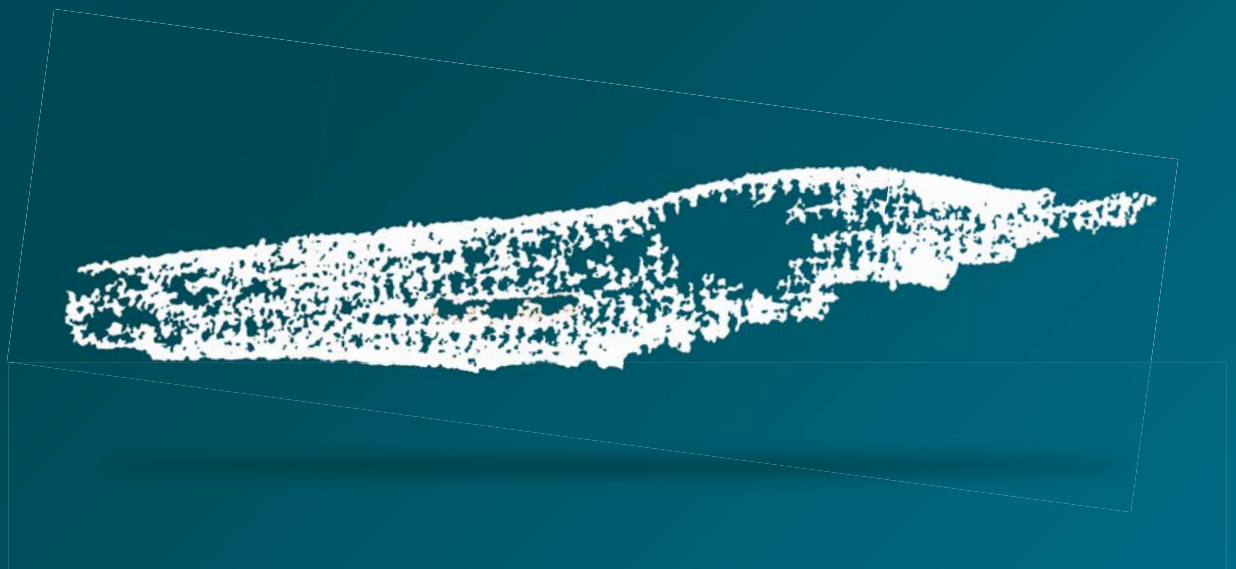
Genís Campreciós Figueras

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Receptors ErbB en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica en el ratolí



Genís Campreciós Figueras

Barcelona, 2010

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat en Biomedicina, Bienni 2005-2007

Memòria per a optar al títol de Doctor per la UB

Presentada per

Genís Campreciós Figueras

L'interessat

Genís Campreciós Figueras

Vist-i-plau dels directors

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

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

Índex

Índex general

Índex	i
Índex general	iii
Índex de figures	vii
Índex de taules	vii
Abreviatures	ix
1. Introducció	1
1.1. Sistema adrenèrgic	3
1.1.1. Les catecolamines: estructura molecular i receptors cel·lulars	3
1.1.2. Expressió dels receptors adrenèrgics	5
1.1.3. Efectes del sistema adrenèrgic en el cor	7
1.1.4. Efectes del sistema adrenèrgic en el ronyó	9
1.2. Receptors ErbB	11
1.2.1. Estructura molecular	13
1.2.2. Distribució tissular	18
1.2.3. Activitat biològica dels ErbB	19
1.3. La família del factor de creixement epidèrmic	21
1.3.1. EGF	21
1.3.1.1. Estructura molecular i característiques generals	21
1.3.1.2. Síntesi i distribució	23
1.3.1.3. Activitat biològica	24
1.3.2. Neuregulines	26
1.3.2.1. Estructura molecular i característiques generals	26
1.3.2.2. Síntesi i distribució	28
1.3.2.3. Activitat biològica	29
1.4. El sistema ErbB en el cor	31
Hipertrofia cardíaca i ErbBs	34
1.5. El sistema ErbB en el ronyó	36
2. Objectius	41
3. Materials i Mètodes	45
3.1. Animals i condicions d'estabulació	47
3.2. Models experimentals	47
3.2.1. Estimulació β -adrenèrgica crònica	47
3.2.2. Recuperació després d'estimulació β -adrenèrgica crònica	48
3.2.3. Estimulació α_1 -adrenèrgica crònica	49
3.2.4. Sialoadenectomia	49

3.2.5. Estimulació α_1 -adrenèrgica aguda	50
3.3. Extracció i processament de les mostres	50
3.3.1. Material	50
3.3.2. Reactius	51
3.3.3. Procediment	51
3.4. Obtenció de cardiomiòcits aïllats de ratolí	52
3.5. Anàlisi histològica	60
3.5.1. Obtenció de blocs de parafina	60
3.5.2. Obtenció de talls histològics	61
3.5.3. Muntatge de preparacions permanents	62
3.5.4. Observació microscòpica	62
3.5.5. Tinció amb Hematoxilina-Eosina	63
3.5.6. Tinció tricròmica de Mallory	63
3.5.7. Immunohistoquímica	64
3.5.7.1. Immunohistoquímica per detectar la incorporació de BrdU al DNA	65
3.5.7.2. Immunohistoquímica per detectar la presència i localització dels receptors ErbB en talls de ronyó	68
3.5.7.3. Immunocitoquímica de fluorescència	71
3.6. Quantificació d'EGF a teixits, orina i plasma	72
3.6.1. Fonament	72
3.6.2. Material	73
3.6.3. Reactius	73
3.6.4. Processament de les mostres	73
3.6.5. Preparació de la corba patró	74
3.6.6. Procediment de la quantificació	75
3.6.7. Càlculs	76
3.7. Valoració de proteïnes	77
3.8. Altres determinacions	78
3.8.1. Aspartat transaminasa (AST) en plasma	78
3.8.2. Alanina transaminasa (ALT) en plasma	80
3.8.3. Lactat deshidrogenasa (LDH) en plasma	82
3.8.4. α -hidroxibutirat deshidrogenasa (α -HBDH o LDH-1) en plasma	83
3.8.5. Determinacions automàtiques de metabòlits en plasma i orina	85
3.8.5.1. Concentració de proteïnes en orina	85
3.8.5.2. Concentració de creatinina	85
3.8.5.3. Concentració d'urea	86
3.8.5.4. Concentració de Na^+ i K^+	86

3.9. Western Blot	87
3.9.1. Homogenització de les mostres per a western blot	87
3.9.2. Aïllament de membranes	88
3.9.3. Immunoprecipitació dels receptors ErbB	89
3.9.4. Electroforesi (SDS-PAGE)	92
3.9.4.1. Fonament	92
3.9.4.2. Material	92
3.9.4.3. Reactius	92
3.9.4.4. Procediment	93
3.9.5. Western Blot	94
3.9.5.1. Fonament	94
3.9.5.2. Material	95
3.9.5.3. Reactius	95
3.9.5.4. Procediment	95
3.9.6. Decapatge (stripping) de les membranes	98
3.10. PCR a temps real	99
3.10.1. Aïllament d'RNA	99
3.10.2. Retrotranscripció	101
3.10.3. PCR a temps real (real-time PCR)	102
3.11. Anàlisi estadística	107
4. Resultats	109
4.1. Article 1: <i>ErbB receptors protect the perfused heart against injury induced by epinephrine combined with low-flow ischemia</i>	113
4.2. Article 2: <i>Acute and chronic adrenergic stimulation of submandibular salivary glands. Effects on the endocrine function of epidermal growth factor in mice</i>	119
4.3. Article 3: <i>Expression, Localization, and Regulation of the Neuregulin Receptor ErbB3 in Mouse Heart</i>	125
4.4. Article 4: <i>Chronic β-adrenergic stimulation increases ErbB receptors and cellular proliferation in mouse kidney</i>	131
4.5. Annex Article 4: <i>ErbB4 en el ronyó: localització, desenvolupament i resposta a l'estimulació crònica dels receptors β-adrenèrgics</i>	137
5. Discussió	149
5.1. L'EGF de les glàndules submaxil·lars en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica	151
5.2. ErbB3 en el cor de ratolí adult	153

5.3. Els receptors ErbB en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica en el ronyó	155
5.4. Consideracions finals	158
6. Conclusions	161
7. Bibliografia	165

Índex de figures

Figura 1. Estructura molecular de les catecolamines	4
Figura 2. Esquema reduït de les principals vies de transducció de senyal a través dels receptors acoblats a proteïnes G_s i $G_{q/11}$	6
Figura 3. Resposta del ronyó a l'estimulació del sistema nerviós simpàtic	10
Figura 4. Estructura i nomenclatura dels receptors de la família dels ErbBs	13
Figura 5. Resum de les possibles unions de proteïnes senyalitzadores i adaptadores als residus tirosina fosforilats dels receptors ErbB	17
Figura 6. Esquema reduït de les principals vies de transducció de senyal a través de la família ErbB	18
Figura 7. Seqüència d'aminoàcids (A) i model d'estructura terciària (B) de l'EGF de ratolí	22
Figura 8. Esquema de les diferents formes teòriques de la NRG-1 després del processament diferencial del seu mRNA	28
Figura 9. Vies de senyalització en la hipertròfia cardíaca fisiològica i compensada	36
Figura 10. Sistema de perfusió	55
Figura 11. Modificacions de la cànula emprada en les perfusions de ratolí	57
Figura 12. Exemple dels resultats obtinguts en una Real-time qRT-PCR i el càlcul que se'n deriva	107

Índex de taules

Taula 1. Expressió dels ErbBs a diferents òrgans i teixits humans	19
Taula 2. Concentració d'EGF en teixits i fluids de ratolí	23
Taula 3. Composició del KHB i de les solucions mare emprades en la seva preparació	54
Taula 4. Relació d'anticossos primaris en immunohistoquímica i immunocitoquímica	69
Taula 5. Relació d'anticossos secundaris en immunohistoquímica i immunocitoquímica	70
Taula 6. Anticossos primaris utilitzats per a Western blot	97
Taula 7: Relació de <i>primers</i> utilitzats en la real-time RT-PCR	105

Abreviatures

AC	Adenil ciclasa
ADAM	Disintegrina i metal·loproteïnasa
ALT	Alanina transaminasa
AngII	Angiotensina II
AR	Amfiregulina
ARIA	Receptor inductor de l'activitat acetilcolina
AST	Aspartat transaminasa
BrdU	Bromo-deoxiuridina
BTC	Betacel·lulina
CRF	Insuficiència renal crònica
DAB	3',3'-diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de creixement epidèrmic
ENaC	Canal de sodi epitelial
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
EPG	Epigen
EPR	Epiregulina
FAK	Quinasa de les unions focals
GFR	Taxa de filtració glomerular
GGF	Factor de creixement glial
GOT	Glutamat oxalacetat transaminasa
GPCR	Receptors units a proteïna G
GPT	Glutamat piruvat transaminasa
α -HBDH	α -hidroxibutirat deshidrogenasa
HB-EGF	Factor de creixement epidèrmic semblant a l'EGF i amb afinitat per l'heparina
HRG	Heregulina
IGF-1	Factor de creixement semblant a la insulina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfat
KHB	Tampó Krebs-Henseleit
LDH	Lactat deshidrogenasa
LDH-1	α -hidroxibutirat deshidrogenasa
NDF	Factor diferenciador de Neu
NGF	Factor de creixement nerviós
NP-40	Nonidet P40

NRG	Neuregulina
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDK-1	Quinasa depenent de fosfatidils inositols
PIP ₃	Fosfatidil Inositol 3,4,5-trifosfat
PKA	Proteïna quinasa A
PKB o Akt	Proteïna quinasa B
PKC	Proteïna quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RBF	Flux de sang renal
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
SERCA	Ca ²⁺ ATPasa del reticle sarco/endoplasmàtic
SHAM	Animals amb operació simulada
SIALO	Animals sialoadenectomitzats
SMG	Glàndules submaxil·lars
SNR	Sistema nerviós simpàtic renal
TAHL	Segment ascendent gruixut de la nansa de Henle
TGF- α	Factor de creixement transformant α
TGF- β	Factor de creixement transformant β

1. Introducció

1.1. Sistema adrenèrgic

El sistema nerviós autònom el conformen el sistema nerviós simpàtic i el parasimpàtic. El sistema nerviós simpàtic pot actuar de manera directa, mitjançant l'alliberament del neurotransmissor noradrenalina des de les seves terminals nervioses, així com també indirectament a través de l'alliberament d'adrenalina de les glàndules adrenals al torrent sanguini. Tant la noradrenalina com l'adrenalina tenen la capacitat d'unir-se i activar els mateixos receptors, anomenats receptors adrenèrgics. Per altra banda, el sistema nerviós parasimpàtic actua mitjançant l'alliberament d'acetilcolina i la conseqüent activació dels receptors muscarínics.

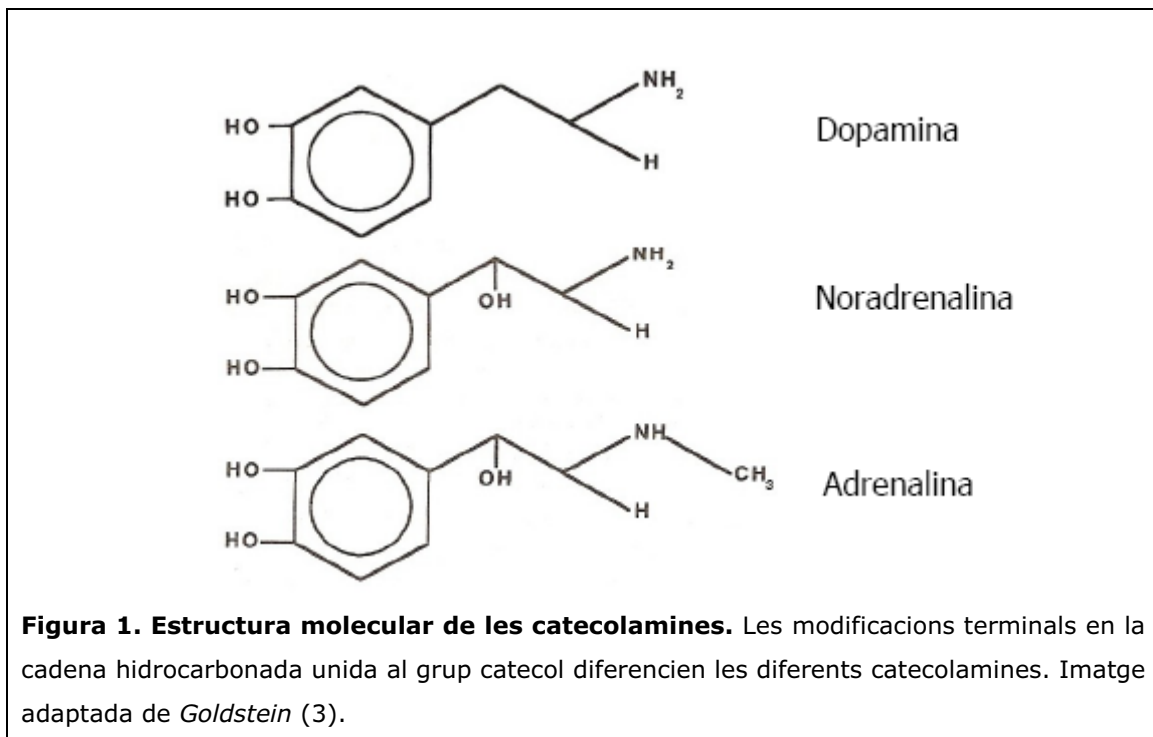
En general, podem dir que les funcions d'aquests dos sistemes nerviosos són oposades. Mentre que l'activació del sistema simpàtic situa el cos en situació "d'emergència", preparat per a realitzar esforços vigorosos, l'excitació del sistema nerviós parasimpàtic produeix l'efecte contrari, preparant el cos per restar en un estat "vegetatiu". A nivell fisiològic, per exemple, l'activitat simpàtica augmenta la freqüència cardíaca i la pressió arterial, alhora que afavoreix el flux sanguini des de la pell i les visceres en direcció als músculs, i també redueix la mobilitat intestinal; totes aquestes respostes són apropiades en cas de tenir la necessitat d'una fugida ràpida. Per altra banda, el sistema parasimpàtic disminueix la freqüència cardíaca i la pressió arterial, i promou la circulació sanguínia cap a l'intestí, així com l'augment de la seva mobilitat; aquestes accions, en canvi, són apropiades pel repòs i la digestió.

1.1.1. Les catecolamines: estructura molecular i receptors cel·lulars

Estructuralment, les catecolamines estan formades per un nucli catecol (un anell aromàtic amb dos residus hidroxils contigus) unit a una cadena carbonatada amb un grup amino (figura 1). Petites modificacions en aquesta estructura originen les diferents catecolamines existents, com per exemple, la dopamina, la noradrenalina i l'adrenalina. La dopamina actua com a neurotransmissor en el cervell, i de forma autocrina i paracrina en la perifèria de l'organisme, afavorint l'acumulació de sodi intracel·lular. La noradrenalina i l'adrenalina, com ja hem dit, són hormones clau en la senyalització del sistema nerviós simpàtic.

Els receptors de la noradrenalina i l'adrenalina són els receptors adrenèrgics. Actualment, es coneixen dos grans grups de receptors, els de tipus α i els de tipus β . Dins de cada grup, però, trobem diferents subtipus. Així doncs, dins del grup dels receptors α trobem dos subgrups, els α_1 i els α_2 , i en ambdós casos encara els

dividim en α_{1A} , α_{1B} o α_{1D} , i en α_{2A} , α_{2B} o α_{2C} (1). Per la seva banda, els receptors β també es poden dividir en tres subtipus: β_1 , β_2 o β_3 (2).



Tots els receptors adrenèrgics pertanyen a la superfamília dels receptors amb set dominis transmembrana acoblats a proteïna G. Els diferents subtipus de receptors s'uneixen a diferents subunitats α de la proteïna G. En general, els receptors α_1 s'uneixen a la proteïna $G_{q/11}$, mentre que els receptors α_2 s'uneixen a la proteïna G_i , i els β a la G_s . No obstant, aquesta relació no és sempre així, ja que se sap que alguns receptors poden interactuar amb més d'una proteïna G, com per exemple el receptor adrenèrgic de tipus β_2 , el qual pot unir-se tant a G_s com a G_i (4). De forma general, però, la unió dels receptors a la proteïna $G_{q/11}$ induïx l'activació de la fosfolipasa C (PLC), la qual processa els fosfolípids de membrana alliberant inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). El primer, viatja pel citosol fins al reticle endoplasmàtic on provoca l'alliberament de Ca^{2+} del reticle cap a l'interior cel·lular. El DAG, per la seva banda, activa la PKC, la qual s'encarrega de fosforilar altres proteïnes i activar altres vies.

Per la seva banda, l'activació de la proteïna G_s induïx l'activació de l'adenil ciclase (AC), la qual provoca un augment intracel·lular dels nivells de cAMP i la conseqüent activació de la proteïna quinasa A (PKA), la proteïna efectora d'aquesta

via. Contràriament, l'activació de la proteïna G_i inhibeix l'acció de l'AC, disminuint els nivells intracel·lulars de cAMP i l'activació de PKA.

Aquesta variabilitat en la unió a diferents proteïnes G implica diferències en la senyalització a través de cada tipus de receptor (veure figura 2). És per aquest fet, doncs, que l'expressió diferencial dels diferents subtipus de receptors adrenèrgics condicionarà els efectes tant de la noradrenalina com de l'adrenalina en els seus llocs d'acció.

1.1.2. Expressió dels receptors adrenèrgics

En aquest apartat parlarem, bàsicament, de l'expressió dels receptors adrenèrgics tant a cor com a ronyó, ja que són els òrgans on hem focalitzat els nostres estudis.

En el cor trobem pràcticament tots els tipus de receptors, tant de tipus α com β , tot i que aquests últims són els més abundants, amb una proporció aproximada respecte als α de 1:9 (5). En cardiomiòcits, la proporció de receptors α_{1B} respecte els α_{1A} és de 8:2 (5), mentre que la presència dels α_{1D} és gairebé inexistent. De la mateixa manera, en cardiomiòcits també podem trobar els receptors β_1 i β_2 en una proporció aproximada de 8:2 (5), mentre que els receptors β_3 s'expressen de manera negligible. Els receptors de tipus α_2 no s'expressen en els cardiomiòcits pròpiament, però sí en canvi a les sinapsis de les neurones del sistema nerviós simpàtic que innerven el miocardi (majoritàriament α_{2C}), i s'encarreguen d'inhibir la secreció de noradrenalina des de la sinapsi quan se n'allibera una gran quantitat (6).

En el ronyó, l'expressió dels receptors adrenèrgics no està tant ben caracteritzada, especialment pel que fa als receptors de tipus α . En aquest sentit, en humans s'han detectat els mRNAs dels tres subtipus de receptors α_1 , sent els més abundants els α_{1A} (45%) (7). Els receptors α_{1B} es van localitzar a la zona medul·lar, mentre que els α_{1D} són els menys abundants i es van localitzar específicament en vasos intra-renals (7). Ara bé, aquestes expressions d'mRNAs no s'han pogut confirmar posteriorment a nivell de proteïna. En rates, els receptors α_{1A} i α_{1B} també s'han localitzat en els diferents segments de la nefrona, sent la seva expressió superior en el còrtex i inferior a mida que ens endinsem cap a la medul·la. En general, l'expressió dels dos subtipus és similar, tot i que en la zona interior de la medul·la predominen els receptors α_{1B} (8;9).

Els receptors α_2 , en canvi, s'han detectat tant a nivell d'mRNA com de proteïna, sent els més abundants els α_{2A} . Els subtipus α_{2B} i α_{2C} també s'expressen, però en molta menor quantitat. En els tres casos, l'expressió dels diferents mRNAs s'ha localitzat tant a nivell de còrtex com de medul·la (7).

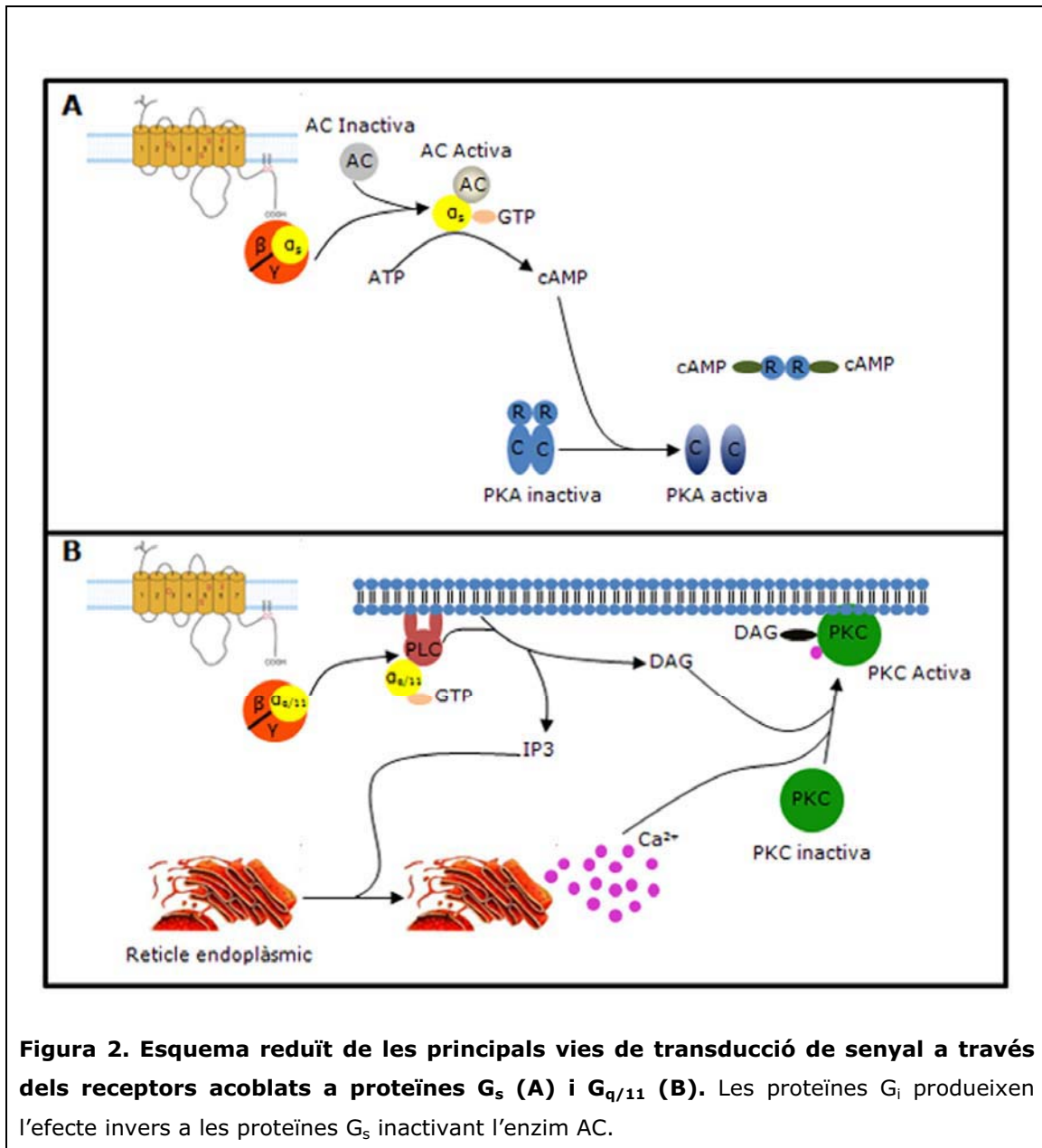


Figura 2. Esquema reduït de les principals vies de transducció de senyal a través dels receptors acoblats a proteïnes G_s (A) i $G_{q/11}$ (B). Les proteïnes G_i produeixen l'efecte invers a les proteïnes G_s inactivant l'enzim AC.

Pel que fa als receptors adrenèrgics de tipus β , la seva expressió a ronyó ha estat bastant més ben caracteritzada. En general, la seva expressió és superior en el còrtex en comparació a la medul·la. En general, trobem més receptors del subtipus β_1 que no pas del β_2 , amb unes relacions de 65:35, dels quals el 70% es troben al còrtex i l'altre 30% a la medul·la (10). Analitzant més profundament la seva

distribució, es descriu que els β_1 es localitzen en les cèl·lules mesangials, les cèl·lules granulars juxtaglomerulars, l'epiteli de la macula densa, en els túbuls proximals i distals i en les cèl·lules intercalades de tipus A secretores d'àcid dels túbuls corticals i medulars. Per la seva banda, els receptors de tipus β_2 es localitzen sobretot en les zones apicals i sub-apicals de l'epiteli dels túbuls proximals, però també dels túbuls distals, tot i que en menor proporció. Els dos subtipus, tant els β_1 com els β_2 , també s'expressen abundantment en les membranes de les cèl·lules musculars llises de les artèries renals (10).

1.1.3. Efectes del sistema adrenèrgic en el cor

El sistema adrenèrgic juga un paper molt important en la regulació de la funció contràctil del cor. Els efectes principals de l'adrenalina al cor són els d'augmentar tant la força (inotropia) com el ritme de contracció (cronotropia), així com també la força de relaxació o lusotropia.

A la literatura, els treballs amb l'objectiu de determinar la importància relativa dels diferents subtipus de receptors sobre la funció contràctil han sigut molt coherents respecte a l'acció dels receptors β -adrenèrgics, però molt menys en el cas dels α -adrenèrgics. Així doncs, sembla ser que en condicions normals no patològiques, són els receptors β_1 els màxims responsables del control de la funció contràctil (11). Com ja hem comentat anteriorment, els receptors β_1 són els majoritaris al cor i via proteïna G_s , AC, cAMP i PKA provoquen un increment de Ca^{2+} intracel·lular que acaba incrementant la inotropia, la cronotropia i la lusotropia. El mecanisme que ho explica és mitjançant la PKA, la qual fosforila diferents proteïnes, entre altres els canals de Ca^{2+} de tipus L presents a la membrana citoplasmàtica, afavorint així l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular (12). També fosforila la troponina I, provocant canvis conformacionals en aquesta que bloquegen la seva funció inhibidora, facilitant d'aquesta manera que els caps de miosina s'uneixin als filaments d'actina (13). La PKA també fosforila els caps de la miosina, incrementant-ne la seva activitat ATPasa, fet que permet un lliscament més efectiu dels filaments d'actina. Finalment, la PKA també fosforila la proteïna fosfolamban (13), la qual una vegada fosforilada ja no és capaç d'inhibir la bomba de Ca^{2+} del reticle (SERCA), facilitant una reabsorció del Ca^{2+} intracel·lular més eficaç.

Contràriament a l'efecte dels receptors β , l'efecte dels receptors α -adrenèrgics no queda clar a la bibliografia, fins al punt que sovint trobem contradiccions. Tant en cardiomiòcits aïllats com en músculs papil·lars s'han observat respostes bifàsiques

(inicialment cardiotònica i posteriorment cardiodepressora) (14;15), però també respostes únicament cardiodepressores (16;17) o cardiotòniques (18). En estudis en cor perfós s'han observat també els dos patrons de resposta, un de bifàsic (19) i uns altres únicament cardiodepressor (20) o cardioestimulador (21). S'han descrit diferències en la proporció i tipus de receptors presents en el cor en funció de l'espècie i l'edat de l'animal, les quals podrien explicar, en part, els resultats divergents descrits fins ara a la bibliografia (2).

Tot i el paper clau del sistema adrenèrgic a l'hora de controlar certs aspectes del metabolisme del cor, un excés de senyalització a través de les catecolamines pot provocar l'aparició de lesions i disfuncions contràctils. Aquests efectes perjudicials de les catecolamines s'han observat en diferents models experimentals, com per exemple en cardiomiòcits aïllats (22), en cor perfós (19) i en l'animal sencer (19;23). En general, s'accepta que l'aparició d'aquestes lesions és deguda a l'acció dels receptors β , concretament els β_1 (24;25), mentre que el paper dels receptors α sembla ser molt menys rellevant, exceptuant l'aparició d'hemorràgies sub-endocàrdiques, tot i que fins i tot en aquest cas, és necessària la senyalització simultània a través dels dos tipus de receptors, α i β , per a què siguin rellevants (19;26).

El mecanisme molecular responsable de l'aparició d'aquestes lesions és l'activació dels receptors β adrenèrgics, els quals via PKA, provoquen un increment excessiu de Ca^{2+} intracel·lular, comportant la consegüent pèrdua de l'homeòstasi iònica en el cor. Aquest fet bloqueja la cadena respiratòria, provocant la generació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i una forta davallada del contingut d'ATP intracel·lular. Addicionalment, la pròpia metabolització de les catecolamines encara provoca un augment més gran de la producció de ROS. L'estrès oxidatiu és, segons molts autors, el principal responsable de l'efecte nociu de les catecolamines (27;28).

A nivell cel·lular i sub-cel·lular, les lesions generades per les catecolamines es caracteritzen per la degradació de l'estructura dels sarcòmers, els quals se separen dels discs intercalars i dels sarcòmers contigus, sovint compactant-se fins a formar les anomenades bandes de contracció. La cèl·lula pateix un inflament molt evident producte del desequilibri osmòtic, provocant que la membrana plasmàtica se separi dels sarcòmers. Les mitocòndries també presenten una morfologia dilatada degut a les mateixes causes (26). A nivell histològic, s'observa un increment molt important del nombre de cèl·lules infiltrades, així com d'hemorràgies i destrucció focal de fibres (19;29).

1.1.4. Efectes del sistema adrenèrgic en el ronyó

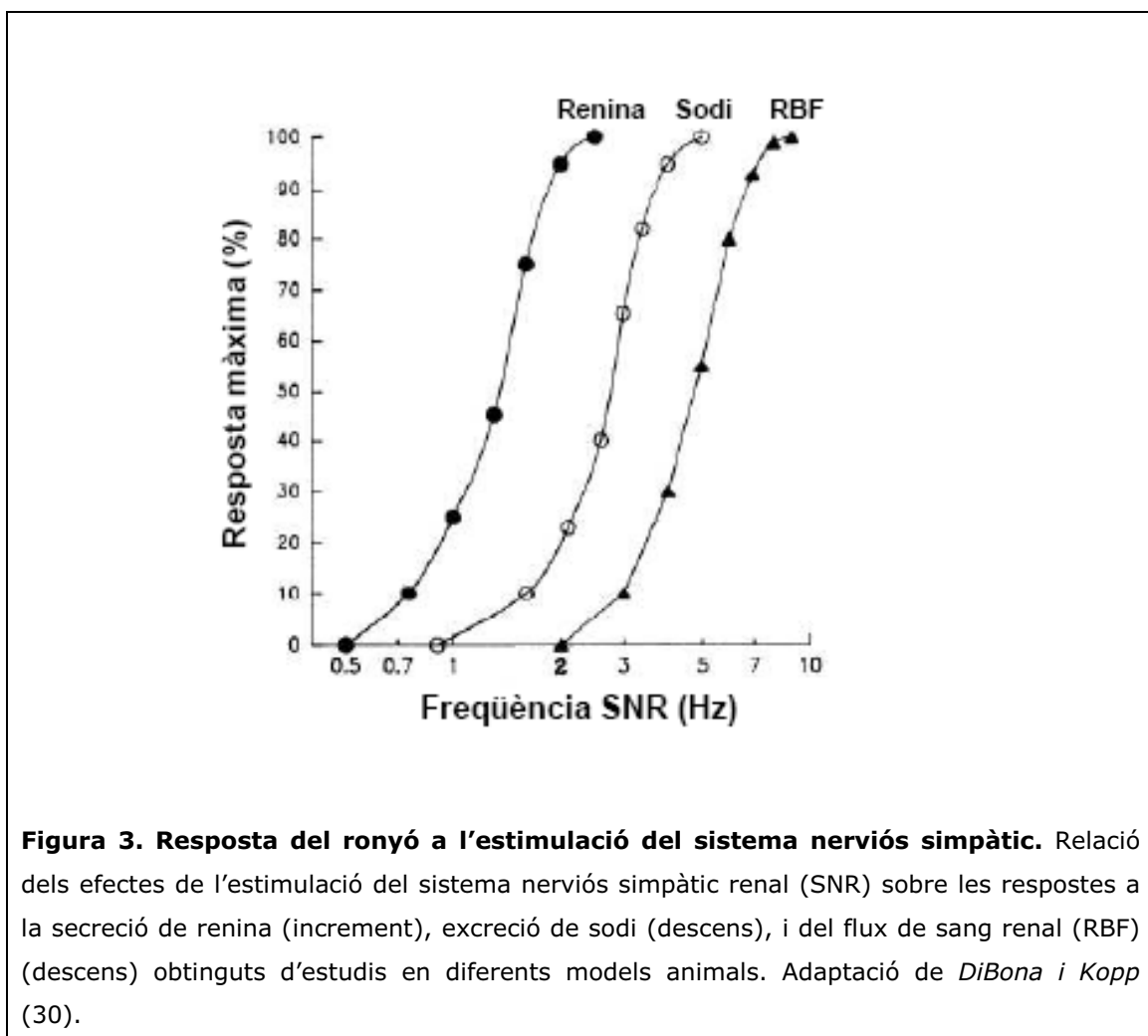
El ronyó és l'òrgan encarregat de mantenir el volum, la composició mineral i l'acidesa del fluid corporal mitjançant l'excreció i la reabsorció d'aigua i electròlits inorgànics, com per exemple: sodi, potassi, clor, calci, magnesi, sulfat, fosfat i hidrogenions. Aquest fet ajuda a mantenir els balanços correctes d'aquests ions en el cos i mantenir la seva concentració dins d'un rang adequat en el fluid extracel·lular.

El sistema nerviós autònom juga un paper clau en la regulació de les funcions renals mitjançant els sistemes simpàtic i parasimpàtic (30). Anatòmicament, *Muller i Barajas* ja van demostrar el 1972 com axons adrenèrgics i colinèrgics estaven en contacte directe amb diverses zones dels túbuls proximals i distals, només separats per la membrana basal (31). Actualment, se sap que els terminals pertanyents al sistema simpàtic estan en contacte directe amb les membranes basals de tots els segments tubulars, així com també amb les cèl·lules granulars juxtaglomerulars.

L'augment de la senyalització adrenèrgica al ronyó pot afectar tant la circulació renal com les funcions tubulars. A nivell circulatori, un augment de la senyalització adrenèrgica produeix una disminució del flux de sang renal (RBF), i per tant, de la taxa de filtració glomerular (GFR). A nivell tubular, un increment en la senyalització adrenèrgica produeix un augment de la secreció de renina per part de les cèl·lules juxtaglomerulars, així com també un increment de la reabsorció tubular de Na^+ . És important tenir en compte, però, que la intensitat de l'estímul nerviós necessària per desencadenar cadascuna d'aquestes respostes difereix lleugerament (veure figura 3). Així doncs, l'increment de la secreció de renina es dona en estímuls nerviosos d'intensitat sub-llindar per a la disminució de l'excreció de Na^+ en orina, i a la vegada, la disminució de Na^+ en orina es dona en estímuls d'intensitat sub-llindar per a la disminució del RBF. Inversament, estímuls que disminueixen el RBF comporten també augments de la secreció de renina i de la reabsorció tubular de Na^+ (30).

A nivell de receptors, els receptors adrenèrgics de tipus α_2 són els principals encarregats de regular l'alliberament de noradrenalina des dels terminals pre-sinàptics del ronyó (32). Aquests receptors poden ser activats per noradrenalina endògena, establint-se així un sistema de retro-inhibició. L'augment de la reabsorció tubular de Na^+ , i conseqüent disminució de l'excreció de Na^+ en orina, es dona mitjançant l'estimulació dels receptors α_{1B} -adrenèrgics en les cèl·lules de l'epiteli tubular renal (33), mentre que la disminució del RBF es dona a través dels receptors de tipus α_{1A} de les artèries renals (34). Finalment, l'augment de la secreció de renina

i la conseqüent activació del sistema renina-angiotensina es dona mitjançant l'activació dels receptors β -adrenèrgics de les cèl·lules granulars juxtaglomerulars (35). L'activació dels receptors β -adrenèrgics i la conseqüent activació de la via del cAMP i PKA a través dels receptors units a proteïna G_s és el principal estímul per tal que les cèl·lules juxtaglomerulars secretin els grànuls de renina (36). Contràriament, estímuls que augmentin el Ca^{2+} intracel·lular de les cèl·lules juxtaglomerulars disminueixen aquesta secreció de renina. Per tant, agents vasoconstrictors com ara l'angiotensina II, l'endotelina, la vasopressina i la noradrenalina són capaços de disminuir la secreció de renina (36), en el que es podria entendre com un sistema de regulació local de la secreció de renina.



La senyalització adrenèrgica al ronyó té un efecte cabdal en el control de la pressió sanguínia de l'organisme. L'excés de senyalització adrenèrgica és la causa principal d'una de les malalties més esteses actualment com és la hipertensió. De fet, s'ha demostrat que la senyalització adrenèrgica es troba incrementada en varies

formes d'hipertensió, com ara la hipertensió essencial (37), la hipertensió relacionada amb l'obesitat (38) o la preeclàmpsia (39). També trobem alts nivells de senyalització adrenèrgica en pacients amb insuficiència renal crònica (CRF) (40;41), fins al punt en què els nivells de noradrenalina plasmàtica són indicadors tant de la supervivència com dels incidents cardiovasculars en pacients amb malaltia renal en etapa final (42).

A nivell histològic, l'augment de la senyalització adrenèrgica pot causar atròfia i dilatacions dels túbuls, així com també l'augment de la infiltració de monòcits. De fet, hi ha un increment de l'expressió del Factor de Creixement Transformant β (TGF- β) que es correlaciona amb un augment de la deposició de col·lagen de tipus IV a l'espai intersticial (43;44). La hiperactivitat del sistema nerviós simpàtic, a més a més, també contribueix a l'aparició de glomeruloesclerosi (45), així com a l'acceleració de l'aterosclerosi, la vasoconstricció i la proliferació de cèl·lules musculars llises i fibroblasts en les parets dels vasos (46). L'augment de la senyalització adrenèrgica també sembla jugar un paper important en la inducció de les lesions provocades per la isquèmia/reperfusió (47). Tots aquests efectes contribueixen a la progressió del dany renal.

L'origen de la hipertensió no es deu únicament a l'augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic, sinó a la interacció entre diferents processos com són l'estrès oxidatiu, la inflamació i el ja comentat augment de la pressió arterial. Independentment de quin d'ells sigui el desencadenant, qualsevol dels tres processos és capaç d'activar els altres dos, formant-se un bucle de retroalimentació positiva; si no s'interromp, aquest bucle acaba provocant la progressiva aparició de vasculopaties i danys cardíac i renal acompanyats de disfunció (48).

1.2. Receptors ErbB

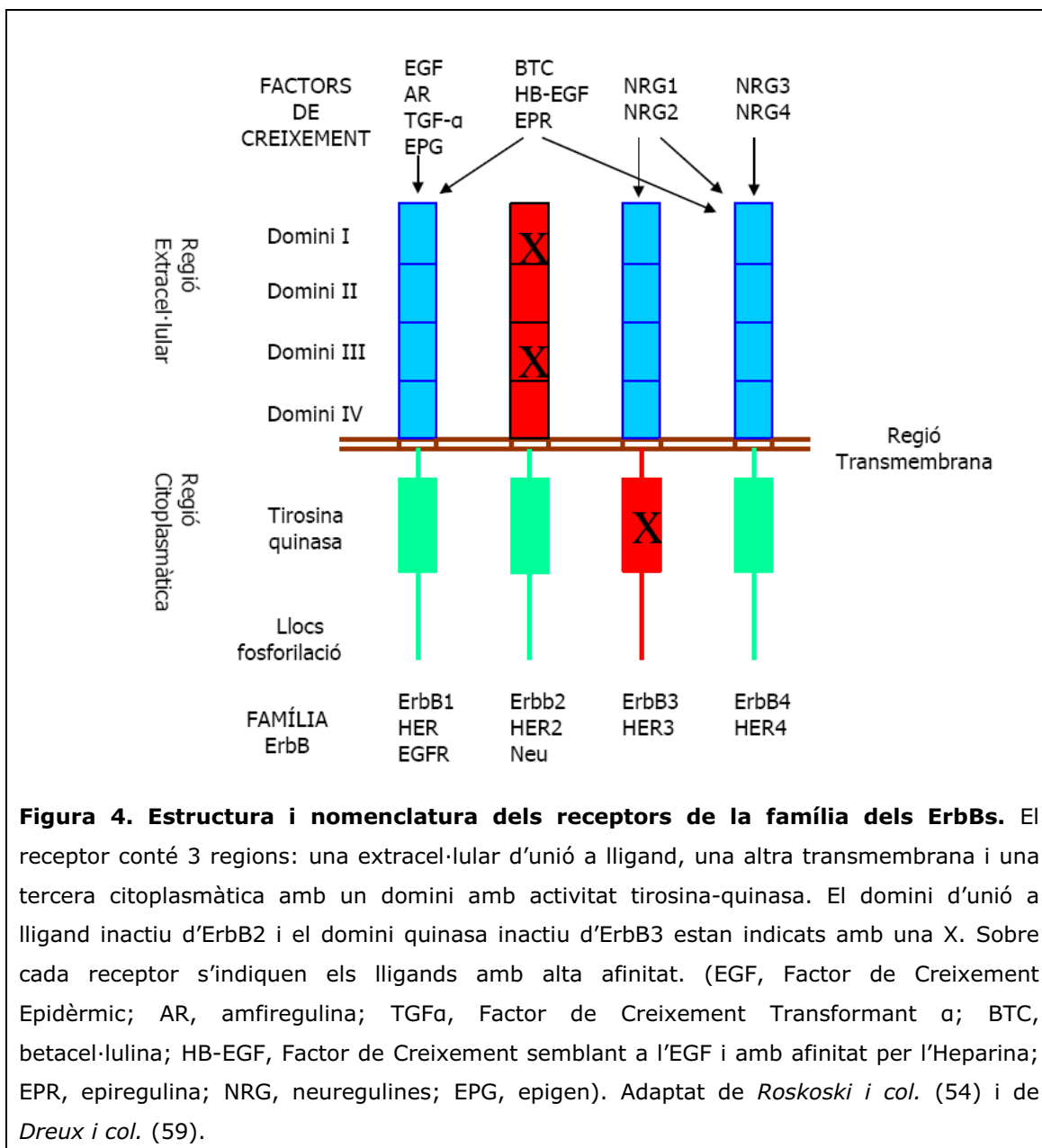
Els receptors ErbB, pertanyen a la subclasse I de la família de receptors amb activitat tirosina quinasa. Aquesta família, que rep el seu nom per ser l'homòleg cel·lular de l'oncogen v-erbB (responsable de l'eritroblastosi aviar de tipus B), està formada per quatre membres: el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, també anomenat ErbB1 o HER-1), ErbB2 (Neu o HER-2), ErbB3 (HER-3) i ErbB4 (HER4) (49;50). Aquests receptors han desvetllat un interès creixent ja que s'ha anat descobrint que alteracions en la seva expressió i/o activitat estan en la base de multitud de càncers diferents (51;52).

En condicions fisiològiques normals, l'activació dels receptors ErbB és controlada per l'expressió espacial i temporal dels seus lligands, els quals són membres de la família de factors de creixement de l'EGF (53). La complexitat del sistema és gran, ja que un únic receptor pot ser activat per diferents lligands, i un mateix lligand pot activar diferents receptors (53;54) (veure figura 4). Dins els lligands de la família de l'EGF diferenciem tres grups: el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement transformant α (TGF- α), l'amfiregulina (AR) i l'epigen (EPG) s'uneixen únicament al receptor ErbB1; per altra banda, el factor de creixement epidèrmic semblant a l'EGF i amb afinitat per l'heparina (HB-EGF), la betacel·lulina (BTC) i l'epiregulina (EPR) tenen la capacitat d'unir-se tant a ErbB1 com a ErbB4. El tercer grup el formen les neuregulines (NRG). Hi diferenciem dos subgrups: les que són capaces d'unir-se tant a ErbB3 com a ErbB4, és a dir, la NRG-1 i la NRG-2, i les que només tenen la capacitat d'unir-se a ErbB4, com són la NRG-3 i la NRG-4.

La unió del lligand al receptor indueix la formació de diferents homo- o heterodímers, activant així el domini intracel·lular amb activitat tirosina quinasa dels receptors i provocant la fosforilació de residus de tirosina específics del seu domini citoplasmàtic. Aquests residus fosforilats serveixen d'ancoratge a una sèrie de proteïnes senyalitzadores, les quals acaben desencadenant l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular (49;55).

Actualment no es coneix cap lligand específic per a ErbB2, però sí que se sap que dimeritza amb els altres receptors de forma preferent (56). A més a més, la formació de dímers amb ErbB2 incrementa l'estabilitat del dímer, i quan dimeritza amb ErbB1 en limita la internalització i degradació lisosomal (50).

Per altra banda, ErbB3 conté un domini d'unió a lligand funcional, però li manca l'activitat tirosina quinasa degut a unes substitucions en residus crítics en aquest domini (57). Fins recentment, aquest fet feia pensar que, igual que ErbB2, per a poder dur a terme la seva funció biològica, ErbB3 havia de formar dímers necessàriament amb altres membres de la família que poguessin fosforilar-lo. En un estudi publicat aquest 2010 per *Shi i col.* (58), però, aquests autors intenten demostrar com malgrat les substitucions crítiques esmentades anteriorment, el domini tirosina quinasa d'ErbB3 encara reté suficient activitat com per poder fosforilar el seu propi domini citoplasmàtic.



1.2.1. Estructura molecular

Els receptors ErbB mantenen un alt percentatge d'homologia entre les seves seqüències, que va des d'un 53% entre ErbB1 i ErbB3, fins a un 64% entre ErbB1 i ErbB2 (60). El domini més conservat és el que conté l'activitat tirosina quinasa, mentre que la zona més heterogènia és la C-terminal. En general, els quatre receptors ErbB comparteixen una arquitectura molecular comuna, representada a la figura 4 i comentada en detall pel receptor ErbB1.

ErbB1 és una glicoproteïna transmembrana inicialment sintetitzada amb 1210 aminoàcids i processada pel seu extrem N-terminal, originant-se així una proteïna de 1186 aminoàcids i un pes molecular aproximat de 170 kDa que és transportada a la membrana plasmàtica (61). Estructuralment els receptors ErbB, en aquest cas ErbB1, es troben dividits en 4 parts:

- (a) una zona extracel·lular caracteritzada per la presència de 4 dominis, dos d'ells rics en cisteïnes i implicats en la dimerització (62), i dos més implicats en la unió del lligand, en aquest cas l'EGF (63).
- (b) una zona hidrofòbica formada per 23 aminoàcids que s'estén per la membrana cel·lular, la integritat de la qual és essencial per a la correcta transducció del senyal.
- (c) una zona juxtamembrana, implicada en la modulació de les funcions del receptor; en aquesta zona es troben la Thr654, diana per a la PKC, i la Thr669, la fosforilació de les quals inhibeixen l'activitat tirosina quinasa del receptor (64).
- (d) una regió citoplasmàtica dividida en dues sub-regions; en una hi trobem el domini amb activitat tirosina-quinasa, i en l'altre, situat a l'extrem carboxiterminal, hi trobem una sèrie de diferents tirosines fosforilables: Y-992, Y-1045, Y-1068, Y-1086, Y-1148 i Y-1173 (55).

Segons el model proposat per *Ullrich i Schlessinger* l'any 1990 (65), la regió extracel·lular se subdivideix en 4 dominis (I-IV). Quan els receptors no estan units a cap lligand, els dominis II i IV es troben íntimament units mitjançant ponts disulfur formats entre els diferents residus de cisteïna presents en els dos dominis. A més a més, el domini II presenta una protuberància (braç de dimerització) que en estat basal queda amagada a l'interior de l'estructura. La unió del lligand a la regió compresa entre els dominis I i III provoca un canvi conformacional i l'alliberament del braç de dimerització, fent-lo accessible a altres receptors i possibilitant així la dimerització entre aquests (60;66;67).

En el cas d'ErbB2, canvis en residus específics dels dominis extracel·lulars impossibiliten la unió dels lligands coneguts fins ara; interaccions directes entre els dominis I i III, que no es donen en els altres receptors, redueixen l'espai necessari per interaccionar amb un lligand. Addicionalment, alguns d'aquests canvis també

distorsionen la unió entre els dominis II i IV, de manera que el braç de dimerització queda constantment exposat (68). Per aquestes raons, ErbB2 no només no uneix cap lligand, sinó que a més a més sempre està en una conformació activa, preparada per dimeritzar amb qualsevol altre receptor.

Com acabem de dir, la unió dels lligands als receptors ErbB indueix la seva dimerització. Aquests canvis conformacionals, però, no només afecten als dominis extracel·lulars, sinó que també s'estenen als dominis citoplasmàtics, produint un augment de l'activitat tirosina quinasa intrínseca dels receptors. Aquesta activació comporta la fosforilació en *trans* o en *cis* de les tirosines dels extrems carboxiterminals. Aquestes tirosines fosforilades atrauen una sèrie de proteïnes que s'uneixen als receptors de forma directa o indirecta a través de proteïnes adaptadores. Aquestes unions es donen a través de dominis SH2 (Src homology 2) i PTB (phosphotyrosine binding), ambdós amb afinitat per les fosfotirosines (55). La unió o no d'una proteïna amb un domini SH2 a una fosfotirosina també depèn de la seqüència que envolta aquesta fosfotirosina. Així doncs, les diferències en la zona carboxiterminal de cadascun dels receptors ErbB impliquen que diferents grups de proteïnes s'uniran a diferents receptors, incrementant així les diferències en la senyalització entre els diferents receptors (Figura 5). Per afegir més complexitat al sistema, els receptors ErbB són capaços de fosforilar ells mateixos algunes de les proteïnes unides a la seva zona carboxiterminal, activant-les o produint així més llocs d'unió per altres proteïnes amb dominis SH2 o PTB (55).

A la figura 6 podem observar de forma esquemàtica les diferents vies principals de senyalització implicades en l'acció biològica dels ErbB, que són:

- Cascada de les MAP-quinases: la proteïna adaptadora Grb2 s'uneix al receptor activat mitjançant dominis SH2 i atrau a la proteïna Sos cap a la membrana plasmàtica (69), on activen la proteïna Ras pel bescanvi de GDP per GTP. Posteriorment, Ras s'uneix a la Ser/Thr-quinasa Raf-1, activant finalment la cascada de les MAP-quinases (70). La unió de Grb2 també pot ser indirecta, via la proteïna Shc, que s'uneix al receptor gràcies a dominis SH2, i una vegada fosforilada, s'uneix a Grb2 també mitjançant dominis SH2.
- Fosfolipases: tant la fosfolipasa D₂ com la fosfolipasa C_γ (PLC_γ) són activades pels receptors ErbB, sent l'activació de la PLC_γ la més estudiada (71).

Aquesta activació genera IP₃, el qual permet la mobilització de calci des del reticle endoplàsmic, i DAG, que juntament amb el calci, activen la PKC (72).

-Fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K): la subunitat reguladora, p85, s'associa als receptors mitjançant dominis SH2 i activa així la subunitat catalítica, p110 (73). La síntesi de PIP₃ facilita la translocació a la membrana plasmàtica de la proteïna quinasa B (PKB o Akt) unint-se al PIP₃. Allà és activada mitjançant una fosforilació per part de la serina/treonina quinasa PDK-1 (quinasa dependent de fosfatidils inositols).

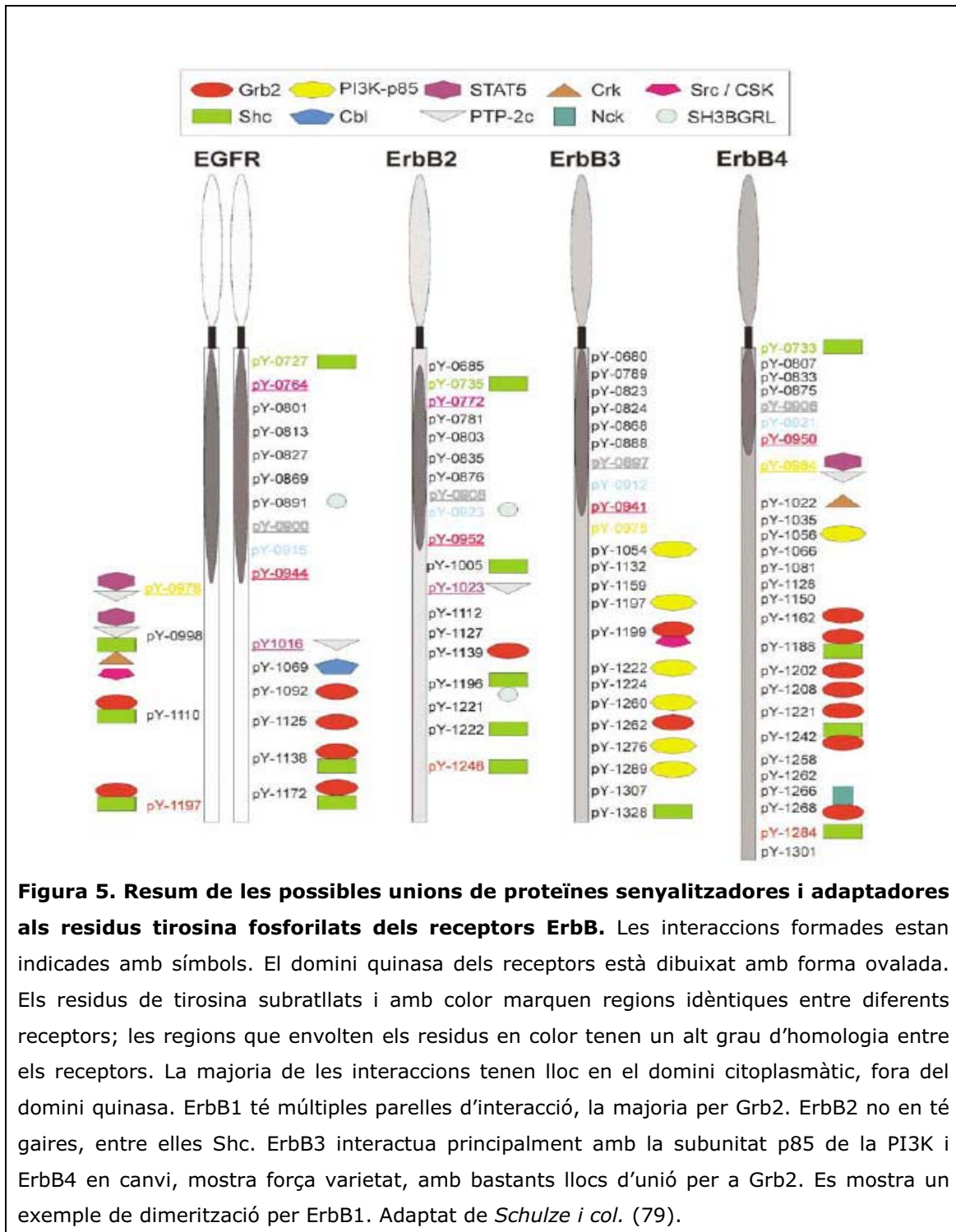
-Src: és un membre de la família de les proteïnes tirosina-quinasa citosòliques. La seva implicació en la senyalització dels ErbB és àmpliament reconeguda, tot i que no queda clar si és activada pel receptor o, contràriament, participa en l'activació d'aquest independentment de la presència de lligand, mitjançant la transactivació. Entre algunes proteïnes activades per Src, destaquen la PI3K (fet que permet l'activació indirecta d'aquesta per ErbB1) i la proteïna GAP, ambdues molt implicades en la reestructuració del citoesquelet.

A banda d'aquestes cascades, existeixen algunes proteïnes inactives que es troben associades directament al receptor no fosforilat, i només són activades o translocades a una altra localització cel·lular quan el receptor s'uneix al seu lligand. Aquest és el cas, per exemple, dels factors de transcripció STAT units a ErbB1, concretament les isoformes 1, 3 i 5 (74;75).

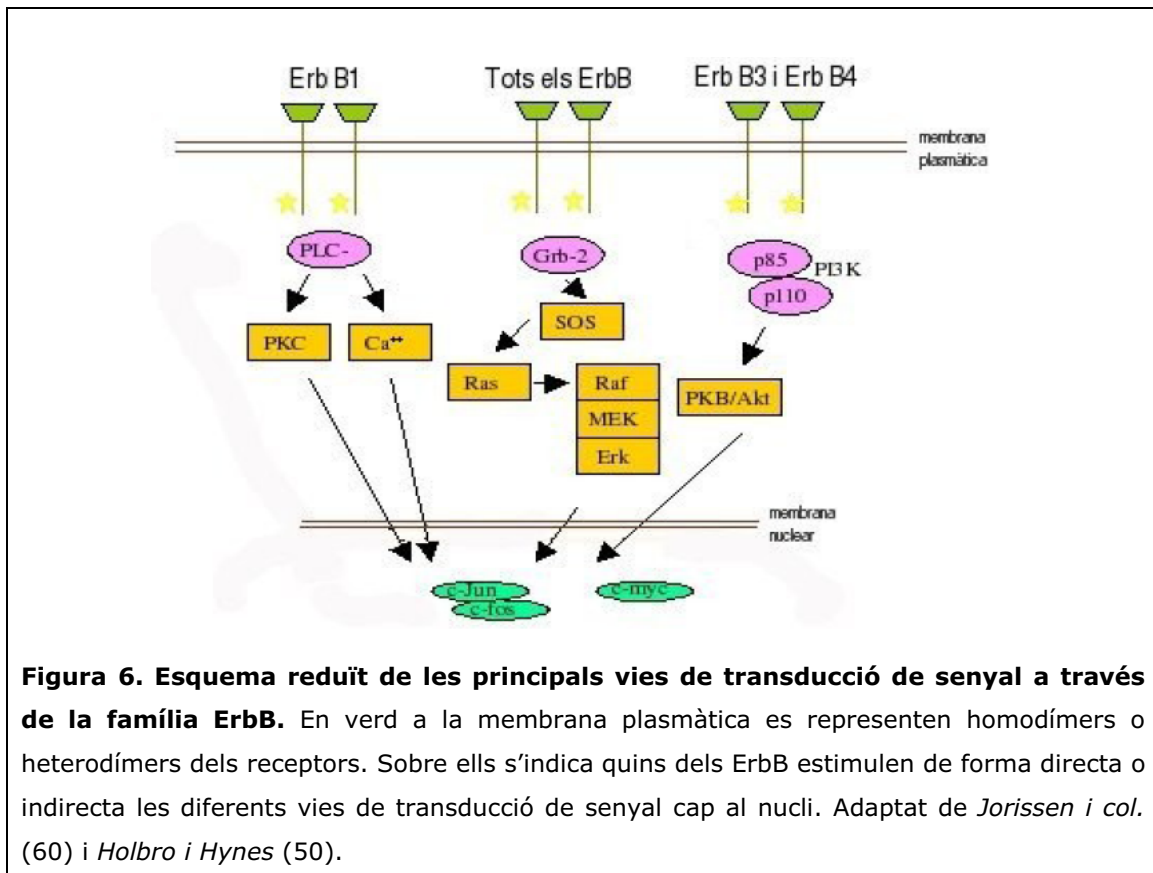
Com es pot veure a la figura 5, les diferents vies activades pels ErbB depenen majoritàriament de les afinitats de les proteïnes senyalitzadores per les diferents tirosines fosforilades dels extrems carboxiterminals dels receptors. Així doncs, per exemple, podem veure com tots els receptors tenen la capacitat d'activar la via de les MAP quinases, mentre que només ErbB1 és capaç d'activar la PLC γ (55).

Aproximadament d'un 40 a un 60 % dels receptors ErbB presents a la membrana plasmàtica es troben localitzats en uns microdominis anomenats caveoles (76). Aquesta localització, però elevada, densitat de receptors es pot entendre com un mecanisme per a estimular la formació de dímers inactius a l'espera de l'arribada del lligand (60). En el cas d'ErbB1, la unió del lligand indueix una migració dels receptors cap a regions riques en clatrina, on es produeix una ràpida internalització del

receptor mitjançant vesícules de clatrina (77;78). Després de la internalització, els complexos van a parar a endosomes primaris. Durant el període pel compartiment endosomal els receptors poden reciclar-se i tornar a la superfície cel·lular o bé dirigir-se cap als endosomes tardans i lisosomes, lloc on tant el lligand com el receptor són proteolíticament degradats (77;78). En el cas dels altres receptors (ErbB2-4), el



procés d'internalització també té lloc, però a una taxa molt més lenta que no pas la d'ErbB1. De la mateixa manera, la seva degradació lisosomal també és més reduïda (77). Tot i que la transducció del senyal comença a nivell de la superfície cel·lular, aquest fenomen no queda restringit a aquest compartiment; hi ha evidències de que també hi ha transducció del senyal a través dels receptors localitzats al compartiment endosomal (80).



Aquest sistema d'internalització dels receptors després de ser activats es pot entendre com una manera de regular la duració i la intensitat de la senyalització per part de la cèl·lula. No obstant, hi ha casos en què el sistema escapa al control cel·lular. Per exemple, s'ha vist com la sobreexpressió d'ErbB2 inhibeix la internalització d'ErbB1 i en provoca la conseqüent activació constitutiva (81).

1.2.2. Distribució tissular

L'expressió dels receptors ErbB durant les fases del desenvolupament oscil·la àmpliament. La seva categoria de receptors de factors de creixement els atorga un paper molt important durant la fase embrionària. Això no vol dir, però, que en

l'animal adult la seva expressió desaparegui, però sí que en general es redueix. A l'organisme adult, els receptors ErbB s'expressen en una gran varietat de teixits d'origen epitelial, mesenquimal i neuronal. Estudis immunohistoquímics en teixits humans d'individus adults mostren com aquests receptors estan àmpliament distribuïts a l'organisme; els trobem al tracte gastrointestinal, urinari i respiratori, així com també al sistema circulatori, nerviós i reproductiu. Evidentment, també els trobem a la pell (veure taula 1).

	ErbB1 ^a	ErbB2 ^b	ErbB3 ^c	ErbB4 ^d
Estómac	-	+	++	++
Fetge	++	-	++	++
Pàncrees (acinus)	++	-	-	+
Bronquis	++	++	++	++
Còrtex adrenal	-	-	+++	++
Medul·la adrenal	-	-	+	+
Cervell	-	-	+++	+
Testicles	-	-	++	+
Ovaris	-	+	++	+
Epidermis	++	++	++	++

Taula 1. Expressió dels ErbBs a diferents òrgans i teixits humans. Els teixits van ser puntuats amb una escala semi-quantitativa basada en la intensitat del marcatge: negatiu (-); suauement positiu (+); moderadament positiu (++); fortament positiu (+++). a, descrit per *Damjanov i col.* (82); b, descrit per *Press i col.* (83); c, descrit per *Pringent i col.* (84); d, descrit per *Srinivasan i col.* (85).

1.2.3. Activitat biològica dels ErbB

El sistema de receptors ErbB és essencial per l'organisme, tant durant l'ontogènia com en la vida adulta. Estudis realitzats en animals *knock-out* per cadascun dels receptors han mostrat la seva letalitat ja en l'estadi embrionari. Així, mitjançant ratolins *knock-out* per ErbB1 es va demostrar com aquest receptor és essencial pel correcte desenvolupament de l'embrió, o en el millor dels casos, del nounat. Els animals transgènics moren en estat embrionari (aproximadament als 15 dies) o bé arriben a néixer, en funció del seu fons genètic. En tots els casos, però, la seva viabilitat es troba altament reduïda i en cap cas superen els pocs dies de vida.

Els animals presenten greus defectes en el desenvolupament de l'intestí, els ronyons, els pulmons, i una hipertròfia evident de les vàlvules cardíques (86-88). Ja en l'animal adult, s'ha vist com la inhibició específica d'ErbB1 en cardiomiòcits mitjançant la inducció d'un receptor dominant-negatiu provoca hipertròfia cardíaca, juntament amb l'aparició de lesions i una disfunció contràctil (89).

S'han aconseguit 4 *Knock-out* diferents per a ErbB2. Els convencionals moren durant la gestació (aproximadament el dia 10 de la fase embrionària) degut a la malformació de les trabècules del cor, estructures imprescindibles per a la correcta funció contràctil del cor embrionari (90). El fet que els animals morissin en un estadi tant inicial, i les sospites de la més que probable implicació d'ErbB2 en el desenvolupament del sistema nerviós degudes a la seva presència notable en la majoria d'estructures nervioses, va portar a la generació d'un *Knock-out* amb l'expressió cardíaca d'ErbB2 parcialment recuperada. Aquests animals moren en fase perinatal, amb greus defectes en el desenvolupament del sistema nerviós perifèric i insuficient maduració de les glàndules mamàries (91). Mutants condicionals pel sistema nerviós han demostrat la importància d'ErbB2 en el manteniment del sistema nerviós entèric (92). També s'han generat mutants condicionals cardíacs, que tot i sobreviure a la fase perinatal, a les poques setmanes desenvolupen un procés molt similar al de la cardiomiopatia dilatada, amb aprimament de les parets dels ventricles i dilatació de les cambres ventriculars (93;94). La funció contràctil d'aquests cors també està altament deprimida. A nivell cel·lular, s'observen cardiomiòcits clarament hipertrofiats .

En el cas d'ErbB3, només s'ha desenvolupat un *Knock-out*, el qual també mor en fase embrionària, aproximadament als 13 dies. Aquests animals presenten deficiències greus en la formació dels cúmuls endocàrdics i en el desenvolupament tant del sistema nerviós central com del perifèric (95).

Pel que fa a ErbB4, s'han desenvolupat 4 models animals *Knock-out*. El primer, un *Knock-out* clàssic, mor durant la fase embrionària, més o menys als 10 dies, amb una clara manca de desenvolupament de les trabècules i del sistema nerviós central (96). En altres dos models animals modificats genèticament (amb expressió d'ErbB4 ventricular recuperada o condicionals pel sistema nerviós), els animals superen la fase perinatal però mostren greus defectes en el desenvolupament del sistema nerviós (97), i un d'ells també de les glàndules mamàries (98). Finalment, animals adults mutants condicionals d'ErbB4 en el múscul cardíac pateixen una severa cardiomiopatia dilatada, escurçant la seva supervivència. Aquests animals presenten

dilatació ventricular, una reducció de la contractilitat i un retardament de la conducció de l'estímul elèctric (99). De fet, aquests trets resembren el fenotip observat en animals amb una inactivació condicional d'ErbB2 a cor (94), apuntant a la teoria que els dos receptors actuen conjuntament en el manteniment de l'estructura d'aquest òrgan.

1.3. La família del factor de creixement epidèrmic

L'EGF pertany a una família de proteïnes amb un elevat grau d'homologia, anomenada família de l'EGF, els membres de la qual actuen com a lligands dels receptors de la família ErbB (53). Els membres d'aquesta família de lligands són: el mateix EGF, el TGF- α , l'HB-EGF, l'AR, l'EPR, la BTC, les 4 neuregulines (NRG-1, NRG-2, NRG-3 i NRG-4) i l'EPG. Durant el transcurs d'aquesta tesi ens hem centrat sobretot en els efectes produïts tant per l'EGF com per la NRG-1 β ; és per això que en aquesta introducció ens centrarem sobretot en ells.

Tant l'EGF com les NRGs presenten una sèrie de característiques estructurals comunes:

- Comparteixen l'anomenat domini "EGF-like" o domini d'homologia amb l'EGF, un domini d'aproximadament 6-9 kDa on es troben altament conservats sis residus de cisteïna que formen tres ponts disulfur per a poder desenvolupar la seva activitat biològica (100).
- Se sintetitzen com a precursors, amb un domini hidrofòbic que permet el seu ancoratge a la membrana plasmàtica. Tot i que s'han descrit efectes de tipus autocrí o juxtacrí atribuïbles als precursors, en general, són processats per a originar factors solubles. Les proteases de la família ADAM ("a disintegrin and metalloprotease") són considerades a dia d'avui les màximes responsables del processament dels diferents precursors.

1.3.1. EGF

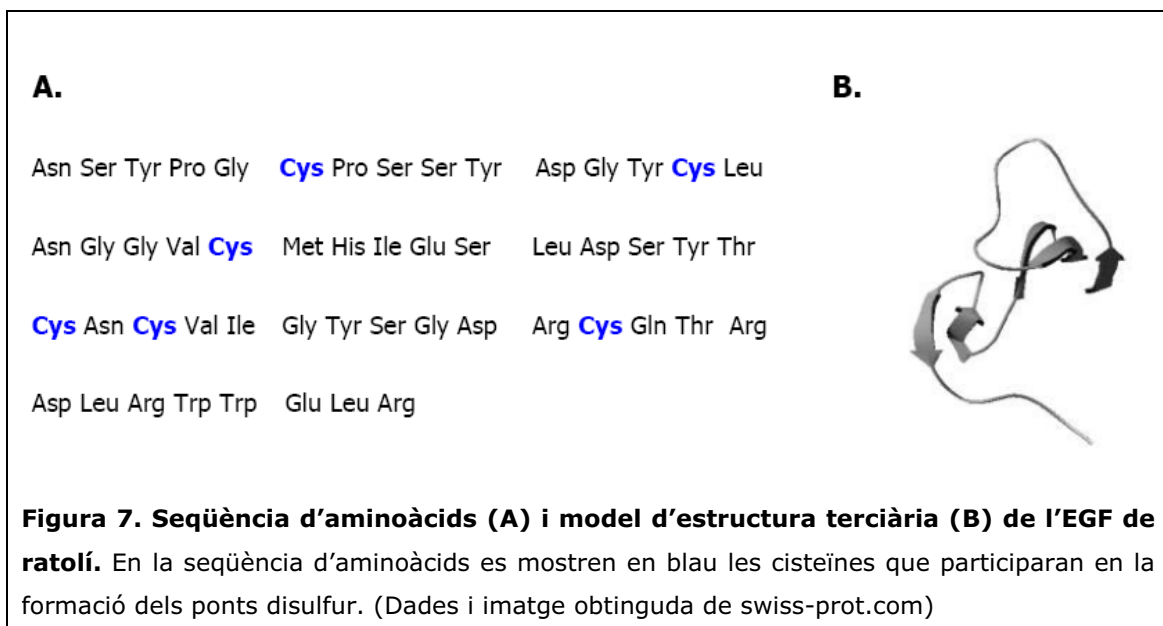
1.3.1.1. Estructura molecular i característiques generals

L'EGF va ser descobert per Stanley Cohen l'any 1960 (101) 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.

El seu precursor (de 1217 aminoàcids i aproximadament 160 kDa) s'anomena prepro-EGF (102). La regió corresponent a l'EGF madur està situada a prop de l'extrem C-terminal (residus 971-1023). També 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 (103). Es considera a l'ADAM 10 la màxima responsable del processament del prepro-EGF (104).

L'EGF de ratolí és un polipèptid no glicosilat de cadena simple constituït per 53 aminoàcids (Figura 7) amb un pes molecular de 6 kDa (105), el qual té una gran termoestabilitat i una elevada resistència a la digestió per tripsina, quimotripsina i pepsina.



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 (106).

1.3.1.2. Síntesi i distribució

Les glàndules submaxil·lars són el principal lloc de síntesi, emmagatzematge i secreció d'EGF en els ratolins. La síntesi té lloc més concretament a les cèl·lules granuloses dels túbuls contornejats, on també se sintetitzen altres pèptids biològicament actius com, per exemple, el NGF i la renina (107). En humans la concentració d'EGF a les glàndules salivals és molt inferior, i sembla ser que les glàndules paròtides serien les principals encarregades de la seva secreció (108). A la taula 2 es troben representades de forma resumida les concentracions d'EGF determinades a diferents teixits i fluids del ratolí.

Teixits		Fluids	
SMG (nmol/g)		Plasma	0,17 ± 0,04
Nounats	0,19 ± 0,04	Bilis	28 ± 17
Femelles adultes	5 ± 1	Orina	83 ± 26
Mascles adults	141 ± 7		
Fetge (pmol/g)	53 ± 5		
Ronyó (pmol/g)	54 ± 4		
Cor (pmol/g)	ND		

Taula 2. Concentració d'EGF en teixits i fluids de ratolí. Es mostren mitjanes i errors estàndard. ND, no detectable. Obtingut de *Grau i col.* (109).

Els estímuls de tipus α_1 -adrenèrgics produeixen una ràpida secreció d'EGF des de les glàndules submaxil·lars, el qual va a parar majoritàriament a la saliva (secreció exocrina), tot i que una fracció va a parar directament a la sang (secreció endocrina) (110;111). En condicions basals trobem unes concentracions d'EGF en saliva de 150 nM; en canvi, la concentració en plasma és molt menor, al voltant de 0,2 nM (109). En models més fisiològics d'estimulació adrenèrgica, com ara l'estrès provocat per la confrontació entre mascles, la concentració d'EGF en plasma pot augmentar gairebé 1000 cops respecte al basal, fins a valors propers a 100 nM (112).

El fetge sintetitza EGF (113), però també és el màxim responsable de l'aclariment plasmàtic de l'EGF. Durant aquest procés en deriva un petit percentatge

cap a la bilis (114;115), on la concentració aproximada d'EGF és de gairebé 30 nM (109).

En el ronyó de ratolí es detecten grans quantitats d'mRNA del seu precursor, però no d'EGF, ja que aquest és ràpidament excretat a l'orina (116), on la seva concentració és molt elevada (prop de 100 nM) (109;117). Aquesta secreció és sensible a l'activació de receptors β -adrenèrgics (118). Cal dir que el ronyó 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 (111). També al tracte gastrointestinal trobem EGF: pàncrees, estómac, intestí (amb un gradient pròximo-distal), còlon, i també als diferents fluids que en deriven, com el suc gàstric, pancreàtic o duodenal (107;117). Les glàndules de Brunner, localitzades en la submucosa del duodè proximal, són, juntament amb les glàndules submaxil·lars i el ronyó, un lloc de síntesi força important.

Altres teixits on es pot trobar EGF són la glàndula tiroide, els testicles, el cervell, els pulmons, les glàndules lacrimals, pituitària i adrenals (107;117), però sempre en concentracions molt més baixes. Alguns llocs són de síntesi, encara que molt menys importants que els descrits anteriorment, i altres, en canvi, reben l'EGF procedent de la circulació.

1.3.1.3. Activitat biològica

L'EGF té funcions rellevants tant en l'ontogènia com en l'animal adult. S'ha pogut observar que la deficiència materna d'EGF durant la gestació incrementa el percentatge d'avortaments en el ratolí (119). Complementant aquesta informació, en un altre treball on s'administrava EGF a rates gestants, s'observà una acceleració en el creixement del fetus (120). Tot i això, la producció de ratolins transgènics *Knock-out* pel gen de l'EGF no ha demostrat l'existència de cap anormalitat observable (121), a diferència del que succeeix amb el seu receptor (EGFR o ErbB1), el qual és indispensable pel correcte desenvolupament de l'individu, com hem comentat anteriorment.

En l'animal adult s'han descrit nombrosos efectes de l'EGF en diferents teixits i òrgans. Un dels més importants i més ben descrits és la funció citoprotectora del tracte digestiu. En humans, un dels primers efectes descrits per l'EGF (urogastrona) va ser la inhibició de la secreció gàstrica. La manca d'EGF endogen en el ratolí incrementa la susceptibilitat de patir úlceres gàstriques alhora que se'n retarda la

curació (122). De forma molt similar, en rates on s'indueïen ulceracions per estrès (123), tant l'EGF endogen com l'administrat experimentalment reduïen l'efecte ulcerós de l'estrès, bàsicament inhibint la secreció gàstrica i estimulant la mitosi de les cèl·lules de la mucosa.

A l'epidermis l'EGF indueix l'obertura prematura de les parpelles i l'erupció avançada dels incisius en ratolins nous nats. Aquest fet és conseqüència d'un increment del gruix i de la queratinització de l'epidermis (124;125). En l'animal adult s'ha descrit que l'EGF intervé en el manteniment del gruix de l'epidermis (126). En humans, l'EGF que s'allibera des de les plaquetes 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·lagen, totes aquestes respostes dirigides al tancament de la ferida (127). Recentment, s'ha descrit que l'ús terapèutic de gels amb EGF pot prevenir la formació anormal de col·lagen a les ferides, tenint així un efecte beneficiós per a la seva correcta cicatrització (128).

També s'han descrit efectes de l'EGF a l'aparell reproductor. Així, en femelles, els nivells d'EGF incrementen a la glàndula mamària durant la gestació, participant en el desenvolupament d'aquesta glàndula durant aquest període; posteriorment, durant el període de lactància, els nivells d'EGF recuperen els valors previs. Són moltes les hormones encarregades de controlar la unió de l'EGF a les glàndules mamàries, entre elles la prolactina, la progesterona, les hormones tiroïdals i els estrògens (129). En el cas dels mascles, s'ha descrit la síntesi d'EGF als testicles, on està implicat en la fase meiòtica de l'espermatogènesi (130) i en la capacitació de l'espermatozoide (131). Addicionalment, estimula la producció de testosterona per part de les cèl·lules de Leydig *in vitro* (132).

L'alliberament d'EGF des de les glàndules submaxil·lars sota estímuls α_1 -adrenèrgics va portar el nostre grup a estudiar l'acció de l'EGF sobre els efectes metabòlics de l'adrenalina i es va observar que l'EGF interfereix en alguns dels efectes metabòlics més característics de les catecolamines tant en el fetge com en el teixit adipós.

Tebar i col. (133) descriuen que en adipòcits aïllats de rata l'EGF disminueix la lipòlisi estimulada per l'isoproterenol (agonista β -adrenèrgic) i demostren que aquesta interferència es produeix a nivell de la interacció de les proteïnes G_s i G_i en el control de l'AC. Posteriorment, es van observar els mateixos efectes en l'animal sencer, on tant l'EGF alliberat per les glàndules submaxil·lars, com aquell administrat

exògenament, disminueixen la resposta lipolítica de l'adrenalina *in vivo* en el ratolí (134).

Per la seva banda, *Grau i col.* (135) van estudiar l'efecte de l'EGF en el metabolisme glucídic en el fetge. En primer lloc, van demostrar que l'efecte glicogenolític de l'adrenalina era mediat tant per l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics com dels α_1 -adrenèrgics. Quantitativament, l'increment de Ca^{2+} mediat pels receptors α_1 -adrenèrgics té una participació major que l'augment de cAMP mediat pels receptors β -adrenèrgics. L'EGF té un efecte anti-glicogenolític (136), actuant sobre el component β -adrenèrgic (135). En aquest òrgan, la disminució de la concentració de cAMP sembla implicar alguna fosfodiesterasa. Estudis posteriors del grup de Houslay van demostrar que quinases implicades en l'acció de l'EGF fosforilen i activen la fosfodiesterasa anomenada PDE4D1 (137).

L'EGF també juga un paper important en el cor i en el ronyó, tal i com comentarem més endavant (veure apartats 1.4 i 1.5).

1.3.2. Neuregulines

1.3.2.1. Estructura molecular i característiques generals

Les primeres notícies sobre les NRGs les trobem als anys 1992-1993, quan 4 grups van descriure el descobriment de 4 factors de creixement. Dos d'ells estaven cercant un lligand per al receptor ErbB2 (138;139). Un tercer grup cercava la identificació del factor responsable de l'estimulació de la proliferació de cèl·lules de Schwann (140;141). Finalment, el quart grup estava cercant el factor que incrementava la síntesi de receptors d'acetilcolina en el múscul, el neurotransmissor més expressat a les sinapsis neuromusculars en desenvolupament (142). Actualment, però, sabem que les quatre proteïnes aïllades per aquells grups estan codificades pel mateix gen, al qual ara anomenem NRG-1.

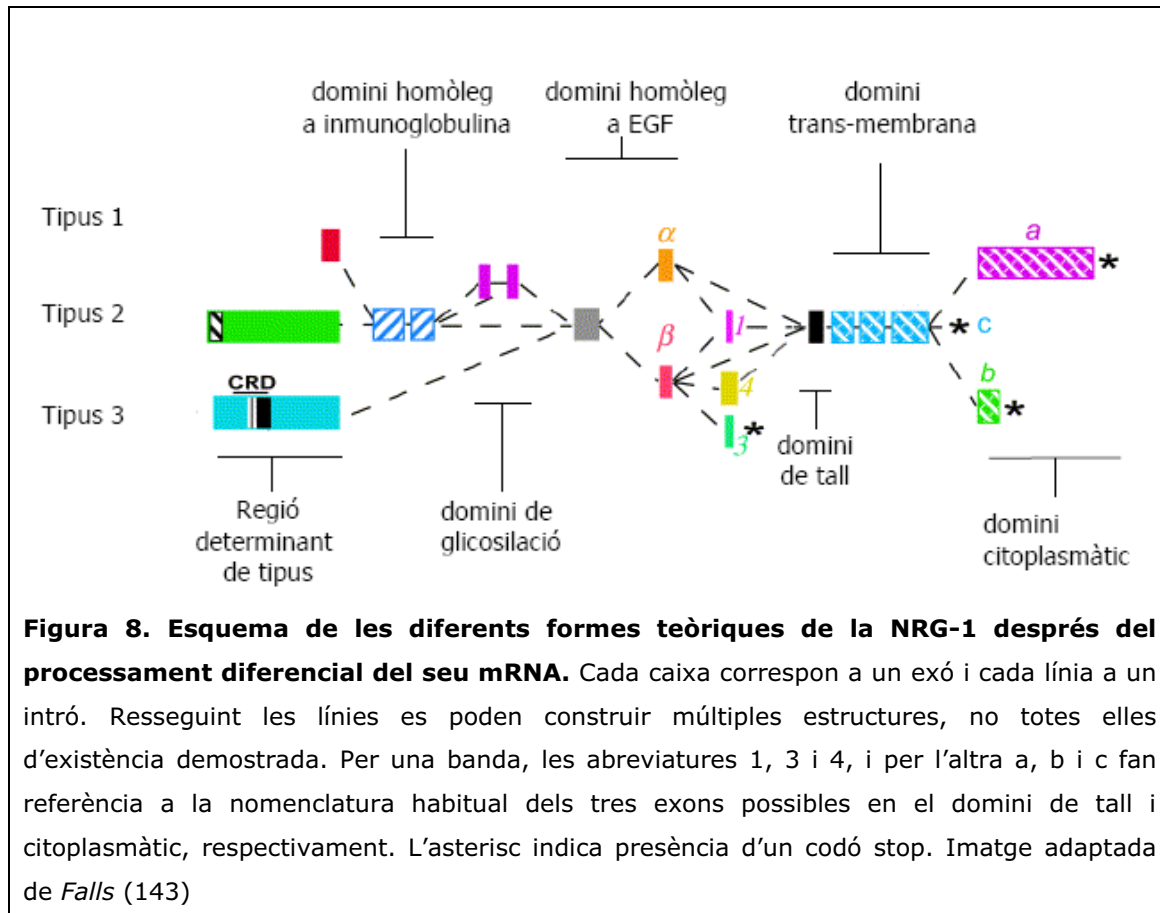
El diferent objectiu que va portar al descobriment de la NRG-1 ha fet que es conegui amb diferents noms, com són: factor diferenciador de Neu (NDF), heregulina (HRG), factor de creixement glial (GGF) i receptor inductor d'activitat acetilcolina (ARIA). Actualment es coneixen fins a 4 gens pertanyents a la família de les NRGs (NRG-1, -2, -3 i -4). En tots els casos, les NRGs s'originen mitjançant *splicing* alternatiu d'un dels quatre gens descrits, generant així múltiples variants.

Com a exemple, parlarem de la NRG-1, la més ben estudiada fins ara. Així doncs, el gen de la NRG-1 codifica almenys per a 15 variants obtingudes per *splicing* alternatiu i la utilització de diferents promotors (143). Totes les isoformes de la NRG-1 presenten un domini EGF, el qual és necessari i suficient per activar els seus receptors. L'*splicing* alternatiu afecta bàsicament a tres característiques estructurals de les NRGs que estan íntimament lligades a la seva funció *in vivo* i a les propietats biològiques de les cèl·lules (143). Aquests trets característics afecten:

- el tipus de domini EGF: diferències en l'*splicing* de la regió C-terminal del domini EGF origina les anomenades variants α i β .
- la seqüència N-terminal: l'*splicing* alternatiu en la zona N-terminal determina la generació de les isoformes classificades com a tipus I, II i III. Les isoformes I i II presenten un domini immunoglobulina a la regió extracel·lular. La diferència entre aquestes dues isoformes es troba en la presència d'un domini de funció desconeguda a l'extrem N-terminal en les de tipus II. Per altra banda, gran part de les isoformes de tipus I presenten un domini de N- o O-glicosilació entre els dominis Ig i EGF. Per altra banda, les isoformes de tipus III no presenten aquest domini Ig, però sí en canvi una regió rica en cisteïnes, la qual segurament és un domini transmembrana addicional.
- la síntesi de la NRG com a proteïna transmembrana o proteïna soluble: en funció del processament del domini de tall s'originen isoformes solubles o de membrana, mancades del domini transmembrana o no, respectivament.

A la figura 8 es mostra un esquema dels diferents processaments possibles per a la NRG-1.

Les formes no solubles (o pro-NRGs) són les precursoras de les formes solubles i són processades per les ADAM, especialment l'ADAM 17 i l'ADAM 19 (també anomenada meltrina- β) (104). Cal assenyalar, però, que el processament de la NRG-1 de tipus III no implica la seva solubilització, ja que es manté ancorada a la membrana gràcies a la presència d'un domini hidrofòbic a la seva regió determinant de tipus (143).



1.3.2.2. Síntesi i distribució

Les NRGs poden actuar tant de forma paracrina com juxtacrina. En el primer cas, les encarregades de portar a terme la senyalització són les NRGs solubles, mentre que en el cas de la senyalització juxtacrina, l'acció es dona mitjançant les formes ancorades a membrana, com per exemple, la NRG-1 de tipus III (143). En general, però, i a diferència de l'EGF, el radi d'actuació de les NRGs és de caire local.

La diferent expressió tant a nivell temporal com espacial de les NRGs suggereix l'existència de rols específics per cadascuna de les diferents isoformes. De les quatre NRGs, la NRG-1, que fins ara ha estat la més ben caracteritzada, mostra el patró d'expressió més ampli ja durant el desenvolupament embrionari i també en l'adult. La NRG-1 s'expressa sobretot en neurones i glia, però també en el cor, el fetge, l'estómac, el pulmó, el ronyó, la melsa i la pell (144). En el sistema nerviós, la NRG-1 s'expressa tant en neurones del sistema nerviós central com del perifèric (145). En el cervell, s'ha detectat la seva expressió en el còrtex, l'hipocamp i el cerebel en diferents tipus neuronals (piramidals, interneurons, cèl·lules de Purkinge del cerebel

i cèl·lules de Golgi, entre altres) (146). També s'ha observat la seva expressió en neurones motores.

L'expressió de la NRG-1 en el cor és detectable tant en estat embrionari com en l'animal adult. Les isoformes de la NRG-1 de tipus I són especialment abundants a l'endoteli de la microcirculació coronària i a l'endocardi, però no als cardiomiòcits (147). De les 15 isoformes detectades en diferents teixits, 11 s'expressen en el cor, 3 del sub-tipus α i 8 del sub-tiupus β . Quantitativament, però, les més abundants són les del sub-tipus α (148).

Les altres tres NRGs tenen un patró d'expressió bastant més reduït. La NRG-2 s'expressa sobretot en el sistema nerviós, especialment en el cerebel, l'hipocamp i en el bulb olfatori, però també s'ha trobat en el pulmó, el fetge i en el cor embrionari (149;150). L'expressió de la NRG-3 s'ha observat bàsicament en el sistema nerviós; concretament s'ha trobat en totes les regions del cervell excepte en el cos callós (151). Finalment, la NRG-4 s'ha localitzat en teixit muscular i sobretot en el pàncrees, però no en canvi, en el sistema nerviós (152).

1.3.2.3. Activitat biològica

Les NRGs tenen un paper fonamental en l'organisme, especialment durant el desenvolupament, però també en l'animal adult. Tant és així, que animals *Knock-out* per totes les isoformes de la NRG-1 moren molt aviat durant la fase embrionària, aproximadament als 10 dies (153). Aquests animals moren amb greus defectes cardíacs en les trabècules ventriculars, el septe atri-ventricular i en la formació dels cúmuls endocàrdics (153). També mostren una reducció important en el nombre de diferents tipus cel·lulars que deriven de la cresta neural, com són les cèl·lules de Schwann, la glia del sistema nerviós perifèric, neurones sensorials del crani i neurones del sistema simpàtic (154;155).

Per tal de poder aprofundir en el paper de la NRG-1, s'han generat diferents animals *Knock-out* que afectaven a diferents isoformes de la NRG-1. D'aquesta manera es va poder observar com animals en els quals s'havien inactivat totes les isoformes amb un domini Ig, és a dir els subtipus I i II, morien aproximadament als deu dies de la fase embrionària per problemes en el desenvolupament cardíac, de les neurones sensorials del crani i del sistema simpàtic (156). Això sí, presentaven un desenvolupament correcte dels precursors de les cèl·lules de Schwann. Per altra banda, animals on s'havia inactivat el domini CRD (tipus III), presentaven un fenotip

cardíac normal. Aquests animals morien al néixer perquè no podien respirar degut a la falta de sinapsis neuromusculars funcionals. També presentaven una reducció en el nombre de precursors de les cèl·lules de Schwann, una degeneració dels nervis perifèrics i cranials, i una reducció del 50% en el nombre de neurones sensorials i motores espinals (157).

Seguint el mateix plantejament, també es van generar animals *Knock-out* que inactivaven totes les isoformes α de la NRG-1. Aquests animals arribaven a la vida adulta i presentaven un desenvolupament cardíac i del sistema nerviós normal, però tenien greus defectes en el desenvolupament de la glàndula mamària (158). Els animals *Knock-out* per les isoformes β , en canvi, morien la majoria durant la fase embrionària, tot i que alguns arribaven a néixer (158).

La majoria de defectes observats en animals *Knock-out* per les diferents isoformes de la NRG-1 són també els mateixos que trobem en els animals *Knock-out* pels receptors ErbB. Aquest fet implica que la presència de les altres NRGs (NRG-2, -3 i -4) durant el desenvolupament no és tan essencial com la de la NRG-1. De fet, animals *Knock-out* per la NRG-2 no presenten defectes cardíacs i sobreviuen a la fase embrionària, tot i que després presenten un creixement inicial retardat i una menor capacitat reproductiva (159).

A part de les funcions comentades en el sistema nerviós i el cor, les NRGs també juguen un paper important en altres teixits com ara el múscul, on no només són fonamentals per la formació de les sinapsis neuromusculars, sinó que també participen en altres processos, com per exemple, la miogènesi. L'alliberament de NRGs des de mioblasts mononuclears promou la unió de diferents mioblasts per tal de formar miotubs multinucleats de manera autocrina (160). Posteriorment, durant el desenvolupament postnatal del múscul, les NRGs col·laboren, juntament amb el sistema nerviós, evitant l'apoptosi i promovent la supervivència de les fibres musculars (161). Les NRGs també juguen un paper important en el metabolisme muscular. Durant la contracció muscular, l'augment del Ca^{2+} intracel·lular activa el processament de les pro-NRGs mitjançant les metal·loproteases. Les NRGs aleshores promouen la translocació del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmàtica i el conseqüent augment de la captació de glucosa per part del múscul, en un efecte additiu al produït per la insulina (162).

1.4. El sistema ErbB en el cor

Tal i com ja hem comentat, el sistema que conformen els receptors ErbB i els seus lligands tenen un rol fonamental durant el desenvolupament cardíac. En l'adult, però, també estan implicats en una llarga sèrie de processos.

Per començar, ja hem esmentat anteriorment que animals adults *Knock-out* condicionals per ErbB2 (93;94) i ErbB4 (99) desenvolupen cardiomiopatia dilatada. En aquest sentit, també s'ha observat tant en animals com en humans, que en situacions de fallada cardíaca els nivells d'ErbB2 i ErbB4 es troben disminuïts en pacients en comparació amb els subjectes control (163;164), confirmant el paper essencial que tenen aquests dos receptors en el manteniment de l'estructura cardíaca. En el cas d'ErbB1, la seva inhibició mitjançant la inducció d'un receptor dominant-negatiu també comporta efectes deleteris en el cor, on trobem hipertròfia cardíaca, juntament amb l'aparició de lesions i una disfunció contràctil (89).

A nivell de lligands, s'han realitzat molts estudis en cultius cel·lulars on s'ha vist que molts processos estan regulats mitjançant la senyalització a través de la NRG-1 β i els seus receptors ErbB. Entre aquests processos trobem el creixement cel·lular. La NRG-1 β indueix la síntesi de proteïna i la hipertròfia cel·lular de miòcits neonatals en cultiu (165-167), així com també la proliferació de cardiomiòcits mononuclears diferenciats *in vivo* (168).

La NRG-1 β promou la supervivència cel·lular de cardiomiòcits en cultiu sense sèrum (165). Arrel del descobriment dels efectes cardiotòxics en pacients de càncer de la combinació del Trastuzumab, un anticòs humanitzat contra ErbB2, i les antraciclins, també es va observar que la NRG-1 β protegeix el cor de l'apoptosi produïda per l'administració d'antraciclins (169-173). L'addició de NRG-1 β evita l'aparició d'estrès oxidatiu (172;174) i la desestructuració de les miofibril·les (169), entre altres efectes. En general, la hipertròfia provocada per la NRG-1 β es dona principalment mitjançant l'activació de les quinases ERK1/2, mentre que els efectes anti-apoptòtics són fruit de l'activació de la via de la PI3K i Akt (166;170).

A part de jugar un paper important en la protecció de la integritat del teixit cardíac, el sistema NRG-1 β /ErbB també interacciona amb el sistema neurohormonal cardiovascular. Concretament, l'addició de NRG-1 β disminueix l'apoptosi provocada per l'adrenalina a cor (175) mitjançant el desplaçament de la corba dosi-resposta a l'isoproterenol gairebé una unitat logarítmica (176). Aquest fet emula la senyalització

dels receptors muscarínics colinèrgics, ja que els dos sistemes semblen actuar mitjançant l'activació de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) i la conseqüent producció d'òxid nítric (NO) (176).

Tant la fenilefrina com l'angiotensina II disminueixen l'expressió de la NRG-1 β en cèl·lules endotelials de la microvasculatura cardíaca (167). Aquest fet, juntament amb el descrit en el paràgraf anterior, han provocat que s'hagi suggerit la NRG-1 β com a efector d'un sistema molt sensible de regulació de l'activitat adrenèrgica en el cor (177). En aquest sistema, la detecció dels nivells d'adrenalina i angiotensina II circulants, els quals s'alliberen en condicions de baixa pressió arterial, faria que les cèl·lules de l'endoteli cardíac disminuïssin la síntesi de NRG-1 β ; contràriament, en situacions d'alta pressió arterial, l'expressió de la NRG-1 β augmentaria, de manera que l'expressió de la NRG-1 β es regularia sempre en funció de les necessitats del sistema perifèric. De tota manera, cap d'aquests resultats ha estat encara validat *in vivo*.

Sembla ser que el sistema NRG-1 β /ErbB també juga un paper important en la regulació de les unions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular mitjançant l'activació de la Quinasa de les Unions Focals (FAK). En cardiomiòcits, la FAK està involucrada en el manteniment dels sarcòmers, així com també en la viabilitat cel·lular (178;179). Aquesta interacció podria tenir molta importància en la creació o reparació de l'arquitectura del teixit cardíac a través del control de les unions cèl·lula-cèl·lula. Finalment, s'ha suggerit que la NRG-1 β pot estar implicada en altres processos que tenen lloc en el cor, com són la regulació del metabolisme muscular (162;180) o l'angiogènesi (181).

L'EGF és un altre dels lligands dels receptors ErbB actius a nivell cardíac. Un dels primers estudis sobre l'efecte de l'EGF en el cor el van desenvolupar *Rabkin i col.* (182). Observaren que l'addició d'EGF a cèl·lules cardíques en cultiu procedents de nounats de rata provoca un increment de la freqüència de contracció. El mateix autor va demostrar que el bescanvi Na⁺/H⁺ és un dels mecanismes implicats en l'acció de l'EGF en el cor (183). D'altra banda, era conegut que en diferents teixits l'EGF estimulava tant la captació de Ca²⁺ com de Na⁺. Això fa pensar que probablement és l'increment en la concentració intracel·lular de Ca²⁺ induït per l'EGF el responsable de l'activació del bescanvi Na⁺/H⁺.

S'han desenvolupat diversos estudis per a determinar l'efecte de l'EGF sobre la funció contràctil *in vivo*. El resultat més evident és una clara divergència de l'efecte

en funció de l'espècie estudiada. Per exemple, en estudis realitzats amb rates, la infusió continuada d'EGF durant 20 minuts provoca un increment de la pressió arterial mitjana i de la freqüència cardíaca (184). Aquesta resposta a l'EGF es podria explicar per l'efecte vasoconstrictor descrit en fragments aïllats d'aorta de rata (185). Per altra banda, en micos, l'administració d'EGF provoca una forta davallada de la tensió arterial mitjana acompanyada, però, d'un significatiu increment de la freqüència cardíaca (184).

L'any 1993, un estudi en cors perfosos de rata va demostrar que la infusió d'EGF produïa un efecte inotrópic i cronotrópic positiu en els cors (186). Aquest efecte és fruit de l'activació per part de l'EGF de la proteïna G_s , la conseqüent activació de l'AC i l'augment del cAMP intracel·lular (29;187). De fet, s'ha observat que la capacitat per augmentar el cAMP requereix l'expressió de la isoforma V de l'AC (188), que és la isoforma predominant al cor.

En el nostre laboratori també hem observat que l'EGF incrementa de forma moderada la concentració de cAMP en cardiomiòcits aïllats. Això es tradueix en un lleuger increment de la cronotropia i la inotropia del cor perfós de rata (29). Ara bé, en presència de senyalització β -adrenèrgica aguda, l'EGF interfereix en la resposta del cor a l'adrenalina disminuint els nivells de cAMP (29). Aquesta disminució de cAMP en presència d'EGF davant un estímul adrenèrgic agut també s'ha observat en altres teixits com són el fetge (135) i el teixit adipós (133). En aquests casos, però, els mecanismes a través dels quals l'EGF afecta el contingut de cAMP són diferents; en el fetge l'EGF activa una fosfodiesterasa (135), mentre que en el teixit adipós activa una proteïna G_i (133). El fet que els mecanismes d'acció de l'EGF variïn en funció del teixit no permeten extrapol·lar quin és el mecanisme mitjançant el qual l'EGF disminueix els nivells de cAMP al cor durant un estímul adrenèrgic. En tot cas, però, se sap que l'efecte d'aquesta interferència del sistema adrenèrgic és protectora, ja que protegeix el cor tant a nivell estructural (189) com funcional (29).

En ratolins, de fet, aquesta interacció entre l'EGF i la senyalització adrenèrgica protegeix el cor durant els episodis de lluita entre mascles. En aquests episodis d'estrès agut, l'adrenalina circulante induïx l'alliberament d'EGF de les glàndules submaxil·lars a través dels seus receptors α -adrenèrgics, i aquest EGF, part del qual va a la saliva i part a la circulació sanguínia, és l'encarregat de disminuir els efectes perjudicials de l'adrenalina al cor (189). Tenint en compte que en ratolins la lluita entre mascles forma part de la seva etologia, aquest sistema es pot considerar una adaptació per tal de mantenir el cor en bon estat.

També s'ha observat un efecte protector de l'EGF i la NRG-1 β en cors perfosos sotmesos a situacions d'estrès agut mitjançant la combinació d'isquèmia i adrenalina (190). En aquest cas, la infusió d'EGF i NRG-1 β durant el període isquèmic disminueix l'alliberament d'enzims, reflex d'una menor mort cel·lular.

Finalment, l'HB-EGF també aporta el seu gra de sorra a la fisiologia cardíaca. Estudis en animals *Knock-out* han demostrat que l'HB-EGF és també essencial durant el desenvolupament cardíac. La majoria dels animals moren durant la primera setmana de vida, i els supervivents mostren greus problemes en l'estructura cardíaca (cors engrandits, miòcits hipertrofiats, malformació de les vàlvules, dilatació de les cambres ventriculars) i funcionals (funció sistòlica reduïda) (191;192). En el mateix sentit, en altres estudis s'ha observat que animals on no es dona el processament del pro-HB-EGF, i per tant, no hi ha HB-EGF soluble, mostren un fenotip semblant al dels animals *Knock-out* (193), assenyalant el processament de l'HB-EGF com un procés clau per la seva correcta senyalització. En general, els defectes observats en els animals *Knock-out* per l'HB-EGF ressemblen aquells descrits en animals *Knock-out*, tant d'ErbB1 (86) com d'ErbB2 (93;94) i ErbB4 (96), suggerint que l'HB-EGF actua en el cor mitjançant aquests receptors.

L'HB-EGF també té un paper clau en alguns processos d'hipertròfia cardíaca mitjançant la transactivació d'ErbB1. Així doncs, se sap que algunes molècules vasoactives, com ara la noradrenalina (194), l'angiotensina II (195) o l'endotelina (196), i la hipertensió, provocada, per exemple, per la constricció aòrtica (197), indueixen la hipertròfia cardíaca mitjançant la transactivació d'ErbB1 a través de diferents receptors units a proteïna G. La inhibició de la metal·loproteïnasa encarregada del processament de l'HB-EGF reverteix la hipertròfia provocada tant pels agents vasoactius, com per la constricció aòrtica (197).

Hipertròfia cardíaca i ErbBs

La hipertròfia cardíaca és l'engrandiment del cor mitjançant l'augment de mida dels cardiomiòcits, però no del seu número. Aquest procés adaptatiu es dona com a resposta fisiològica a una major demanda de treball cardíac, ja sigui per un augment del volum o de la pressió arterial. En funció de quin sigui l'estímul desencadenant, però, aquesta hipertròfia pot ser compensada, és a dir fisiològica, o patològica, la qual pot acabar derivant en una insuficiència cardíaca. En general, s'accepta que l'augment del volum arterial provocat, per exemple, durant la pràctica de l'esport, indueix hipertròfia fisiològica. Aquesta hipertròfia implica un creixement proporcionat

de tots els elements que integren l'estructura cardíaca, de manera que el cor passa a estar capacitat per a efectuar un major treball cardíac amb totes les garanties. Per altra banda, la hipertensió o la senyalització via angiotensina II, endotelina o receptors adrenèrgics (tant α com β), desencadenen una reestructuració no homogènia del cor. Els fibroblasts produeixen un excés de col·lagen, alliberat a l'espai intersticial, provocant fibrosi en el teixit. Aquesta situació provoca la mort per apoptosi o necrosi de cardiomiòcits, els quals són substituïts per altres fibroblasts, amb la consegüent producció de més col·lagen. Tot plegat afecta la funció contràctil del cor i pot derivar en una insuficiència cardíaca si els estímuls persisteixen (198).

Els mecanismes que porten l'organisme a desenvolupar una o altra hipertròfia encara no estan clars del tot. No obstant, però, sembla ser que la hipertròfia fisiològica és fruit de la senyalització del Factor de Creixement semblant a la Insulina 1 (IGF-1) a través de la sub-unitat p110 α de la PI3K i la posterior activació d'Akt (199;200). Contràriament, la hipertròfia patològica és fruit de l'activació de receptors acoplats a proteïnes G_{q/11} i la transactivació d'ErbB1. En aquest procés hi juga un paper important la senyalització a través de la sub-unitat 110 γ de la PI3K (activada per les sub-unitats $\beta\gamma$ de la proteïna G_{q/11} (201)), conjuntament amb l'activació de les vies de les quinases p38 i JNK, les quals se sap que promouen processos fibròtics i apoptòtics (199) (veure figura 9).

El sistema ErbB també juga un paper essencial en el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca, sobretot a través de l'HB-EGF. Poc després del seu descobriment, ja es va observar que estímuls associats a hipertròfia induïen la sobreexpressió d'HB-EGF en miòcits aïllats de nou-nat i també de rates adultes. Addicionalment, també es va observar que l'HB-EGF secretat per cèl·lules COS induïa hipertròfia en aquests miòcits (202). Més endavant, i com ja hem comentat al final de l'apartat anterior, s'ha comprovat que molts dels estímuls hipertròfics actuen a través de la unió a receptors acoplats a proteïna G i la posterior transactivació d'ErbB1. Aquest procés és dependent del processament del pro-HB-EGF per part de les metal·loproteïnases (197;203), així com també de la funcionalitat del mateix ErbB1, com ho demostra el fet que la seva inhibició evita el desenvolupament d'hipertròfia ventricular en animals espontàniament hipertensos (204).

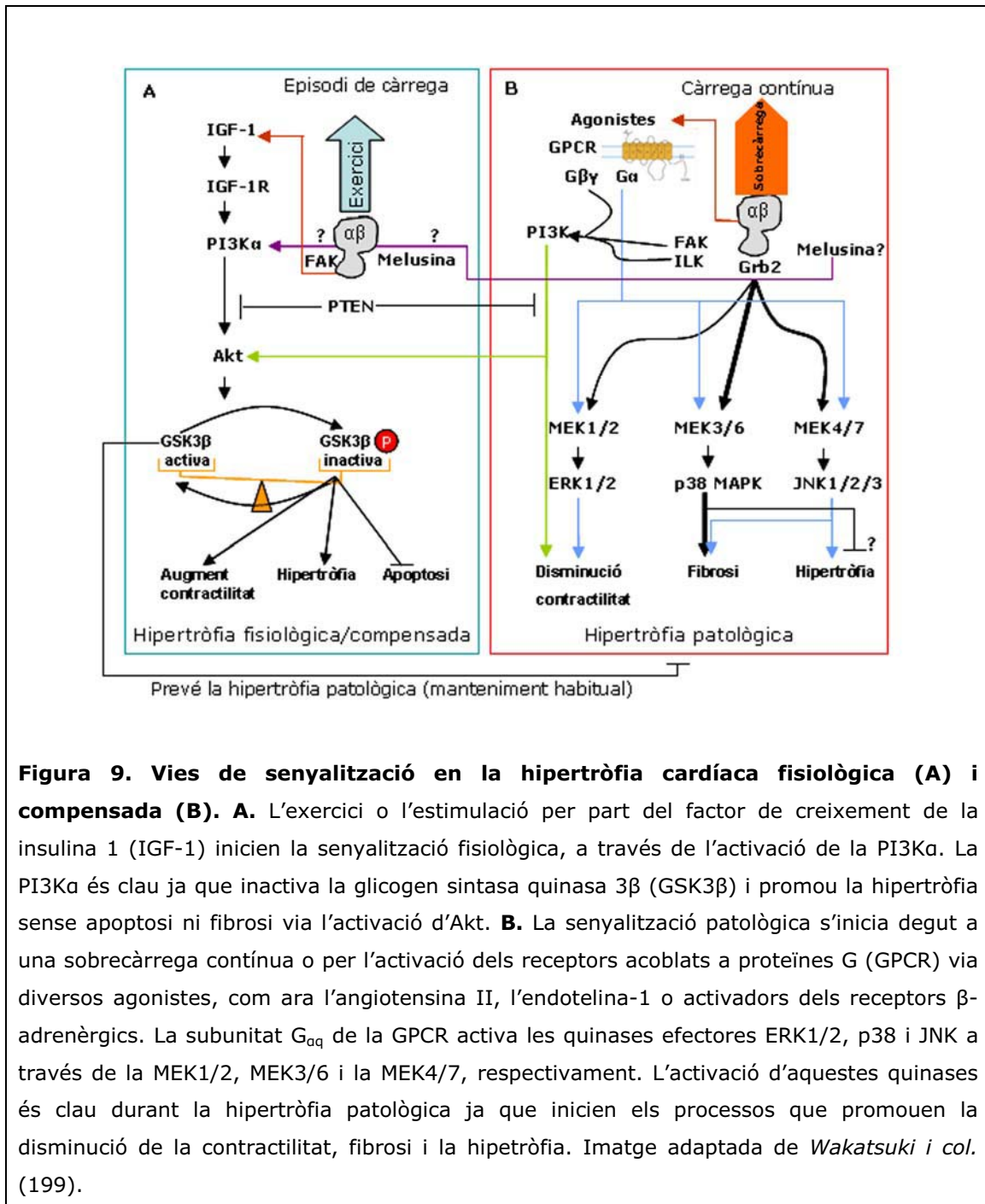


Figura 9. Vies de senyalització en la hipertròfia cardíaca fisiològica (A) i compensada (B). **A.** L'exercici o l'estimulació per part del factor de creixement de la insulina 1 (IGF-1) inicien la senyalització fisiològica, a través de l'activació de la PI3Kα. La PI3Kα és clau ja que inactiva la glicogen sintasa quinasa 3β (GSK3β) i promou la hipertròfia sense apoptosi ni fibrosi via l'activació d'Akt. **B.** La senyalització patològica s'inicia degut a una sobrecàrrega contínua o per l'activació dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) via diversos agonistes, com ara l'angiotensina II, l'endotelina-1 o activadors dels receptors β-adrenèrgics. La subunitat G_{αq} de la GPCR activa les quinases efectores ERK1/2, p38 i JNK a través de la MEK1/2, MEK3/6 i la MEK4/7, respectivament. L'activació d'aquestes quinases és clau durant la hipertròfia patològica ja que inicien els processos que promouen la disminució de la contractilitat, fibrosi i la hipertròfia. Imatge adaptada de *Wakatsuki i col.* (199).

1.5. El sistema ErbB en el ronyó

El fet que els quatre receptors ErbB es trobin més expressats en el ronyó embrionari que no pas en l'adult ja ens deixa entreveure la possible implicació d'aquests receptors durant el desenvolupament del ronyó. De tota manera, la mort prematura dels embrions *Knock-out* per ErbB2 i ErbB4 per problemes neuronals i cardíacs no ha permès l'estudi a fons del paper exacte que juguen aquests receptors

durant el desenvolupament renal. No ha succeït el mateix, per sort, amb ErbB1. Tot i que els animals *Knock-out* per ErbB1 no presenten anomalies en la majoria dels segments de la nefrona, els tubs col·lectors sí que presenten un fenotip dilatat, en el qual les cèl·lules epitelials tenen una morfologia aplanada en comptes de l'habitual forma cuboïdal (88). Addicionalment, la inhibició d'ErbB1 en cultius de cèl·lules embrionàries de ronyó redueix en gran part la ramificació d'aquestes cèl·lules per tal de formar túbuls (205).

L'estudi dels diferents lligands reforça aquest possible rol d'ErbB1 en el procés de ramificació necessari per a la formació del ronyó, ja que s'ha demostrat que tant l'EGF (206) com el TGF α (207) i l'HB-EGF (208;209) tenen capacitat per incrementar la formació de noves branques a partir de cèl·lules embrionàries de ronyó *in vitro*. Per altra banda, i també mitjançant experiments *in vitro*, la NRG-1 és capaç de promoure el creixement de les cèl·lules embrionàries de ronyó, però no d'induir-ne la seva ramificació (210).

En l'animal adult, el sistema ErbB-ligands també desenvolupa algunes funcions importants. Per exemple, la infusió d'EGF al ronyó provoca una disminució tant del RBF com del GFR a través de la constricció de les arterioles pre- i post-glomerulars, així com també una contracció de les cèl·lules mesangials (211). L'HB-EGF produeix unes alteracions hemodinàmiques similars a les que indueix l'EGF, tot i que en aquest cas s'ha estudiat en situacions on prèviament s'ha provocat una glomerulonefritis (212).

El binomi ErbB1-EGF també ha estat implicat en el control del metabolisme iònic. De fet, diferents estudis apunten que l'EGF inhibeix el transport de Na⁺ a través del canal de sodi epitelial (ENaC) en els túbuls col·lectors (213;214). Recentment, però, aquesta afirmació s'ha posat en dubte, ja que també s'ha postulat la possibilitat que estiguem davant d'una regulació bifàsica, en la qual una estimulació aguda amb EGF estimularia el transport de Na⁺ a través d'ENaC mitjançant la via de la PI3K, mentre que una estimulació crònica produiria l'efecte contrari, és a dir, la inhibició d'ENaC a través de la via de les MAPK1/2 (215). El TGF α també ha estat implicat en el control d'ENaC de la mateixa manera que l'EGF, però produint un efecte més potent, ja que amb menys quantitat s'aconsegueix el mateix resultat (214;215).

ErbB1 ha estat últimament relacionat també amb el metabolisme del Mg²⁺. El primer indici d'una possible correlació entre la funcionalitat d'ErbB1 i la reabsorció de Mg²⁺ es va donar en un grup de pacients de càncer que estaven sent tractats amb

cetuximab, un anticòs monoclonal contra ErbB1. Ocasionalment, aquests pacients desenvolupaven hipomagnesèmia (216), una malaltia consistent en la pèrdua de Mg^{2+} a nivell intestinal o renal. En condicions normals, el 70% del Mg^{2+} filtrat és reabsorbit a nivell del TAHL i els túbuls distals, una zona de la nefrona on també hi trobem gran quantitat d'ErbB1. De fet, en un estudi posterior amb persones que patien hipomagnesèmia, es van detectar alguns pacients amb una incapacitat per processar el prepro-EGF, una inadequada activació d'ErbB1 i una activació insuficient del canal epitelial de Mg^{2+} anomenat TRPM6 (217).

Sembla ser que l'activació d'ErbB1 pot afectar a la regulació del transport de fosfats en els túbuls proximals a través de la regulació del cotransport de Na^+ -Pi. El que no queda clar a la bibliografia és si l'EGF potencia (218), o pel contrari redueix (219;220) aquest transport. Finalment, l'EGF també sembla estar implicat en el control del metabolisme de la glucosa en el ronyó. Diferents estudis han demostrat *in vitro* que en els túbuls proximals l'EGF inhibeix tant la captació de glucosa a través del seu transportador (SGLT) (221), com la formació de glucosa *de novo*, és a dir, la gluconeogènesi (222). La senyalització a través d'ErbB1 també ha estat relacionada amb el desenvolupament de patologies renals com ara la nefropatia diabètica (223).

Per altra banda, estudis realitzats *in vitro* en línies cel·lulars provinents de túbuls renals han permès observar el gran ventall de respostes biològiques promogudes pels lligands d'ErbB1. Així doncs, se sap que l'addició d'aquests lligands en diferents cultius promou, per exemple, la proliferació cel·lular (224), la migració (225), la producció de matriu extracel·lular (226) i la transdiferenciació epitelial-mesènquima (227).

Aquests efectes observats *in vitro* van fer pensar en un possible paper d'ErbB1 en la recuperació de lesions renals. De fet, aviat es va observar com l'addició d'EGF exogen a animals sotmesos tant a isquèmia/reperfusió renal com a agents nefrotòxics ($HgCl_2$ o gentamicina) accelera la recuperació de les zones afectades, principalment els túbuls proximals (228-231). Un estudi posterior amb ratolins de la soca *waved-2*, els quals presenten una mutació en el gen d'ErbB1 de manera que la seva activitat tirosina quinasa queda reduïda al 10%, va demostrar que quan aquests animals són sotmesos a un agent nefrotòxic com l' $HgCl_2$, es recuperen més lentament que no pas els animals control amb un ErbB1 plenament funcional (232). També en aquesta línia, s'ha observat com les lesions provocades tant per la isquèmia/reperfusió com per alguns agents nefrotòxics com l' $HgCl_2$ o l'àcid fòlic

indueixen la sobreexpressió tant d'ErbB1 (230;233), com d'HB-EGF (233-235) i TGF α (233).

En el cas de l'EGF endogen, però, l'anàlisi és més complex. En condicions normals, ErbB1 es troba localitzat a les membranes basolaterals dels diferents segments tubulars, mentre que l'EGF es troba a les membranes apicals del TAHL i els túbuls distals. Conseqüentment, en el seu recorregut cap a l'orina, l'EGF produït al ronyó no té accés als receptors ErbB1. De fet, alguns treballs mostren com l'mRNA del prepro-EGF al ronyó i l'EGF en orina disminueixen immediatament després d'un tractament d'isquèmia/reperfusió o amb agents nefrotòxics, en aquest cas cisplatina (236;237). No obstant, en un altre estudi es postula que mentre l'mRNA del preproEGF disminueix en el ronyó ràpidament després d'una lesió isquèmica, la concentració d'EGF soluble en el ronyó afectat augmenta en un primer moment, mantenint-se elevada fins ben bé les primeres 72 h després de la lesió (238). En aquest darrer estudi, s'hipotetitza que davant una lesió tubular, l'epiteli podria quedar danyat i les unions intercel·lulars afectades, de manera que l'EGF alliberat al lumen podria tenir accés als receptors ErbB situats a les membranes basolaterals i així participar en la recuperació de l'epiteli. En aquest sentit, s'ha observat que l'EGF augmenta la funcionalitat de les unions intercel·lulars (239).

Tot i l'efecte beneficiós que sembla tenir el sistema ErbB1-ligands en la resposta primerenca al dany renal agut, el seu paper durant les malalties renals progressives sembla que és més aviat perjudicial. En un treball en el qual es van utilitzar ratolins transgènics que sobreexpressaven una isoforma dominant-negativa d'ErbB1, es van sotmetre els animals o bé a una reducció del 75% de la massa renal o bé a una isquèmia renal prolongada. Quan els animals transgènics sotmesos a la reducció de massa renal eren analitzats als 8 mesos, mostraven una dilatació dels túbuls renals menor que no pas els animals control. Per altra banda, els animals transgènics sotmesos a una isquèmia prolongada mostraven menor atròfia tubular així com també una menor fibrosi intersticial 28 dies després de la isquèmia (240).

L'efector final del sistema renina-angiotensina, l'ANG II, és responsable de l'evolució d'algunes lesions progressives en el ronyó. Molts dels estímuls proliferatius i mitogènics de l'Ang II tenen lloc a través de la transactivació d'ErbB1 mitjançant l'activació de l'ADAM 17 i el conseqüent processament del proTGF α (241-243). Diferents estudis han demostrat que el bloqueig de qualsevol d'aquests tres elements, ErbB1, ADAM 17 o TGF α , disminueix les lesions provocades per la infusió

crònica d'Ang II, reduint la glomeruloesclerosi, l'atròfia tubular, la fibrosi, la infiltració de cèl·lules mononucleades i la proteïnúria (242;243).

2. Objectius

Durant els darrers anys, el nostre grup d'investigació ha centrat la major part dels seus esforços en estudiar els efectes de l'EGF sobre la resposta aguda de diferents teixits a les catecolamines. L'objectiu era explicar l'elevat increment d'EGF en plasma que s'observa en els ratolins mascles després de l'administració d'agonistes $\alpha 1$ -adrenèrgics, o en models més fisiològics d'estimulació adrenèrgica com ara l'estrès per immobilització, o la confrontació entre mascles.

Fruit del treball d'altres membres del grup, es va demostrar que l'EGF interferia en la resposta metabòlica a l'adrenalina del teixit adipós blanc i del fetge. En el cor, el nostre grup va demostrar que hi ha una interferència directa de l'EGF sobre la resposta contràctil a les catecolamines, reduint la magnitud de la resposta i de les disfuncions contràctils. També es va demostrar el paper clau de l'EGF derivat de les glàndules submaxil·lars en la protecció del cor després d'un estímul adrenèrgic agut.

Simultàniament als estudis fets al nostre laboratori, d'altres van demostrar la implicació de diferents receptors i lligands del sistema ErbB en el procés d'hipertròfia induït per diferents estímuls (197;204). És per això, doncs, que en el màster experimental de Míriam Navarro-Sobrino es van posar a punt diferents models d'estimulació adrenèrgica crònica en ratolí, per tal d'estudiar el paper de l'EGF durant el procés d'hipertròfia que se'n deriva. Aquesta tesi fou concebuda com la continuació i desenvolupament d'aquests estudis. La hipòtesi inicial era que, sabuda la implicació dels diferents receptors ErbB en la hipertròfia cardíaca, l'EGF de les glàndules submaxil·lars contribuiria com un dels lligands activadors d'aquest sistema. És per això, que ens vam proposar com a primer objectiu:

- Determinar la possible implicació de l'EGF i els receptors ErbB en el procés d'hipertròfia cardíaca induïda per diferents agonistes adrenèrgics (isoproterenol i fenilefrina) en el ratolí.

Els resultats obtinguts en aquest primer estudi van indicar que l'EGF no semblava jugar un paper important durant la inducció de la hipertròfia cardíaca. De la realització d'aquest primer estudi, però, se'n van derivar algunes observacions molt interessants relacionades amb el sistema de receptors ErbB. Tenint en compte que els resultats obtinguts en aquest primer apartat no eren del tot satisfactoris, vam decidir desenvolupar algunes d'aquestes observacions.

Durant la caracterització prèvia de l'expressió dels receptors ErbB en el cor, vam observar la presència del receptor ErbB3 en cors de ratolins adults. En el cor

només s'havia descrit la presència dels receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB4, mentre que es considerava que ErbB3 només s'expressava durant el desenvolupament embrionari, però no en l'animal adult. Així doncs, vam decidir aprofundir en aquesta qüestió i d'aquí en va sortir el segon objectiu d'aquest treball:

- Demostrar l'expressió i funcionalitat del receptor ErbB3 en el cor de ratolí adult.

Paral·lelament, durant els experiments d'estimulació adrenèrgica crònica, vam prestar atenció també a altres teixits relacionats amb l'EGF, com per exemple, el fetge (principal responsable de l'aclariment de l'EGF circulant) i el ronyó (important lloc de síntesi d'EGF). Vam realitzar un anàlisi de l'expressió dels receptors ErbB en el fetge i el ronyó durant els diferents tractaments adrenèrgics crònics, i vam observar que en el ronyó, el tractament crònic amb isoproterenol induïa la sobreexpressió dels receptors ErbB. Aquest fet ens va encuriosir i vam decidir convertir-lo en el nostre tercer objectiu:

- Estudiar la sobreexpressió dels receptors ErbB en el ronyó durant el tractament crònic amb catecolamines: causes i efectes.

3. Materials i Mètodes

3.1. Animals i condicions d'estabulació

Com a animals d'experimentació hem emprat ratolins mascles de la soca CD1. En el moment de la seva utilització els ratolins tenien un pes comprès entre els 28-42 grams. Els ratolins eren proporcionats per Harlan Interfauna Ibérica, S.A. (Barcelona). Els animals eren lliurats pel proveïdor directament a la cambra d'animals situada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, on passaven un període de quarantena i adaptació d'una setmana. A partir d'aquest moment podien ser utilitzats per l'experiment.

Durant el procés d'estabulació els animals tenien accés *ad libitum* a l'aigua i al pinso (Global Diet 2018, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona) proporcionat per l'estabulari de la facultat. Les condicions ambientals presents durant l'estabulació eren d'una temperatura ambiental de 21 ± 1 °C, una humitat relativa del $50 \pm 5\%$ i un cicle de 12:12 h de llum:fosc (sent el període de llum de 08:00 – 20:00 h).

En alguns experiments volíem utilitzar animals de diferents edats de vida postnatal. Per dur a terme aquest experiment vam utilitzar sis femelles distribuïdes en gàbies de dues en dues i amb un mascle a cadascuna d'elles. Al cap de deu dies de convivència vam enretirar el mascle i vam separar les femelles en gàbies individuals fins al moment del part. Cada femella va tenir de 10 a 13 fills. Els ratolins van ser sacrificats quan tenien 1, 5, 10, 30 i 90 dies de vida. Per no alterar el creixement dels ratolins, a l'hora de sacrificar-los ho vam fer per camades, de manera que els ratolins sempre van estar envoltats de com a mínim 9 germans durant les tres primeres setmanes de vida. Passat aquest temps vam separar mascles i femelles i vam agrupar els animals de 4 en 4 fins al moment del sacrifici.

Els diferents protocols als quals sotmetíem els animals van ser prèviament aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

3.2. Models experimentals

3.2.1. Estimulació β -adrenèrgica crònica

Per a l'estudi de l'estimulació β -adrenèrgica crònica ens vam basar en els estudis realitzats anteriorment al nostre laboratori per la Míriam Navarro (244). En el seu estudi, els animals van ser tractats durant 7 o 14 dies amb isoproterenol i va

observar que no hi havia diferències en la inducció d'hipertrofia cardíaca si l'agonista era injectat diàriament o difonia contínuament mitjançant mini-bombes osmòtiques. En el nostre cas, els diferents períodes de tractament van ser de 2, 4, 7 o 14 dies. Durant el tractament, els animals rebien una dosi de 60 μ mol d'isoproterenol / Kg*dia, distribuïda en dues injeccions subcutànies (a les 09:00h i a les 18:00) de 30 μ mol mitjançant una solució d'isoproterenol 10,5 mM dissolta en PBS (100 μ l per un animal de 35 g; corregíem el volum administrat en funció del pes de l'animal). Els animals control eren punxats amb PBS.

En un experiment concret vam voler fer un seguiment més curós dels ratolins sotmesos a l'estrès β -adrenèrgic crònic. Per fer-ho, vam utilitzar unes gàbies metabòliques (*Tecniplast*[®], model 3600M021) adaptades per a un sol ratolí. Per tal d'evitar l'estrès que impliquen aquestes gàbies pels ratolins, els animals van passar per un procés d'habitució. Aquest procés va consistir en passar-se 3, 8 i 24 h dins la gàbia metabòlica durant tres dies consecutius. Passats aquests tres dies, es deixava el ratolí a la gàbia comuna durant un dia sencer i al següent es començava l'experiment. Durant l'experiment el ratolí va ser introduït a la gàbia durant el primer, el quart i el setè dia. La resta dels dies els va passar a la gàbia comuna amb altres animals. Els animals d'una mateixa gàbia eren introduïts en diferents gàbies metabòliques el mateix dia. Vam recollir mostres d'orina de 24 h i dades sobre la ingesta de pinso i aigua.

En alguns experiments concrets vam voler estudiar la proliferació cel·lular que tenia lloc als ronyons dels animals sotmesos a una estimulació β -adrenèrgica crònica. Per fer-ho vam tractar els animals amb isoproterenol durant 2, 4 i 7 dies. Els animals control van ser tractats amb PBS. Dues hores abans dels sacrificis, els animals van ser punxats intraperitonealment amb una solució de BrdU (*Sigma*) (150 μ l d'una solució de 40 mg BrdU / ml d'una solució de NaCl 0,9% i etanol 20%).

3.2.2. Recuperació després de l'estimulació β -adrenèrgica crònica

En aquest experiment vam voler observar com es recuperaven els animals després de ser sotmesos a 7 dies d'estimulació β -adrenèrgica. Per fer-ho, primerament vam sotmetre els ratolins al tractament amb isoproterenol durant 7 dies. Passats els 7 dies vam parar el tractament. Els animals van ser sacrificats als 0, 2, 7 i 14 dies després d'acabar el tractament. Els animals control van ser punxats amb PBS durant 7 dies i sacrificats tot just acabat el tractament.

3.2.3. Estimulació α_1 -adrenèrgica crònica

Per a l'estudi de l'estimulació α_1 -adrenèrgica crònica ens vam basar en els estudis realitzats anteriorment al nostre laboratori per la Míriam Navarro (244). En el seu estudi, els animals van ser tractats durant 7 o 14 dies amb fenilefrina. En el nostre cas, els diferents períodes de tractament van ser de 2, 7 o 14 dies. Durant el tractament, els animals rebien una dosi de 60 μ mols de fenilefrina / Kg*dia, distribuïda en dues injeccions subcutànies (a les 09:00h i a les 18:00) de 30 μ mols / kg mitjançant una solució de fenilefrina 10,5 mM dissolta en PBS (100 μ l per un animal de 35 g; corregíem el volum administrat en funció del pes de l'animal). Els animals control eren punxats amb PBS.

3.2.4. Sialoadenectomia

En alguns experiments vam voler estudiar la resposta a l'estimulació adrenèrgica en animals als quals havíem extret prèviament les glàndules submaxil·lars (SMG) mitjançant la sialoadenectomia. Eliminant les glàndules submaxil·lars estem eliminat la principal font de síntesi i secreció d'EGF en el ratolí (107).

Per a realitzar aquesta operació, els animals eren anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de 50 μ l d'una solució de ketamina (*Imalgene 1000*[®], Merial) / xilacina (*Rompún*[®], Bayer) en una relació 3:1 i diluïda 1/2 en aigua destil·lada. L'ús d'aquest anestèsic (ketamina) combinat amb un relaxant muscular (xilacina) permet la ràpida recuperació dels animals després de l'operació.

A continuació, una vegada l'animal ja es trobava ben adormit, es col·locava sobre una superfície plana en posició supina, immobilitzàvem les quatre extremitats amb cinta adhesiva i realitzàvem una petita incisió al coll per tal d'exposar les glàndules submaxil·lars. Seguidament s'estirava les glàndules cap a l'exterior amb molta cura per tal de poder lligar-les amb un fil; el nus es lligava a nivell dels vasos que irriguen les glàndules, les quals eren immediatament extirpades fent un tall just per sobre del nus. Netejàvem molt bé la ferida amb PBS i aplicàvem un desinfectant com és la sulfanilàmida en pols (*Kern Farma*) per evitar infeccions. Un cop fet això, tancàvem la incisió amb dos o tres punts de sutura, netejàvem les restes de sang amb PBS, aplicàvem de nou sulfanilàmida i deixàvem els animals recuperar-se de l'operació sota una font de calor per tal d'evitar la hipotèrmia. Aquests animals sense glàndules submaxil·lars s'anomenaren sialoadenectomitzats (SIALO).

Com a controls dels animals sialoadenectomitzats vam utilitzar un altre grup d'animals als quals vam realitzar una operació simulada. Aquests animals patien una operació en la qual se seguia el mateix protocol que durant la sialoadenectomia, amb la diferència que les glàndules submaxil·lars eren exposades, però ni lligades ni extirpades. Aquests animals els vam anomenar SHAM.

Una vegada realitzades totes les operacions, els animals es posaven en gàbies grans amb una reixeta, per evitar que la ferida es pogués infectar en contacte amb els encenalls. Durant les primeres 24 h es mantenien en dejuni per tal d'uniformitzar les diferències d'ingesta que es donen just després de l'operació. Passades 48 h després de l'operació, els animals començaven a rebre el tractament corresponent.

3.2.5. Estimulació α_1 -adrenèrgica aguda

En aquest estudi, els animals van rebre una dosi de 30 μ mol de fenilefrina mitjançant una injecció subcutània d'una solució de fenilefrina 10,5 mM dissolta en PBS (100 μ l per un animal de 35 g; corregíem el volum administrat en funció del pes de l'animal). Els animals van ser sacrificats a 1, 4, 12 o 24 h després de l'administració. Els animals control no van rebre cap injecció abans de ser sacrificats.

Un altre grup d'animals va ser tractat durant dos dies amb fenilefrina. Passats els dos dies, la meitat dels animals van ser sacrificats, mentre que l'altre meitat van rebre una última dosi de 30 μ mol de fenilefrina mitjançant una injecció subcutània i sacrificats al cap d'1 h.

En algun experiment, els animals van rebre una dosi de 30 μ mol de fenilefrina just 30 min després de l'operació de sialoadenectomia, o operació simulada en els controls. L'administració es va realitzar mitjançant una injecció subcutània d'una solució de fenilefrina 10,5 mM dissolta en PBS. Els diferents grups d'animals van ser sacrificats a 1, 4, 12 o 24 h després de la injecció de fenilefrina. Els controls SIALO i SHAM van ser sacrificats 30 minuts després de l'operació.

3.3. Extracció i processament de les mostres

3.3.1. Material

-Pinces i tisores

- Cinta adhesiva
- Xeringues d'1 ml (*Rubilabor*)
- Bomba peristàltica (*Gilson*, mod. Minipuls 2)

3.3.2. Reactius

- PBS
- Solució de pentobarbital sòdic (90 mg/kg)
- Solució d'heparina (*Sigma*) (170 U/ml)
- Paraformaldehid 4% (*Panreac*) (veure apartat 3.5.1.)

3.3.3. Procediment

Per sacrificar els animals primer de tots se'ls injectava intraperitonealment 100 µl de pentobarbital sòdic dissolt en PBS. Un cop l'animal estava 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, se li realitzava una laparotomia mitjana i apartàvem el paquet intestinal cap a la dreta per tal de poder accedir a la vena cava inferior. Procedíem aleshores a l'extracció de sang de la vena cava inferior mitjançant una xeringa heparinitzada. Un cop extreta, la sang era traspasada a un tub eppendorf i es deixava en gel fins a la seva posterior centrifugació.

En la majoria d'experiments, una vegada havíem extret la sang, procedíem a l'extracció dels diferents teixits d'interès. Aquests eren: el cor, el fetge, els ronyons, el múscul, l'estómac, les glàndules submaxil·lars i les glàndules paròtides. Una vegada extrets, els teixits eren etiquetats i ràpidament congelats en nitrogen líquid. Una vegada recollides totes les mostres, centrifugàvem la sang durant 20 min a 12000 g en una microcentrífuga a 4 °C per tal d'obtenir el plasma. Finalment les mostres de teixits es guardaven a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

En els experiments on volíem obtenir mostres per observar-ne la histologia, el processament de l'animal era diferent. Proves prèvies de fixació i processat van determinar que la millor manera per obtenir mostres en bones condicions era perforant l'animal sencer amb el fixador. Per a dur a terme la perfusió, vam utilitzar una bomba peristàltica que, un cop graduada, ens permetia tenir un flux constant de 4 ml/min. Acoblat a la bomba hi 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 al ventricle esquerra del cor; la més gruixuda (diàmetre intern: 1,52 mm) envoltava el sistema de bombeig de l'aparell; i la d'un diàmetre intermedi (diàmetre intern: 1,02 mm) acabava a l'interior d'un vas de precipitats on hi havia la solució a infondre. Així doncs, un cop teníem el ratolí adormit i en posició supina, portàvem l'animal dins una campana d'extracció de gasos. Allà realitzàvem en primer lloc una laparotomia, apartàvem el paquet intestinal i acte seguit, amb l'ajuda d'unes pinces corbes, passàvem un fil de niló just per sota de la vena i l'artèria renal esquerra. A continuació fèiem un doble nus, impedit així la irrigació del ronyó i seguidament procedíem a l'extracció del ronyó amb l'ajuda d'unes pinces i unes tisores. Aquest ronyó era etiquetat i ràpidament congelat en nitrogen líquid. Sense perdre temps tallàvem el diafragma i obríem la cavitat toràctica de l'animal, localitzàvem el cor i hi introduíem la cànula al ventricle esquerra. A continuació tallàvem la vena porta i enceníem la bomba peristàltica. Durant els primers 2 min perforíem l'animal amb PBS per tal de treure tota la sang i netejar els vasos. Passat aquest temps substituïem la solució de PBS per la de paraformaldehid al 4% i ho deixàvem perfondre uns 7 min més. Arribats a aquest punt, extrèiem el ronyó dret i el submergíem en uns 20 ml de solució de paraformaldehid al 4%. Per evitar que el fixador s'escampés, manteníem l'animal en una safata durant tota l'operació.

3.4. Obtenció de cardiomiòcits aïllats de ratolí

Fonament

De forma general podem afirmar que l'aïllament de cèl·lules a partir de diferents fonts, consisteix en digerir la matriu extracel·lular que les envolta, separar les cèl·lules de la matriu extracel·lular per acció mecànica i mitjançant rentats del teixit, recuperar-les en forma de suspensió cel·lular. Evidentment durant tot el procés és imprescindible que les cèl·lules estiguin en tot moment en unes condicions físico-químiques adequades per a la seva supervivència. Per preservar la viabilitat de les cèl·lules aïllades és molt important escollir bé el mètode emprat per a digerir la matriu extracel·lular. S'utilitzen diferents enzims amb activitat proteolítica entre els quals destaquen les col·lagenases. La majoria de col·lagenases disponibles comercialment són extractes parcialment purificats del medi de cultiu de diferents soques de *Clostridium histolyticum*. En aquests extractes, a més a més de l'enzim amb elevada afinitat pel col·lagen (clostridiopeptidasa A), hi ha altres proteases com la tripsina, la clostripaina i diverses proteases neutres. Aquesta combinació de

diferents activitats proteàsiques i especialment de la col·lagenasa, és la que permet la digestió de la matriu extracel·lular. Ara bé, evidentment, moltes proteïnes de la membrana cel·lular dels cardiomiòcits també poden ser hidrolitzades per l'acció de les col·lagenases comercials, de manera que cal aconseguir unes condicions experimentals que permetin un equilibri òptim entre el grau de digestió de la matriu extracel·lular (factor clau en el rendiment de l'aïllament) i el manteniment de les cèl·lules aïllades (fonamental per assegurar la seva viabilitat).

Nosaltres hem aplicat el protocol desenvolupat per Jordi Lorita en el nostre laboratori a partir de *Carley i col.* (245). En primer lloc, i utilitzant una perfusió pel mètode Langendorff, rentem el cor de la sang que conté, i posteriorment, perfonem amb la solució de col·lagenasa desitjada, tot aprofitant el sistema vascular coronari per facilitar l'accés de l'enzim de forma molt homogènia a tot el teixit cardíac. En segon lloc, i després del fraccionament del cor, realitzem una digestió d'aquests fragments per immersió en una solució de col·lagenasa sota una agitació constant. Aquestes digestions i l'agitació permeten que els cardiomiòcits se separin de la matriu extracel·lular i es puguin recuperar mitjançant rentats del teixit.

Materials

- Perfusor de Langerdorff (*Harvard Apparatus*)
- Bany termostatitzat amb agitació circular (*New Brunswick Scientific Co. Inc.*; model G76)
- Centrífuga per a tubs Fàlcon de 50 ml (*P Selecta*; model desconegut)
- Bomba d'infusió (*Infors HT*, mod. Precidor)

Reactius

- NaCl (*Panreac*)
- NaHCO₃ (*Panreac*)
- KCl (*Panreac*)
- MgSO₄ (*Panreac*)
- NaH₂PO₄ (*Panreac*)
- Glucosa (*Panreac*)
- CaCl₂ (*Panreac*)
- Taurina (*Sigma*)
- 2,3 Butanedione monoxime (*Sigma*)
- Col·lagenasa tipus 2 (265 u/mg) (*Worthington*)

- Heparina (*Sigma*)

Tampons

-Tampó Krebs-Henseleit enriquit (KHB): a la taula 3 es mostren les concentracions a les quals eren preparades les solucions mare i la concentració final del tampó. Les solucions mare es guardaven en ampolles de vidre durant un període màxim d'1 mes a 4 °C o bé en pots de plàstic congelats durant un període màxim de 2 mesos. El KHB es preparava diàriament a partir d'aquestes solucions mare. La taurina i la 2,3 butanedione monoxime, però, es pesaven i es dissolien en el tampó KHB diàriament. Totes les solucions eren preparades amb aigua miliQ.

Reactiu	Concentració mare	Concentració al tampó
NaCl	1,2 M	120 mM
NaHCO ₃	200 mM	100 mM
KCl	540 mM	5,4 mM
MgSO ₄	120 mM	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄	120 mM	1,2mM
Glucosa	560 mM	5,6 mM
CaCl ₂	100 mM	6 mM
Taurina		5,8 mM
2,3 Butanedione monoxime		10 mM

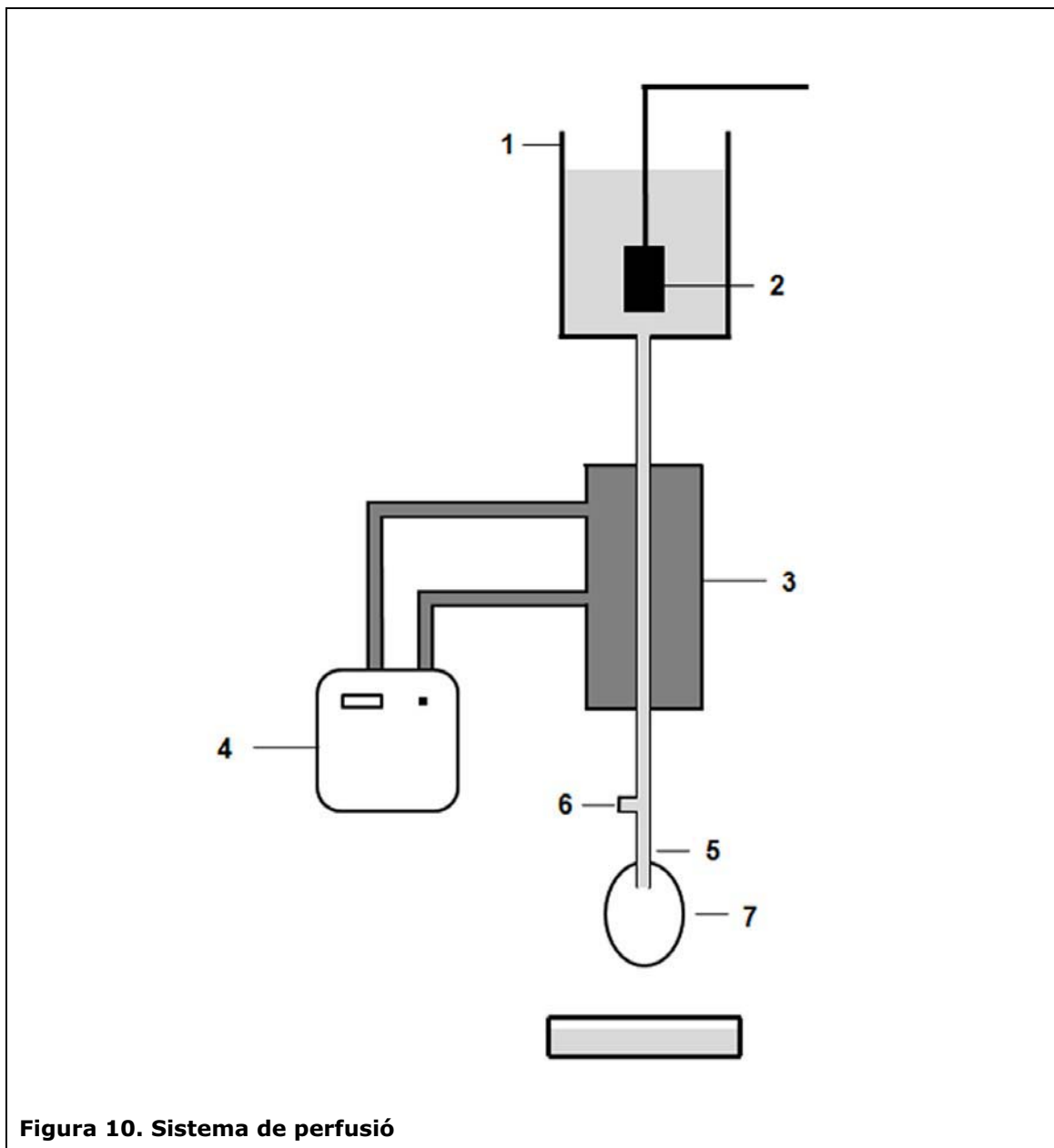
Taula 3. Composició del KHB i de les solucions mare emprades en la seva preparació

- **Solució de col·lagenasa:** diàriament preparàvem 4 ml d'aquesta solució dissolent 30 mg de col·lagenasa amb 4 ml de tampó KHB.

Sistema de perfusió

Vam utilitzar el model comercial de *Harvard Apparatus* subministrat per Panlab S.L. (Barcelona), específicament dissenyat per a la perfusió mitjançant el sistema Langendorff de cors de rata i d'altres de mida superior. Per tal d'adaptar el sistema a les perfusions de cors de ratolí vam haver d'introduir alguns canvis sobre el model bàsic.

Les diferents parts que composaven el sistema de perfusió, es poden observar a les figures 10 i 11:



-suport físic: consistent en un eix d'acer fixat sobre una base metàl·lica que permetia acoblar les altres parts del sistema entre elles tot conferint estabilitat al conjunt. No representat a l'esquema.

-reservori de tampó (1): ampolla de plàstic d'aproximadament 800 ml de capacitat en la posició més apical del sistema, tot conferint una alçada suficient respecte el cor (7) que permetés desenvolupar la pressió hidrostàtica desitjada.

-sistema de gasejat (2): permetia la saturació del tampó KHB amb carbogen (95% O₂ i 5% CO₂) a mesura que sortia del reservori i penetrava progressivament al serpenti (3). Aquesta etapa era imprescindible, en primer lloc per permetre l'oxigenació del medi i, per tant, també del miocardi un cop el cor era perfós; però també per mantenir el tampó de perfusió a un pH constant de 7.4 gràcies a l'efecte tamponador del sistema CO₂ / H₂CO₃ / HCO₃⁻.

-sistema de temperament: permetia mantenir el tampó a una temperatura constant de 37 °C. En el nostre cas el tampó es temperava mitjançant un serpenti (3), el qual estava connectat a un circuit d'aigua destil·lada recirculant i temperada gràcies a un bany termostatitzat (4; Grant Instruments mod. KD) a una temperatura habitualment compresa entre els 42 i els 45 °C, fixada en funció de la temperatura ambient amb l'objectiu d'aconseguir el temperament del tampó a 37 °C en arribar a la cànula.

-cànula aòrtica (5): gràcies al reduït diàmetre de la part inferior (0,9 mm) permetia la canulació de l'artèria aorta del ratolí.

-clau triple (6): permetia controlar l'entrada de tampó a la cànula des de dos orígens diferents; per una banda la columna de perfusió, i per l'altra, la bomba d'infusió. Aquesta clau permetia que el tampó entrés únicament des d'una de les dues vies o des d'ambdues simultàniament.

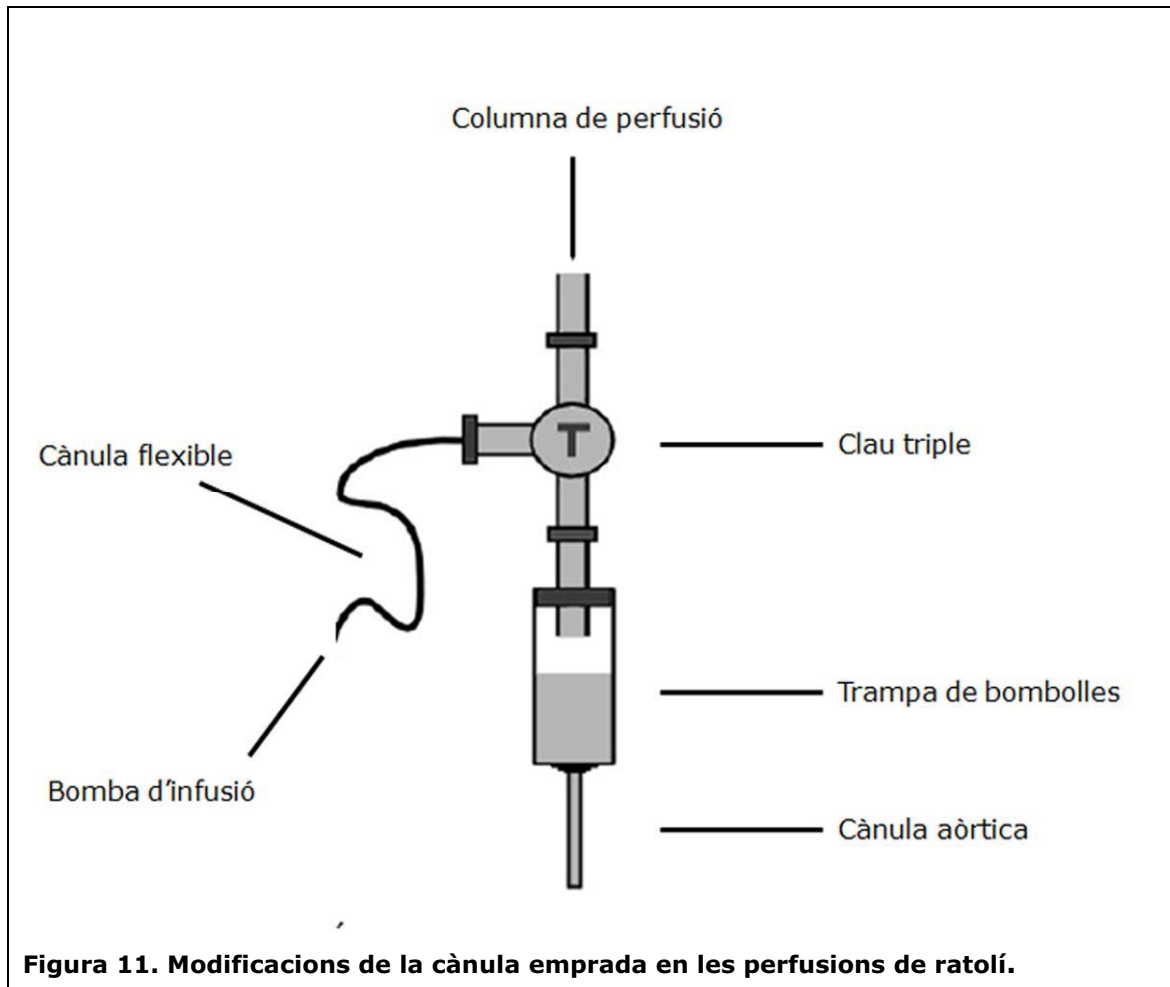
-trampa de bombolles: per evitar l'entrada de bombolles d'aire al cor s'usen les anomenades trampes de bombolles, mecanismes col·locats just sobre la cànula aòrtica consistents en un petit reservori de tampó d'una amplada i volum més gran que els de la cànula i que assegurin que l'aire provinent de la part superior de la columna és segrestat dins d'aquest reservori.

Procediment

-Preparació dels tampons: en primer lloc es preparava el tampó KHB i es gasejava amb carbogen durant un mínim de 45 min.

-Preparatiu de la perfusió: com a preparatiu inicial calia muntar tot el sistema de perfusió descrit anteriorment. Per evitar l'acumulació d'aire, omplíem el sistema amb el tampó gasejat començant per la part més inferior d'aquest i fèiem ascendir el tampó amb l'ajuda d'una bomba peristàltica. Això ens permetia evitar l'acumulació de petites bombolles d'aire dins el sistema que podien impedir una correcta perfusió del cor un cop era muntat. El gasejat previ era absolutament necessari, doncs el volum de tampó situat més distalment del reservori, al ser omplert per la part inferior, no arribava a estar en contacte en cap moment amb el sistema de gasejat propi de

l'aparell. Un cop plena de tampó tota la columna, es tancava la bomba peristàltica i abans d'enretirar el tub que sortia de la bomba fins el lloc d'inserció de la càndula aòrtica, es tancava la clau triple, de manera que al treure el tub, el sistema restava tancat. Aleshores col·locàvem la càndula a la seva posició i obríem el sistema durant uns 5 s, permetent l'eliminació de l'aire que no havíem eliminat de l'interior de la càndula. En aquests moments només ens calia esperar que el tampó assolís la temperatura de 37 °C i aleshores el sistema estava apunt per ser utilitzat.



-Heparinització i anestèsia de l'animal: en primer lloc heparinitzàvem l'animal amb una injecció intraperitoneal d'heparina (100 µl d'una solució de PBS/heparina (170 U/ ml)). Al cap de 15 min procedíem a adormir-lo amb una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (90 mg / kg) dissolt en PBS.

-Aïllament del cor i canulació: un cop els animals eren anestesiats i heparinitzats correctament, es procedia a l'aïllament del cor; per fer-ho, es practicava una incisió a la pell de l'animal a nivell del tòrax amb l'ajuda d'unes pinces i unes tisores, per

ràpidament, obrir el tòrax tallant totes les costelles en direcció sagital pel costat dret de l'estèrnum. Es localitzava el cor a l'interior de la caixa toràcica i es procedia a extreure'l amb l'ajuda d'unes pinces corbes, els extrems de les quals coincidien amb l'arc aòrtic. Es pinçava l'arc i es tallaven tots els vasos que quedessin per sota. Així alliberàvem el cor i el podíem extreure. Durant aquesta manipulació es tenia especial cura de no malmetre el cor amb les pinces o les tisores.

Un cop aïllat, el cor es col·locava ràpidament en una placa de Petri plena amb uns 15 ml de tampó gasejat amb carbogen prèviament i refredat a 4 °C. Degut a les reduïdes dimensions del cor de ratolí, l'aïllament de l'aorta i la seva canulació era complicat i lent. Per evitar problemes d'anòxia perllongada durant el procés, el cor se submergia en tampó fred, ja que això permetia l'aturada metabòlica i funcional del cor i ens proporcionava el temps suficient per canular-lo.

Amb el cor dins el tampó, es localitzava l'artèria aorta, s'agafava amb un parell de pinces per les seves parets de manera diametralment oposada, s'acostava el cor a la cànula, i es muntava en el sistema tot introduint-la per la llum de l'aorta fins a l'inici de la cavitat del ventricle esquerra, però sense arribar a penetrar al seu interior. Immediatament es lligava l'aorta sobre la cànula amb un doble nus amb un fil de niló de 0,25 mm. En aquell moment ja es podia obrir la triple clau i permetre el pas del tampó a través del cor.

-perfusió: la perfusió tenia lloc en dues fases:

-rentat: just després de la canulació i mitjançant el perfusor, perfoníem el cor pel mètode Langerdorff amb tampó KHB durant 5 min a una pressió constant de 60 mmHg i a una temperatura de 37 °C. Durant aquesta fase era imprescindible assegurar-nos que la perfusió es desenvolupava adequadament. Si el rentat era poc homogeni o insuficient ni la digestió ni la viabilitat assolien nivells acceptables i el cor era descartat.

-digestió: passats els 5 min, movíem la clau de pas de manera que permetés l'entrada del tampó amb col·lagenasa a través de la bomba d'infusió. La bomba estava programada per subministrar un flux d'uns 0,3 ml/min, un valor aproximadament deu vegades inferior al provocat per la columna de perfusió; així doncs, la col·lagenasa quedava diluïda aproximadament 1/10 a l'entrada de l'aorta. La solució de col·lagenasa era infosa durant 10 min. A partir del minut 5 recollíem 10 ml de l'afluent coronari en un tub Falcon de 50 ml (Falcon A).

-Incubacions i rentats:

-Incubació amb col·lagenasa: passats els 10 min, el cor era alliberat de les aurícules i els vasos apicals, posteriorment tallat en quatre trossos i posat en el Falcon A, on havíem recollit l'afluent coronari feia uns instants. Incubàvem els trossos 10 min més al bany termostatitzat a 37 °C i amb agitació mecànica suau, agitant manualment cada 2 min. Passats els 10 min d'incubació, tallàvem cadascun dels trossos per la meitat i ho pipetejàvem tot amb suavitat durant 2 min més amb una pipeta Pasteur.

Arribats a aquest punt, deixàvem reposar el Falcon A uns instants (uns 10 s) i recollíem el sobrenedant en un altre Falcon de 50 ml (Falcon B) (al fons del Falcon A ens quedaven els trossos que no havíem pogut disgregar, i que per tant, no ens servien).

-Rentats post-digestió: afegíem tampó KHB al Falcon B fins arribar als 15 ml, el centrifugàvem durant 2 min a 50 g i descartàvem el sobrenedant. Resuspeníem el pellet en 15 ml més de tampó KHB i repetíem l'operació del centrifugat. Finalment, resuspeníem el pellet en 5 ml de tampó KHB i donàvem l'aïllament de miòcits per finalitzat. Ens miràvem els miòcits al microscopi i si tenien bon aspecte seguíem endavant. En cas contrari eren rebutjats.

-Fixació i obtenció de les preparacions de cardiomiòcits: una vegada obtingudes les cèl·lules i confirmada la seva validesa, centrifugàvem els cardiomiòcits durant 2 min a 50 g dins del tub Falcon, n'extrèiem el sobrenedant i afegíem aproximadament 20 ml de la solució de fixació. Ho deixàvem de 15 a 20 min a temperatura ambient, agitant per inversió cada 4 min. Passat aquest temps, realitzàvem dos rentats de 5 minuts amb tampó de rentat i ho resuspeníem finalment amb 4 ml de la mateixa solució de rentat. Seguidament ens disposàvem a preparar els portaobjectes.

Per a l'obtenció de les preparacions de cardiomiòcits, bàsicament havíem de fer dos passos; en primer lloc escampàvem 50 µl de la solució de cardiomiòcits per sobre d'un portaobjectes SuperFrost Plus (*Rubilabor*) de manera que s'ocupés tota la part central. A continuació, deixàvem assecar el portaobjectes a una planxa prèviament escalfada a 40 °C. Una vegada secs, els portaobjectes ja podien ser utilitzats per a immunocitoquímica.

3.5. Anàlisi histològica

3.5.1. Obtenció de blocs de parafina

Reactius

- Paraformaldehyd (*Panreac*)
- Etanol absolut (*Panreac*)
- Etanol 90% v/v, preparat a partir de l'etanol absolut amb H₂O destil·lada
- Etanol 70% v/v, preparat a partir de l'etanol absolut amb H₂O destil·lada
- Butanol puríssim (*Panreac*)
- Parafina (*Panreac*)
- Solució de Paraformaldehyd al 16%. Es preparava un estoc pesant 16 grams de paraformaldehyd i dissolent-los en 75 ml d'aigua miliQ aproximadament. S'afegien uns 2 ml d'hidròxid sòdic (NaOH) 0,2 M i s'escalfava la solució fins als 70 °C més o menys. Un cop el paraformaldehyd s'havia dissolt s'enrasava fins als 100 ml amb aigua miliQ. Es guardava congelat a -20 °C en alíquotes de 50 ml.
- Solució de Paraformaldehyd al 4% en PBS. Era preparat en fresc diàriament. Per preparar-ne 100 ml es barrejaven 10 ml de PBS x10, 25 ml de paraformaldehyd al 16% i 65 ml d'aigua destil·lada.

Procediment

Després de la fixació *in situ* dels ronyons, els tallàvem per la meitat amb l'ajuda d'un bisturí i els submergíem dins uns 20 ml de solució de paraformaldehyd al 4% i ho manteníem en agitació a 4 °C durant 4 h. Després, ja a temperatura ambient, fèiem tres rentats de 5 min amb PBS i un rentat de 30 min amb alcohol al 70%. Posteriorment, renovàvem l'alcohol al 70% i ho deixàvem o bé 1 h o bé tota la nit a 4 °C. A continuació, procedíem amb la deshidratació del ronyó mitjançant una incubació d'1 h amb alcohol al 90%, dues incubacions de 30 min amb alcohol absolut i una incubació de 30 min amb butanol. El butanol és l'agent intermediari, més apolar que l'etanol i miscible amb la parafina a 60 °C. Per aquest motiu el procés continuava amb una incubació de 12 h amb butanol-parafina en una relació 1:1 a l'estufa a 60 °C, per tal de facilitar l'entrada de la parafina a l'interior del teixit. Posteriorment realitzàvem el canvi de la solució de butanol-parafina per parafina pura i ho deixàvem tota la nit a l'estufa per assegurar una inclusió completa amb parafina.

Finalment, al matí següent es construïa el bloc. Per obtenir el bloc s'utilitzava un motlle de plàstic de 3 x 2,5 x 2 mm, l'interior del qual s'omplia de parafina líquida i, ràpidament, s'hi introduïa el ronyó amb l'ajuda d'unes pinces. El ronyó es col·locava en posició horitzontal i s'etiquetava. Tant bon punt la parafina començava a solidificar-se, se submergia el bloc en aigua durant uns minuts i es deixava acabar de solidificar a temperatura ambient un mínim de 24 h abans de començar a tallar-lo.

3.5.2. Obtenció de talls histològics

Un cop fet el bloc, s'obtenien talls de 4 a 7 μm amb un micròtom de rotació (*AS325 Anglia Scientific. Cambridge*) del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la UB. Els talls obtinguts es deixaven inicialment en un cristal·litzador ple d'aigua destil·lada escalfada prèviament a 40 °C per tal d'obtenir uns talls més planxats. Un cop ben estesos, es recollien en portaobjectes Super Frost Plus (*Rubilabor*), s'eixugaven les vores dels suports i es deixaven en una planxa unes hores a 40 °C per tal que els talls quedessin ben adherits.

Una vegada obtinguts els talls i enganxats als portaobjectes, aquests ja estaven preparats per a ser utilitzats per a diferents tincions. Tenint en compte, però, que la majoria de colorants i anticossos són o es troben en solucions aquoses, era imprescindible desparafinar i hidratar els talls prèviament a començar els diferents protocols. Nosaltres ho vam fer seguint aquest protocol:

- 3 incubacions de 10 min en xilè
- 2 incubacions de 5 min en etanol absolut
- 2 incubacions de 5 min en etanol al 90%
- 2 incubacions de 5 min en etanol al 70%
- 2 incubacions de 5 min en aigua destil·lada

A no ser que s'indiqui el contrari, totes les incubacions i tincions es realitzaven dins uns cristal·litzadors plens amb 150 ml de les solucions emprades. Els temps indicats per als colorants són aproximats, ja que varien segons el gruix del tall o el temps que faci que el colorant està preparat. Hi ha alguns colorants que, amb el temps, perden les seves propietats tintorials, mentre que d'altres en guanyen. Tot això obliga a fer proves de temps per tal d'establir el més adequat quan es vol dur a terme la tinció després d'un temps de no haver utilitzat les solucions colorants.

3.5.3. Muntatge de preparacions permanents

Un dels medis de muntatge més emprats per fer preparacions permanents en microscòpia òptica és el DPX (*Panreac*), un medi totalment hidrofòbic. Per tant, per a dur a terme el muntatge ens calia primer deshidratar els talls. Nosaltres ho vam fer seguint el següent protocol:

- 1 incubació de 5 min en etanol al 70%
- 1 incubació de 5 min en etanol al 90%
- 2 incubacions de 5 min en etanol absolut
- 2 incubacions de 5 min en xilè
- Muntatge amb DPX

Per altra banda, per muntar les preparacions per a la microscòpia de fluorescència vam utilitzar un medi de muntatge amb glicerol. Vam emprar un kit de muntatge dissenyat no només per preservar la mostra, sinó també per preservar la seva fluorescència (*SlowFade® Antifade Kit, Molecular Probes™, Invitrogen*). El protocol constava de dos passos; en primer lloc aplicàvem un tampó bàsic per equilibrar la mostra, ja que s'ha vist que el protector de la fluorescència funciona millor a pH bàsic. Al cap de 5 min substituïem el tampó pel medi de muntatge (amb el protector de la fluorescència incorporat), al qual nosaltres havíem afegit el colorant DAPI prèviament. Aquest colorant fluorescent s'uneix al DNA marcant específicament el nucli cel·lular.

Una vegada afegit el protector de la fluorescència, col·locàvem un cobreobjectes sobre la mostra i segellàvem els seus extrems amb laca d'ungles. Les mostres les conservàvem a les fosques i a 4 °C fins al moment de la seva observació.

3.5.4. Observació microscòpica

Un cop tenyides, contrastades i muntades, vam procedir a l'observació microscòpica de les mostres. Per a les mostres de microscòpia òptica vam utilitzar el microscopi òptic *AxiostarPlus* de la casa *Zeiss*. Vam realitzar observacions amb objectius de 10, 40 i 100 augments. Les fotografies les vam fer amb una càmera digital *Power Shot G5* de *Canon* acoblada al microscopi.

Per altra banda, per a l'observació i captació d'imatges de les mostres amb fluorescència vam utilitzar el microscopi confocal de fluorescència *Leica TCS-SP2* dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

3.5.5. Tinció amb Hematoxilina-Eosina

La tinció amb Hematoxilina-Eosina és una doble tinció basada en l'afinitat de les estructures cel·lulars per a un o altre colorant. L'hematoxilina tenyeix de color violeta estructures principalment àcides, per la qual cosa ens tenyia els nuclis cel·lulars. Per altra banda, l'eosina és una tetrabromofluoresceïna de caràcter àcid que tenyeix de color rosat les estructures bàsiques com ara el citoplasma cel·lular.

Reactius

- Solució d'hematoxilina de Friendlander (*Flucka*), diluïda 1/2 en H₂O destil·lada
- Eosina Y (*Sigma*)
- Eosina aquosa a l'1%: es preparava a partir de l'eosina Y, dissolent-la amb H₂O destil·lada fins a l'1% (p/v) i afegint unes gotes d'àcid acètic glacial
- Àcid acètic glacial puríssim (*Panreac*)
- Xilè (*Panreac*)
- DPX, Medi de muntatge (*Panreac*)

Procediment

Una vegada ja s'havien desparafinat i hidratat els talls, aleshores procedíem a la tinció. Primerament teníem els talls amb hematoxilina durant aproximadament 30 s. Seguidament submergíem els talls en un recipient que contenia aigua corrent de l'aixeta i ho deixàvem 5 min amb renovació d'aigua constant. Passats els 5 min teníem els talls amb l'eosina aquosa a l'1% durant 30 s més. En acabar ja començàvem el muntatge de la mostra (veure apartat 3.5.3.).

3.5.6. Tinció tricròmica de Mallory

La tinció tricròmica de Mallory és útil per tal de visualitzar el teixit conjuntiu. Les fibres de col·lagen apareixen en blau, les fibres musculars en vermell i les fibril·les d'elastina apareixen en taronja vermellós.

Reactius

- Sublimat corrosiu: Cl₂Hg en solució aquosa saturada (*Panreac*)
- Fucsina àcida a l'1% (*Panreac*)
- Àcid fosfomolibdic a l'1% (*Panreac*)
- Líquid e Mallory (*Panreac*)
- Blau d'anilina alcohòlica (*Panreac*)
- Xilè (*Panreac*)
- DPX, Medi de muntatge (*Panreac*)

Procediment

Una vegada ja s'havien desparafinat i hidratat els talls, aleshores procedíem a la tinció. Primerament submergíem els talls durant 15 min en sublimat corrosiu per tal que actués de mordent. Després de fer un rentat ràpid amb aigua destil·lada, submergíem les mostres durant 15 s en fucsina àcida. Rentàvem les mostres de nou i posàvem els talls durant 60 s en àcid fosfomolibdic. Tornàvem a rentat els talls durant un instant amb aigua destil·lada i els deixàvem 75 s en líquid de Mallory. Finalment, i després d'un últim rentat diferenciàvem els talls amb blau d'anilina alcohòlica uns 10 s. En acabar ja començàvem el muntatge de la mostra (veure apartat 3.5.3.).

3.5.7. Immunohistoquímica

Fonament

La immunohistoquímica i la immunocitoquímica són dues tècniques histològiques basades en la capacitat d'un anticòs per unir-se a un antigen concret en una secció de teixit orgànic o una cèl·lula correctament fixats. Aquest anticòs, que anomenarem primari, és reconegut posteriorment per un anticòs secundari unit a un fluorocrom o a un enzim capaç de transformar un substrat incolor en visible. Aquest sistema permet la identificació i localització de diferents sistemes cel·lulars dins de mostres tissulars així com també la distribució d'un antigen dins d'una cèl·lula.

En el nostre cas hem emprat dos protocols diferents d'immunohistoquímica i un per a la immunocitoquímica. A continuació detallarem els diferents passos de cadascun d'ells, que tot i mantenir una mateixa essència, difereixen en certs aspectes que cal remarcar.

3.5.7.1. Immunohistoquímica per detectar la incorporació de BrdU al DNA

Aquesta tècnica només es va realitzar en ronyons d'animals que havien estat injectats amb BrdU 2 h abans del sacrifici (veure apartat 3.2.1.). Hem seguit el procediment posat a punt prèviament en el nostre laboratori per Irma Buiria (246).

Reactius

- PBS
- PBS-tritó: Tritó X-100 (*Sigma*) al 0,2% en PBS
- PBS-gelatina: gelatina (*Merck*) al 0,2% en PBS
- Tris-HCl: Trizma base (*Roche*) 0,1 M en aigua destil·lada a pH 7.6 o 8.5 (s'indica més endavant)
- Fab: fragment variable d'immunoglobulines de cabra contra Ig G (H+L) de ratolí (*Jackson Laboratories*). Conservat a 4 °C
- Solució de blocatge de les peroxidases endògenes: metanol (*Panreac*) al 10%, H₂O₂ (*Panreac*) al 3% i Tritó X-100 (*Sigma*) al 0,2 % en PBS
- Solució de desnaturalització del DNA: HCl (*Panreac*) 2 M en PBS 0,5 M
- Solució de borat: borat sòdic (Na₂B₄O₇) (*Panreac*) 0,1 M a pH 8.5
- Solució de blocatge de les unions inespecífiques: sèrum de cabra (*Gibco*) al 10%, Tritó X-100 (*Sigma*) al 0,5%, glicina (*Panreac*) 0,2 M i Fab (*Jackson Laboratories*) 1/75 en PBS-gelatina
- Anticòs primari: anticòs monoclonal de ratolí anti-BrdU (M0744, clon Bu20a) (*Dako*)
- Anticòs secundari: anticòs policlonal de cabra anti-ratolí (*Jackson Immunoresearch*)
- Solució de revelat: 3',3'-Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma*) al 0,025%, Sulfat de Níquel Amoni (*Sigma*) al 0,165% i H₂O₂ (*Panreac*) al 0,005 % en tampó Tris-HCl a pH 7.6
- Solució d'hematoxilina de Friendlander (*Flucka*), diluïda 1/2 en H₂O destil·lada

Procediment

Les mostres de partida ja havien estat desparafinades i hidratades (veure apartat 3.5.2.). A partir d'aquí vam realitzar la immunohistoquímica seguint els següents passos:

Blocatge de les peroxidases endògenes

Ja que el revelat consisteix en la reacció de les peroxidases unides a l'anticòs secundari amb la solució de revelat, és imprescindible inhibir prèviament les peroxidases pròpies del teixit, ja que sinó obtindríem un marcatge inespecífic de BrdU en el teixit. En aquest pas, les mostres s'incubaven durant 10 min amb la solució de blocatge de les peroxidases endògenes; després es realitzava una incubació de 5 min en PBS abans de continuar amb la desnaturalització.

Desnaturalització del DNA

Aquest pas és imprescindible per tal que les dues cadenes de DNA quedin separades i l'anticòs primari pugui accedir a la BrdU que s'hagi incorporat durant la fase S del cicle cel·lular. Per fer-ho, incubàvem les mostres en la solució de desnaturalització durant 1 h a temperatura ambient. Passat aquest temps era necessari aturar la reacció, així que submergíem les mostres a la solució de borat durant 10 min. Posteriorment realitzàvem quatre rentats de 5 min en PBS i finalment una incubació de 15 min en PBS-tritó.

Blocatge

La funció del blocatge és evitar les unions inespecífiques dels anticossos primari i secundari. La incubació es realitzava amb la solució de blocatge durant 2 h a temperatura ambient però dins una cambra humida. En aquesta cambra hi teníem dos suports rectangulars de vidre sobre els que disposàvem els portaobjectes. Transcorregudes les 2 h, eliminàvem la solució de blocatge amb dos rentats de 5 min amb PBS-tritó.

Incubació amb l'anticòs primari

L'anticòs primari era un anticòs monoclonal obtingut en ratolí, que reconeix i s'uneix a la BrdU incorporada a les cadenes senzilles de DNA. L'anticòs es diluïa 1/75 en una solució que contenia: sèrum de cabra al 10%, Tritó X-100 al 0,5%, azida sòdica al 0,02% en PBS-gelatina. La incubació es duia a terme durant tota la nit a 4 °C a la cambra humida. Per evitar que s'escolés l'anticòs, cobríem els portaobjectes amb uns cobreobjectes que tenien una miqueta de laca a les cantonades.

L'endemà deixàvem temperar les mostres durant uns minuts i posteriorment fèiem dos rentats de 5 min amb PBS-tritó per tal d'extreure l'anticòs no unit a la mostra.

Incubació amb l'anticòs secundari

La detecció de l'anticòs primari es realitzava mitjançant un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave (HRP). Aquest es diluïa 1/100 en una solució que contenia: sèrum de cabra al 10% i Tritó X-100 al 0,3% en PBS-gelatina. Incubàvem les mostres amb l'anticòs secundari durant 2 h a temperatura ambient. Passat aquest temps realitzàvem un rentat de 5 min amb PBS, i dos rentats més de 5 min amb PBS-tritó.

Finalment, abans de procedir al revelat, submergíem les mostres en tampó Tris-HCl a pH 7.6, fent tres rentats de 5 min cadascun.

Revelat

El revelat es basa en l'oxidació del fluorocrom 3',3'-diaminobenzidina (DAB) en presència d' H_2O_2 , a través d'una reacció catalitzada per la peroxidasa. Les sals de sulfat de níquel amoni incrementen la resolució de la senyal, precipitant específicament en els llocs on es dona la reacció.

Per a preparar la solució de revelat partíem de les següents solucions:

- solució A: DAB al 0,03% en tampó Tris-HCl a pH 7.6 (protegit de la llum)
- solució B: sulfat de níquel amoni a l'1% en tampó Tris-HCl a pH 8.5
- solució C: H_2O_2 a l'1% en tampó Tris-HCl a pH 8.5

Just abans del revelat, barrejàvem les solucions A i B en una proporció 5:1 i afegíem el volum necessari de la solució C per acabar obtenint una concentració final d' H_2O_2 del 0,003%. Tot seguit submergíem les mostres en aquesta solució i ho manteníem allà aproximadament entre 5-10 min abans d'aturar la reacció submergint les mostres en aigua miliQ. Posteriorment fèiem tres rentats més de 5 min amb aigua miliQ.

Finalment, després de revelar i rentar, contrastàvem les mostres breument amb hematoxilina (de 8 a 10 s), extrèiem l'excés de colorant amb un rentat ràpid amb

aigua destil·lada (per evitar el viratge de l'hematoxilina) i muntàvem les mostres amb DPX (veure apartat 3.5.3.).

3.5.7.2. Immunohistoquímica per detectar la presència i localització dels receptors ErbB en talls de ronyó

Reactius

-PBS

-PBS-Tween: Tween-20 (*Sigma*) al 0,05% en PBS

-PBS-BSA: Albúmina sèrica bovina (BSA) al 2% en PBS

-Tris-HCl: Trizma Base (*Roche*) 0,1 M i pH 7.6

-Solució de blocatge de les peroxidases endògenes: metanol (*Panreac*) al 10% i H₂O₂ (*Panreac*) al 3% en PBS

-Solució de blocatge de les unions inespecífiques: sèrum de cabra (*Gibco*) al 2% i glicina (*Panreac*) 0,1 M en PBS-BSA

-Anticossos primaris: veure taula 4

-Anticossos secundaris: veure taula 5

-Solució de revelat: 3',3'-Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma*) al 0,05% i H₂O₂ (*Panreac*) al 0,01% en tampó Tris-HCl a pH 7.6

Procediment

En aquesta immunohistoquímica els passos a seguir eren pràcticament els mateixos que en la detecció del BrdU, a excepció, és clar, de la desnaturalització del DNA, ja que en aquest cas els antígens eren proteïnes i no DNA.

Les mostres de partida ja havien estat desparafinades i hidratades (veure apartat 3.5.2.). A partir d'aquí vam realitzar la immunohistoquímica seguint els següents passos:

Blocatge de les peroxidases endògenes

En aquest cas consistia en una incubació de 15 min amb la solució de blocatge de les peroxidases endògenes. Passat aquest temps realitzàvem tres rentats de 10 min amb PBS.

Blocatge

Per tal de bloquejar les unions inespecífiques aplicàvem 300 µl de la solució de blocatge a cada portaobjectes i els deixàvem dins una cambra humida durant 1 h a temperatura ambient. Passat aquest temps extrèiem la solució de blocatge per decantació i afegíem la solució que contenia l'anticòs primari.

Incubació amb l'anticòs primari

L'anticòs primari estava diluït en una solució que contenia: sèrum de cabra a l'1%, Tween-20 al 0,05% i azida sòdica al 0,03% en PBS-BSA. La relació d'anticossos utilitzats amb aquesta tècnica es pot veure a la taula 4. La incubació es duia a terme durant tota la nit a 4 °C a la cambra humida. Per evitar que s'escolés l'anticòs, cobríem els portaobjectes amb uns cobreobjectes que tenien una miqueta de laca a les cantonades.

L'endemà deixàvem temperar les mostres durant uns minuts i posteriorment fèiem tres rentats de 5 min amb PBS-Tween per tal d'extreure l'anticòs no unit a la mostra.

		Espècie	Referència	Casa Comercial
Anti-ErbB1	Policlonal	Conill	1005: sc-03	<i>Santa Cruz</i>
Anti-ErbB2	Policlonal	Conill	C18: sc-284	<i>Santa Cruz</i>
Anti-ErbB3	Monoclonal	Ratolí	05-390: clone 2F12	<i>Upstate/Millipore</i>
Anti-ErbB4	Policlonal	Conill	C18: sc-283	<i>Santa Cruz</i>

Taula 4. Relació d'anticossos primaris en immunohistoquímica i immunocitoquímica

Incubació amb l'anticòs secundari

La detecció de l'anticòs primari es realitzava mitjançant un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave (HRP). Aquest estava diluït 1/200 en una solució que contenia sèrum de cabra a l'1,5% en PBS. L'anticòs secundari utilitzat depenia de l'anticòs primari (veure taula 5). Incubàvem les mostres amb l'anticòs secundari

durant 1 h a temperatura ambient i dins de la cambra humida. Passat aquest temps, realitzàvem tres rentats de 5 min amb PBS.

Finalment, abans de procedir al revelat, submergíem les mostres en tampó Tris-HCl a pH 7.6 i fèiem tres rentats de 5 min cadascun.

	Referència	Casa Comercial
Anticòs de cabra contra IgGs de ratolí unit a peroxidasa	115-035-008	<i>Jackson Immunoresearch</i>
Anticòs de cabra contra IgGs de conill unit a peroxidasa	111-035-008	<i>Jackson Immunoresearch</i>
Anticòs de cabra contra IgGs de ratolí unit a Rhodamin Red	115-295-003	<i>Jackson Immunoresearch</i>
Anticòs de cabra contra IgGs de conill unit a Fluorosceïna (FITC)	111-095-003	<i>Jackson Immunoresearch</i>

Taula 5. Relació d'anticossos secundaris en immunohistoquímica i immunocitoquímica

Revelat

Per revelar, primerament preparàvem la solució de revelat, però no afegíem l'H₂O₂ fins just abans de començar. Una vegada tot preparat, submergíem les mostres dins la solució de revelat i les deixàvem allà entre 5 i 15 min, depenent de la intensitat de senyal que obteníem. Quan consideràvem que ja era suficient, aturàvem la reacció de revelat submergint les mostres en aigua miliQ. Posteriorment fèiem tres rentats més de 5 min amb aigua miliQ.

Finalment, després de revelar i rentar, contrastàvem les mostres breument amb hematoxilina (de 8 a 10 s), extrèiem l'excés de colorant amb aigua corrent de l'aixeta durant 5 min, i muntàvem les mostres amb DPX (veure apartat 3.5.3.).

3.5.7.3. Immunocitoquímica de fluorescència

Reactius

- Solució de rentat: glicina (*Panreac*) 20 mM en PBS
- Solució de permeabilització: Tritó X-100 (*Sigma*) 0,1% en PBS
- Solució de blocatge: Albúmina Sèrica Bovina (BSA) a l'1% en tampó de rentat

Procediment

Les mostres de partida són les preparacions de cardiomiòcits obtingudes de l'aïllament de cardiomiòcits de ratolí (veure apartat 3.4.).

Permeabilització

En el moment de la seva utilització, les preparacions de cardiomiòcits estaven deshidratades, així que el primer que fèiem era hidratar-les mitjançant dos rentats de 5 min amb la solució de rentat. Seguidament incubàvem cada portaobjectes amb 1 ml de la solució de permeabilització durant 10 min a temperatura ambient. Aquest pas té com a finalitat permetre l'entrada dels anticossos dins les cèl·lules, ja que a diferència dels talls de parafina, en aquest cas partim de cèl·lules senceres, i si no permeabilitzèssim la membrana, seria impossible que els anticossos tinguessin accés a l'interior cel·lular.

Passats els 10 min, realitzàvem dos rentats més de 5 min amb tampó de rentat.

Blocatge de les unions inespecífiques

El blocatge el realitzàvem incubant els portaobjectes amb 1 ml de la solució de blocatge durant 20 min a temperatura ambient. En principi el blocatge es donava tant a la cara cel·lular externa com a l'interior cel·lular. Passats els 20 min procedíem a incubar les mostres amb l'anticòs primari.

Incubació amb l'anticòs primari

L'anticòs primari estava diluït 1/50 en solució de blocatge. La relació d'anticossos utilitzats en aquesta tècnica es pot veure a la taula 4. La incubació es duia a terme durant tota la nit a 4 °C a la cambra humida. Per evitar que s'escolés

l'anticòs, cobríem els portaobjectes amb uns cobreobjectes que tenien una miqueta de laca a les cantonades.

L'endemà deixàvem temperar les mostres durant uns minuts i posteriorment fèiem dos rentats de 5 min amb la solució de rentat per tal d'extreure l'anticòs no unit a l'antigen.

Incubació amb l'anticòs secundari

La detecció de l'anticòs primari es realitzava mitjançant un anticòs secundari conjugat a un fluoròfor, és a dir, a una molècula orgànica fluorescent. Depenent de les característiques de la molècula, aquesta emet fluorescència a una longitud d'ona o a una altra; en el nostre cas vam utilitzar anticossos units a FITC (màxim d'absorció a 492 nm i màxim d'emissió a 520 nm) i Rhodamine Red (màxim d'absorció a 570 i màxim d'emissió a 590 nm).

L'anticòs secundari estava diluït 1/200 en una solució que contenia sèrum de cabra a l'1,5% en PBS. La incubació era d'1 h a temperatura ambient dins la cambra humida i a les fosques per tal de no afectar la fluorescència. De fet, a partir d'aquest moment i fins al final, les mostres sempre estaven a les fosques. Passat aquest temps, realitzàvem dos rentats de 5 min amb tampó de rentat i deixàvem les mostres llestes per ser muntades (veure apartat 3.5.3.).

3.6. Quantificació d'EGF a teixits, orina i plasma

3.6.1. Fonament

L'*ELISA* ("Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay") utilitzada per la quantificació d'EGF en teixits, orina i plasma és del tipus indirecte d'inhibició per antigen. S'ha emprat el mètode descrit per *Grau i col.* (109), 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 comercials 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 utilitzar una immunoglobulina G de cabra anti-conill conjugada amb

peroxidasa (anticòs secundari). En presència de peròxid d'hidrogen, la peroxidasa catalitza la transformació d'un substrat incolor, la O-fenilendiamina, en un producte de color. Aquest, permet 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 una major densitat òptica del pou era indicatiu d'una major unió dels anticossos comercials de conill anti-EGF a l'EGF adsorbit a la placa, i per tant, d'una menor concentració d'EGF a la mostra analitzada.

3.6.2. Material

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

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

3.6.3. Reactius

-PBS

-EGF de ratolí 9,1 μM (*Roche*)

-Plasma de rata (obtingut al nostre laboratori) (només s'utilitza per mesurar EGF a plasma)

-Solució fixadora: isopropanol (*Fluka*) 25% i àcid acètic 10% v/v en aigua destil·lada

-Solució de blocatge: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 5% en PBS

-MTP: llet en pols desnatada al 0,5% i Tween-20 (*Sigma*) al 0,1% en PBS

-Anticòs primari: anticòs policlonal de conill anti-EGF de ratolí (*Upstate*, #06-102)

-Anticòs secundari: immunoglobulines G de cabra anti-conill conjugades amb peroxidasa (*Jackson Immunoresearch*)

-Solució de revelat: O-fenilendiamina (*Sigma*) 0,4 mg/ml, H_2O_2 (*Panreac*) 60 ppm en tampó citrat (*Panreac*) 0,15 M a pH 5

-HCl (*Panreac*) 2,5 M

3.6.4. Processament de les mostres

Material

-Balança de precisió (*Sartorius BP61S*)

-Morter de porcellana (*Afora*)

-Disruptor cel·lular (*Ultra-turrax T25*, IKA® LABORTECHNIK)

- Ultracentrífuga (*Beckman coulter, Optima™ L-90K*; rotor *Sorvall® T-875*)
- Tubs de policarbonat per a la ultracentrífuga (*Beckman Coulter*)

Procediment

Es pesaven els teixits a la balança de precisió i després es col·locaven dins un morter on eren fragmentats. A continuació agafàvem un tros de teixit d'aproximadament 300 mg i el submergíem en 2 ml de PBS. Per homogenitzar els teixits es va utilitzar un disruptor cel·lular (a una velocitat mitjana de 3.000 rpm) mantenint sempre el tub amb la mostra submergit en aigua amb gel. El temps necessari per a una total homogenització era d'aproximadament 30 s. Una vegada homogeneïtzats, agafàvem el contingut dels tubs i el col·locàvem en els tubs de policarbonat per a la ultracentrífuga. Centrifugàvem els tubs a una velocitat de 100.000 g i a 4 °C. Els sobrenedants recollits es guardaven a -20 °C.

El dia de la valoració, la mostra era més o menys diluïda en MTP en funció del teixit, i a partir d'aquesta dilució es quantificava la concentració d'EGF a cadascuna de les mostres. Les dilucions eren de: 1/5000 per a les glàndules submaxil·lars, 1/1000 per l'orina, 1/4 per a les glàndules paròtides, 1/10 pel ronyó i el fetge i 1/5 pels plasmes.

3.6.5. Preparació de la corba patró

La patró tenia una composició diferent en funció de la mostra que havíem de mesurar. Així doncs, utilitzàvem una patró per mesurar les mostres de plasma i una altra pels teixits i l'orina. La raó és que vam observar que en el plasma hi ha un element que ens interfereix en la valoració de l'ELISA; aquest element es troba no només en el plasma de ratolí, sinó també en el de rata, però el nostre anticòs primari només és capaç de detectar l'EGF de ratolí. És per això que vam decidir utilitzar plasma de rata diluït 1/5 amb MTP a la patró en comptes d'MTP sol. Amb aquesta incorporació a la patró vam esquivar les interferències observades quan quantificàvem l'EGF en plasmes. Les proves realitzades per validar el mètode van ser satisfactòries.

A continuació mostrem com realitzàvem les diferents dilucions d'EGF de la patró:

EGF 66,6 nM	5,9 µl d'EGF 9,1 µl	+	794 µl MTP*
EGF 20 nM	135 µl d'EGF 66,6 nM	+	315 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
EGF 0,002 nM	45 µl d'EGF 0,002 nM	+	405 µl MTP

Aquestes solucions es preparaven en fresc cada dia ja que l'EGF no es pot congelar a concentracions inferiors a 10 nM.

*A la patró per mesurar mostres de plasma, on diu MTP nosaltres afegíem plasma de rata diluït 1/5 en MTP.

3.6.6. Procediment de la quantificació

Primer de tot es preparava una solució d'EGF 2 nM diluint 2 µl de la solució mare d'EGF (9,1 µl) en 11 ml de PBS. Seguidament es posaven 100 µl d'aquesta solució a cada pou (equivalent a 1 ng) i es deixava adsorbir l'EGF a la placa tota la nit a 4 °C en una cambra humida. L'endemà es fixava aquest EGF afegint 100 µl de solució fixadora a cada pou. La fixació es realitzava a temperatura ambient durant 15 min a la cambra humida. A continuació es realitzaven tres rentats d'1 min cadascun amb PBS per tal d'eliminar la solució fixadora. Per tal de buidar els pous totalment després d'abocar el líquid a la pica, es donaven uns quants cops amb la placa invertida sobre una superfície tova feta de paper de filtre.

Per evitar la unió inespecífica de l'anticòs a la placa, realitzàvem un blocatge afegint 350 µl de la solució de blocatge a cada pou, i ho manteníem durant 30 min dins la cambra humida en un bany a 37 °C amb agitació suau. Posteriorment es rentava la placa tres vegades amb MTP (1 min per rentat). Arribats a aquest punt, carregàvem la placa amb la mostra o patró i l'anticòs. Primerament posàvem 50 µl de la mostra o patró (aquesta per triplicat) i seguidament afegíem 50 µl de l'anticòs

primari (diluït 1/2500 amb MTP) per pou; es deixava la placa incubant durant 4 h dins la cambra humida i en el bany a 37 °C amb agitació suau.

Passades les 4 h, es realitzaven 3 rentats de la placa amb MTP (1 min per cada rentat) i procedíem a la incubació de l'anticòs secundari afegint 100 µl per pou d'aquest anticòs (diluït 1/10000 amb MTP). La incubació amb l'anticòs secundari durava 90 min i es realitzava també a la cambra humida i al bany a 37 °C amb agitació suau. Acabada la incubació es feien els 3 últims rentats amb MTP (1 min cadascun) i aleshores afegíem 100 µl de la solució de revelat a cada pou.

El revelat de la placa tenia lloc a les fosques i s'aturava aproximadament als 10 min (depenent de la intensitat del color) afegint 50 µl d'HCl 2,5 M; a continuació llegíem l'absorbància de la placa a 492 nm.

3.6.7. Càlculs

La corba patró de l'ELISA del tipus indirecte d'inhibició per antigen 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 què s'obté ½ de D_{max}

Els paràmetres ab₀, D_{max} i CD_{0,5} s'estimaven mitjançant el mètode de mínims quadrats.

3.7. Valoració de proteïnes

Fonament

Per a la quantificació de proteïnes de teixit, així com també de plasma, es va utilitzar el mètode descrit per *Lowry i col. (247)*, posteriorment modificat per *Zak i Cohen (248)*. Aquest mètode colorimètric es basa en l'aparició de color al reaccionar el reactiu fenol de Folin Ciocalteu amb els residus dels aminoàcids de les proteïnes, especialment la tirosina i el triptòfan.

Material

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

Reactius

- NaOH (*Panreac*) 2 M i 0,1 M
- Solució A: Na₂CO₃ (*Panreac*) al 2% en NaOH (*Panreac*) 0,1 M (es guardava a la cambra freda)
- Solució B: CuSO₄·5H₂O (*Panreac*) a l'1% en aigua destil·lada (es guardava a la cambra freda)
- Solució C: Tartrat·Na-K (*Panreac*) al 2% en aigua destil·lada
- Solució D: 9,8 ml de la solució A + 0,1 ml de la solució B + 0,1 ml de la solució C
- Solució de Folin-Ciocalteu: reactiu de Folin-Ciocalteu (*Panreac*) diluït 1/4 amb aigua destil·lada
- Solució d'albumina sèrica bovina (BSA) (*Sigma*) a l'1% (p/v) en aigua destil·lada

Processament de les mostres

Introduïem 50 µl de la mostra en un tub eppendorf i hi afegíem 50 µl d'NaOH 2 M. A continuació, bullíem les mostres durant 5 min per tal d'obtenir una perfecta digestió del teixit. Una vegada les mostres ja s'havien refredat, diluíem la mostra 1/100 amb NaOH 0,1 M. Això ho aconseguíem barrejant 10 µl de la mostra digerida amb 990 µl d'NaOH 0,1 M. En aquest moment la mostra ja estava preparada per ser valorada.

Preparació de la corba patró

Primerament diluíem la solució mare d'albumina 1/10 amb NaOH 0,1 M per tal d'obtenir una concentració d'1 mg/ml. A partir d'aquí realitzàvem dilucions 1/2 de la manera com s'indica:

500 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 1 mg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M
250 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 500 µg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M
125 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 250 µg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M
62,5 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 125 µg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M
31,2 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 62,5 µg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M
15,6 µg/ml proteïna:	500 µl BSA 31,2 µg/ml	+	500 µl de NaOH 0,1 M

El blanc el fèiem amb NaOH 0,1 M.

Procediment

Primerament pipetejàvem per duplicat 50 µl de cada mostra diluïda o patró en una placa Corning de 96 pous; a continuació preparàvem la solució D i n'afegíem 200 µl a cada pou. Al cap d'uns segons ja s'han format unions amb el coure i aleshores afegíem 50 µl de la solució de Folin-Ciocalteu a cada pou. Deixàvem que la reacció tingués lloc durant 60 min a temperatura ambient. Passat aquest temps, realitzàvem la lectura de la densitat òptica a una longitud d'ona de 590 nm.

3.8. Altres determinacions

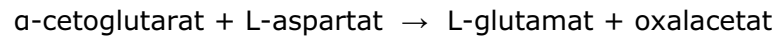
3.8.1. Aspartat transaminasa (AST) en plasma

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

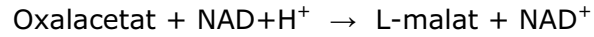
Fonament

L'activitat de l'AST a plasma va ser determinada seguint el fonament del mètode espectrofotomètric descrit per *Rej i Horder* (249). Segons aquest mètode, l'oxalacetat format en la reacció de transaminació produïda per l'AST és reduït al seu hidroxilàcid corresponent, el malat, gràcies a l'actuació de la malat deshidrogenasa.

La seqüència de reaccions és:



L-Aspartat: 2-oxoglutarat aminotransferasa



Malat deshidrogenasa

Dins l'interval de linealitat de la reacció, 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 l'activitat de l'AST, tant el NADH com l'enzim malat deshidrogenasa han d'estar presents en excés.

Material

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

Reactius

- Tampó Tris: Trizma Base (*Roche*) 100 mM a pH 7.8
- Solució d'Aspartat (*Panreac*) 297 mM en tampó Tris
- Solució de 2-oxoglutarat (*Sigma*) 144 mM en tampó Tris
- Solució de 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 barrejant 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 la temperàvem a temperatura ambient, juntament amb la solució de 2-oxoglutarat.

Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven en una cubeta semimicro 10 µl de cada mostra i 1 ml de la solució reactiva. S'agitava per inversió i ho deixàvem 10 min 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 s es feia una primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La segona mesura es realitzava 10 min després (DO_f). 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 la lectura inicial i la final (segons)

V_t = volum final a la cubeta (µl)

V_m = volum de mostra (µl)

6,317·10⁻² l·mol⁻¹·mm⁻¹ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30 °C

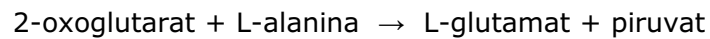
3.8.2. Alanina transaminasa (ALT) en plasma

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

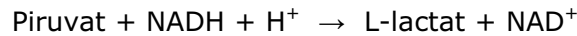
Fonament

L'activitat de l'ALT a plasma va ser determinada segons el mètode descrit per *Horder i Rej* (250). 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 la reacció és:



L-Alanina: 2-oxoglutarat aminotransferasa



Lactat deshidrogenasa

Dins l'interval de linealitat de la reacció, 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'ALT. Per tal que la reacció sigui limitada únicament per l'activitat de l'ALT, tant el NADH com l'enzim lactat deshidrogenasa han d'estar presents en excés.

Reactius

- Tampó Tris: Trizma Base (*Roche*) 110 mM a pH 7.3
- Solució de L-Alanina (*Panreac*) 615 mM en tampó Tris
- Solució de 2-oxoglutarat (*Sigma*) 180 mM en tampó Tris
- Solució de Piridoxal-fosfat (*Sigma*) 5,44 mM en tampó Tris
- Lactat deshidrogenasa (*Roche*) de múscul de porc (550 KU/l) preparat en una solució de 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 d'LDH i 1,65 mg de NADH. Un cop preparada la barreja de reacció, la temperàvem a temperatura ambient, juntament amb la solució de 2-oxoglutarat.

Es descongelen les mostres de plasma i es pipetejaven en una cubeta semimicro 10 µl de cada mostra i 1 ml de la solució reactiva. S'agitava per inversió i ho deixàvem durant 10 min 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 s realitzàvem la primera lectura de l'absorbància a 340 nm (DO_i). La mesura es repetia 10 min més tard (DO_f). Per cada valoració calia fer un blanc amb 10 µl de

PBS ja que vam observar que fins i tot sense mostra l'absorbància a 340 nm baixava lleugerament durant els 10 min i això ens hauria fet sobrevalorar l'activitat ALT. Durant els 10 min en què realitzàvem la reacció es mantenia la linealitat.

Càlculs

L'activitat ALT 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:

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

10 mm = amplada de la cubeta

600 = temps entre la lectura inicial i la final (segons)

V_t = volum final a la cubeta (μl)

V_m = volum de mostra (μl)

$6,317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30 °C

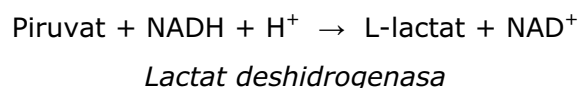
3.8.3. Lactat deshidrogenasa (LDH) en plasma

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 revers, és a dir, la producció de piruvat i NADH.

Fonament

L'activitat de l'LDH va ser determinada segons el mètode espectrofotomètric descrit per *Vassault* (251); està fonamentat en la reducció enzimàtica del piruvat a lactat en presència de lactat deshidrogenasa al medi.

La reacció és:



Reactius

- Tampó Tris-NaCl: Trizma Base (*Roche*) 81,3 mM i NaCl (*Panreac*) 203,3 mM a pH 7.2
- Solució de 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 es temperaven a temperatura ambient fins al moment de la seva utilització. Es descongelaven les mostres de plasma i es pipetejaven en una cubeta 4 µl de mostra, 835 µl de la solució de NADH i 166 µl de piruvat. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 5 min repetíem la mesura (DO_f), ja que en aquest període es mantenia la linealitat.

Càlculs

L'activitat LDH de la mostra es calculava segona 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 la lectura inicial i la final (segons)

V_t = volum final a la cubeta (µl)

V_m = volum de mostra (µl)

$6,317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30 °C

3.8.4. α-hidroxitiracat deshidrogenasa (α-HBDH o LDH-1) en plasma

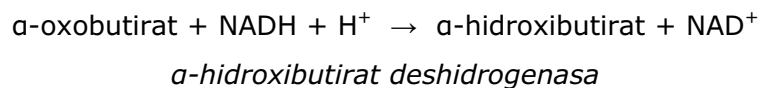
L'enzim lactat deshidrogenasa anteriorment descrit (veure apartat 3.8.3.) té una especificitat per diversos substrats α-hidroxiàcids i oxoàcids, a més a més de l'L-lactat. Quan un d'aquests substrats, l'α-oxobutirat, és reduït a α-hidroxitiracat per part de la lactat deshidrogenasa, parlem d'activitat α-hidroxitiracat deshidrogenasa. Dues de les cinc formes de l'LDH, l'LDH-1 i l'LDH-2, especialment abundants a cor, són relativament més actives amb l'α-oxobutirat com a substrat que no pas amb el

piruvat. Quan aquests dos isoenzims són presents, la reducció de l' α -oxobutirat de la mostra té lloc a una taxa considerable; en canvi, la resta d'isoenzims de l'LDH són molt menys actius. És per això, doncs, que s'ha proposat la mesura de l' α -HBDH com a alternativa a la determinació dels isoenzims de l'LDH. La mesura de l' 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 espectofotomètric descrit per *Henderson* (252), el qual està basat en la reducció de l' α -cetobutirat en presència de l' α -hidroxibutirat deshidrogenasa.

La reacció és:



L'aparició de NAD^+ com a producte d'aquesta reacció és directament proporcional a la disminució de l'absorbància del NADH a 340 nm.

Reactius

- Tampó fosfat: Na_2HPO_4 (*Panreac*) 16 mM i KH_2PO_4 (*Panreac*) 13 mM en aigua destil·lada
- Solució de 2-oxobutirat (*Sigma*) 71 mM en tampó fosfat
- NADH, *dissodium salt* (*Roche*)

Procediment

Es preparava la solució reactiva barrejant 25 ml de tampó fosfat i 3,8 mg de NADH i es temperava a temperatura ambient fins al moment de la seva utilització. Es descongelaven els plasmes i es pipetejaven 20 μl de mostra, 1 ml de la solució de NADH i 50 μl de la solució de 2-oxobutirat en una cubeta semimicro. S'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància a 340 nm (DO_i). Passats 4 min repetíem la mesura (DO_f) ja que sabíem que durant aquest període es mantenia la linealitat.

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 la lectura inicial i la final (segons)

V_t = volum final a la cubeta (μl)

V_m = volum de mostra (μl)

$6,317 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ = coeficient d'absorció molar del NADH a 340 nm i 30 °C

3.8.5. Determinacions automàtiques de metabòlits en plasma i/o orina

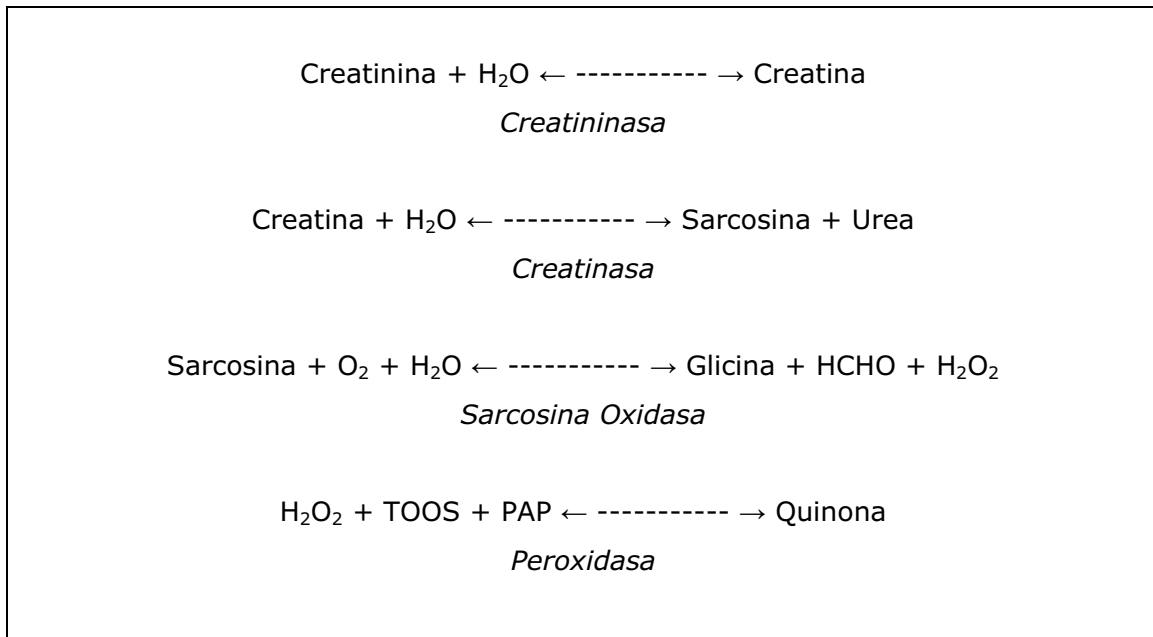
Les determinacions de creatinina, urea i concentració de proteïnes en orina les vam realitzar amb mètodes automatitzats a l'aparell *Metrolab 2300* (RAL, Laboratory Techniques, Barcelona) amb reactius subministrats per la casa *Ral*. Per altra banda, les determinacions dels ions Na^+ i K^+ es van realitzar a l'aparell *Cobas Mira Plus* (ABX Ibérica, Madrid).

3.8.5.1. Concentració de proteïnes en orina

Les proteïnes, juntament amb el vermell de pirogallol i el molibdat, formen un complex de color vermellós. El color és directament proporcional a la concentració de les proteïnes. Amb aquesta tècnica automatitzada es poden determinar concentracions entre 20 i 3000 mg/l.

3.8.5.2. Concentració de creatinina

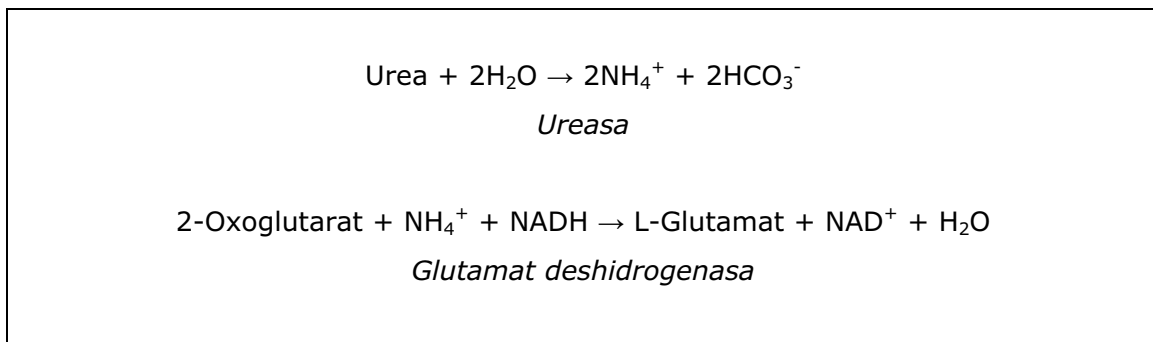
La creatinina es va determinar en mostres de plasma i orina. Es va utilitzar un mètode enzimàtic basat en la següent seqüència de reaccions:



L'absorbància del compost de quinona és directament proporcional a la concentració de creatinina a la mostra. Amb aquesta tècnica automatitzada es poden determinar concentracions de creatinina entre 0,02 i 30 mg/dl.

3.8.5.3. Concentració d'urea

La urea es va determinar en mostres de plasma i orina. Es va utilitzar un mètode enzimàtic basat en la següent seqüència de reaccions:



La disminució de l'absorbància produïda per la desaparició del NADH és directament proporcional a la concentració d'urea. Amb aquesta tècnica automatitzada es poden determinar concentracions d'urea entre 2 i 300 mg/dl.

3.8.5.4. Concentració de Na⁺ i K⁺

El Na⁺ i el K⁺ es van determinar utilitzant el mètode de l'elèctrode selectiu.

3.9. Western Blot

3.9.1. Homogenització de les mostres per a western blot

Material

- Disruptor cel·lular (*Ultra-turrax T25, IKA® LABORTECHNIK*)
- Centrífuga (*Eppendorf, 5415 R*)
- Morter de porcellana (*Afora*)
- Balança de precisió (*Sartorius BP61S*)

Reactius

- Tampó Tris-HCl: Trizma Base (*Roche*) 50 mM i NaCl (*Panreac*) 150 mM en aigua destil·lada i pH 7.4
- Tampó d'homogenització: EGTA (*Sigma*) 1 mM; NaVO₄ (*Sigma*) 1 mM; NaF (*Merck*) 1 mM; PMSF (*Roche*) 1 mM; aprotinina (*Roche*) 0,3 µM; pepstatina (*Roche*) 1 µM; leupeptina (*Roche*) 1 µM en tampó Tris-HCl
- SDS (*Merck*)
- Tritó X-100 (*Sigma*)
- Deoxicolat sòdic (*Sigma*)
- Nonidet P-40 (*USB Corporation*)

Procediment

Els teixits sempre els teníem congelats a -80 °C. Així doncs, en el moment de l'homogenització els teixits eren submergits en nitrogen líquid per tal de transportar-los i mantenir-los congelats durant l'espera. Primerament, preparàvem el tampó d'homogenització sense detergents. Un cop preparat, n'afegíem 2 ml en un tub de poliestirè submergit en gel i allà hi afegíem el tros de teixit a homogenitzar, prèviament pesat a la balança (en alguns casos el teixit era massa gran i havíem de fragmentar-lo amb un morter i agafar-ne el tros que necessitàvem). Vam homogenitzar els diferents teixits mitjançant un disruptor cel·lular (uns 30 s a 4000 rpm), sempre amb el tub en contacte amb gel. A continuació afegíem 0,73 ml més de tampó i també els detergents*, ho agitàvem amb vòrtex i ho deixàvem en gel. Durant 1 h manteníem els homogenats en gel agitant amb vòrtex cada 15 min. Passada l'hora, repartíem el contingut dels tubs en tubs eppendorfs i ho

centrifugàvem durant 10 min a 12.000 g. Finalment, recuperàvem el sobrenedant en un altre tub eppendorf i el conservàvem a -80 °C fins a la seva utilització.

*Els detergents utilitzats depenien de la tècnica per a la qual estiguéssim preparant els homogenats. Així doncs, si la finalitat era realitzar una electroforesi i western blot, aleshores la combinació de detergents emprada era: SDS al 0,1%, Tritó X-100 a l'1% i Deoxicolat sòdic al 0,5%. Ara bé, si es volien utilitzar els homogenats per a fer una immunoprecipitació, aleshores afegíem 0,91 ml de tampó en comptes de 0,73, i el detergent utilitzat era el Nonidet P-40 a una concentració de l'1%. Això és així perquè la combinació dels tres detergents és més efectiva a l'hora d'alliberar les proteïnes de les membranes; ara bé, és massa agressiva i no ens permetria realitzar les immunoprecipitacions ja que interferiria en la unió dels anticossos a les boles de Proteïna G-Sefarosa. El Nonidet P-40 no és tant efectiu a l'hora de disgregar les membranes, però no interfereix tant en aquesta unió i permet fer les immunoprecipitacions correctament.

3.9.2. Aïllament de membranes

Material

- Homogenitzador manual (*Anorsa*)
- Centrífuga (*Eppendorf*, 5415 R)
- Morter de porcellana (*Afora*)

Reactius

- Tampó Sacarosa-Hepes: Sacarosa (*Panreac*) 250 mM i Hepes (*Roche*) 10 mM en aigua destil·lada i pH 7.5
- Tampó d'homogenització: EDTA (*Sigma*) 1mM; NaVO₄ (*Sigma*) 1 mM; NaF (*Merck*) 1 mM; PMSF (*Roche*) 1 mM; aprotinina (*Roche*) 0,3 µM; pepstatina (*Roche*) 1 µM; leupeptina (*Roche*) 1 µM en tampó Sacarosa-Hepes

Procediment

Els teixits sempre els teníem congelats a -80 °C. Així doncs, en el moment de l'homogenització els teixits eren submergits en nitrogen líquid per tal de transportar-los i mantenir-los congelats durant l'espera. Primerament, preparàvem el tampó d'homogenització. Un cop preparat, n'afegíem 3 ml a l'interior de l'homogenitzador i

ho deixàvem en gel. Un cop refredat el tampó, procedíem a pesar el teixit i a introduir-lo dins de l'homogenitzador amb el tampó. Homogenitzàvem la mostra manualment durant aproximadament 2 min, fins que ens semblava que ja havíem disgregat tot el teixit. Aleshores traspassàvem l'homogenat a tubs eppendorfs i realitzàvem una primera centrifugació durant 15 min a 1.000 g. Amb aquesta primera centrifugació en principi precipiten cèl·lules senceres, nuclis i mitocondris. Un cop acabada, recollíem el sobrenedant en un segon tub eppendorf i descartàvem el pellet. Aquests tubs eren novament centrifugats, aquesta vegada durant 30 min a 16.100 g. En aquesta segona centrifugació separàvem les membranes (pellet) de les vesícules i el citoplasme (sobrenedant). Acabada la centrifugació recollíem de nou el sobrenedant en un tercer eppendorf i resuspeníem el pellet en el mateix segon eppendorf amb 0,8 ml de tampó d'homogenització. Tant el sobrenedant com el pellet eren guardats a -80 °C fins a la seva utilització.

3.9.3. Immunoprecipitació dels receptors ErbB

Fonament

La immunoprecipitació és una tècnica emprada per a l'aïllament d'una proteïna o d'un complex de proteïnes concretes d'una solució on hi ha moltes altres proteïnes. Per a això, és necessari tenir un anticòs que s'uneixi específicament a la proteïna que ens interessa aïllar. També és necessari aconseguir que l'anticòs s'uneixi a alguna estructura sòlida, ja que serà aquesta unió la que finalment ens permetrà separar la nostra proteïna d'interès de totes les altres que estan a la solució. En el nostre cas, aquesta estructura sòlida van ser petites boles de sefarosa unides a proteïna G, la qual té la capacitat d'unir-se específicament a les regions Fc de moltes immunoglobulines de mamífer.

En general, aquesta tècnica s'utilitza tant per aïllar i concentrar una proteïna d'interès com per estudiar unions entre proteïnes, ja que si la proteïna d'interès es troba formant un complex amb altres proteïnes, al baixar-la és possible que també baixem els altres components del complex.

Material

- Agitador orbital (*P. Selecta*)
- Centrífuga (*Eppendorf, 5415 R*)
- Pipeta Hamilton (*Sigma Aldrich*)

Reactius

- Tampó d'homogenització Tris-HCl o Sacarosa-Hepes (depenent de la mostra a utilitzar) (veure apartats 3.9.1. i 3.9.2. respectivament) amb el detergent NP-40 incorporat a una concentració de l'1%
- Boles de Sefarosa unides a Proteïna G (*Sigma, Protein G-Sepharose® 4B*)
- Tampó de càrrega x1 (veure apartat 3.9.4.3.)

Procediment

Durant el procés de la immunoprecipitació hi trobem tres passos ben diferenciats: 1, interacció entre l'anticòs i l'antigen; 2, formació del complex triple amb les boles de Sefarosa unides a Proteïna G; 3, recuperació i separació del complex triple i aïllament de la proteïna d'interès.

1. Interacció entre l'anticòs i l'antigen

En primer lloc descongelàvem les mostres i preparàvem el tampó d'homogenització corresponent a les mostres que teníem. En aquesta ocasió els tampons ja portaven incorporat el detergent (NP-40). Aleshores, en un tub eppendorf de 0,5 ml de capacitat, hi afegíem 1000 mg de proteïna de l'homogenat de la mostra i 2 µg de l'anticòs que ens interessés, en un volum final de 0,2 ml. En el cas de les mostres provinents de l'aïllament de membranes, hi afegíem un petit suplement d'NP-40 per tal d'aconseguir que la concentració final dins l'eppendorf fos de l'1% (recordem que aquests homogenats havien estat realitzats sense detergents). Així doncs, dins l'eppendorf hi teníem:

$$x \mu\text{l de mostra (1000 mg)} + y \mu\text{l d'anticòs (2 } \mu\text{g)} + z \mu\text{l d'aigua destil·lada} \\ + (k \mu\text{l d'NP-40 si s'escau)}$$

$$\text{on : } x + y + z + (k) = 200 \mu\text{l}$$

Una vegada ja teníem els eppendorfs amb tots els elements, aquests eren enganxats en un agitador orbital amb cinta adhesiva i deixats a 4 °C durant tota la nit donant voltes de manera que s'agitessin per inversió constantment.

2. Formació del complex triple amb les boles de Sefarosa unides a Proteïna G

Al matí següent preparàvem més quantitat del tampó d'homogenització corresponent. Aliquotàvem aproximadament 30 µl de boles de Sefarosa en un segon tub eppendorf de 0,5 ml de capacitat i realitzàvem dos rentats amb 0,4 ml de tampó d'homogenització. Cada rentat consistia en afegir el tampó, agitar l'eppendorf per inversió unes quantes vegades, deixar-ho reposar uns instants i centrifugar l'eppendorf durant 1 min a només 1000 g. Finalitzats els rentats, extrèiem el màxim de tampó amb una pipeta, deixant les boles netes i equilibrades dins l'eppendorf. Aleshores agafàvem l'eppendorf que contenia la barreja d'homogenat i anticòs i traspassàvem tot el seu contingut al segon eppendorf on hi havia les boles de Sefarosa. Ho agitàvem per inversió i ho tornàvem a enganxar a l'orbital. En aquesta ocasió ho deixàvem a 4 °C durant 2 h donant voltes.

3. Recuperació del complex triple i aïllament de la proteïna d'interès

Després de les 2 h d'incubació, en principi els anticossos ja s'han unit a la Proteïna G. Així doncs, el següent pas era primerament aïllar el complex triple de tota la resta de proteïnes i, posteriorment, desfer el complex per poder recuperar la nostra proteïna. Per aïllar el complex realitzàvem una centrifugació de 2 min a 1000 g. Recollíem el sobrenedant en un altre tub i fèiem tres rentats del pellet amb 0,4 ml de tampó d'homogenització cadascun. Després del tercer rentat extrèiem tot el tampó amb l'ajuda d'una pipeta Hamilton. En aquell moment ja teníem aïllat el complex triple. Només ens faltava trencar les unions entre els anticossos i l'antigen i desfer-nos de les boles de Sefarosa. Per aconseguir-ho afegíem al complex 30 µl de tampó de càrrega x1, barrejàvem les boles i el tampó amb un vòrtex i ho bullíem durant 5 min. En el tampó de càrrega hi ha SDS i DTT, dos agents que en principi han de trencar les unions entre l'antigen i l'anticòs i entre aquest i la Proteïna G. Aleshores, centrifugàvem l'eppendorf durant 2 min a 16.100 g per separar el tampó de les boles de Sefarosa unides encara a la Proteïna G. Recollíem el sobrenedant, és a dir, el tampó amb, entre altres, la nostra proteïna, i ho posàvem en un últim eppendorf. Tornàvem aleshores a afegir 30 µl més de tampó de càrrega x1 a les boles de Sefarosa i repetíem el procés de barrejar, centrifugar i recollir el sobrenedant, aquesta vegada, però, amb una pipeta Hamilton per tal de recuperar el màxim de tampó de càrrega possible. Afegíem aquest segon sobrenedant a l'anterior i donàvem per acabada la immunoprecipitació. En aquell moment podíem fer directament l'electroforesi (veure apartat 3.9.4.) o bé congelar l'immunoprecipitat a -20 °C i fer l'electroforesi un altre dia.

3.9.4. Electroforesi (SDS-PAGE)

3.9.4.1. Fonament

La separació de proteïnes mitjançant gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, gràcies a la presència de dodecilsulfat sòdic (SDS) i d'un agent reductor com el ditionitritol (DTT) permet separar les proteïnes presents en una mostra en funció del 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 consistia en una barreja d'acrilamida-bisacrilamida al 3%), i el gel separador forma en canvi un entramat molecular més dens (6 o 12%, depenent de la proteïna a analitzar). Quan apliquem el corrent elèctric, les proteïnes migren a través del 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 en funció del seu pes molecular, avançant més aquelles que tenen un pes molecular menor i quedant més enrere les d'un pes molecular més elevat. La presència d'SDS i DTT durant l'electroforesi ens permet obviar la càrrega i la conformació original de les proteïnes, provocant la seva desnaturalització i conferint-los una càrrega negativa proporcional al seu pes molecular. D'aquesta manera, doncs, les proteïnes migraran únicament en funció del seu pes molecular.

3.9.4.2. Material

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

3.9.4.3. Reactius

- Barreja acrilamida-bisacrilamida: acrilamida (*Panreac*) al 29,2% (p/v), bisacrilamida (*BioRad*) al 0,8% (p/v), preparat amb aigua bidestil·lada. Un cop la barreja estava preparada, la filtràvem amb paper *Whatman* i la guardàvem a 4 °C protegida de la llum
- Tampó Tris 1,5 M: Trizma Base (*Roche*) preparat amb aigua destil·lada i ajustant el pH a 8.8
- Tampó Tris 0,5 M: Trizma Base (*Roche*) preparat amb aigua destil·lada i ajustant el pH a 6.8

- Solució d'SDS: SDS (*Roche*) 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 preparat es conservava a -20 °C
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilediamina) (*BioRad*)
- Tampó d'electroforesi: Trizma Base (*Roche*) 25 mM, Glicina (*Panreac*) 191,8 mM i SDS (*Roche*) al 0,1% (p/v) preparat amb aigua destil·lada
- Tampó de càrrega (concentrat x3): Trizma Base (*Roche*) 300 mM, Glicerol (*Panreac*) al 30% (p/v), SDS (*Roche*) al 10% (p/v) i blau de bromofenol (*Sigma*) al 0,01%, preparat amb aigua destil·lada, pH a 6.8. El dia de l'electroforesi afegíem DTT (*Sigma*) a una concentració de 100 mM.

3.9.4.4. Procediment

Preparació de les mostres

Primerament, descongelàvem el tampó de càrrega x3, li afegíem el DTT i ho diluíem fins a obtenir tampó de càrrega x2. Les mostres, totes provinents d'homogenats de teixits, eren aleshores descongelades. De 50 a 100 µg de proteïna (segons la proteïna a analitzar) eren pipetejats i posats en un nou eppendorf. Afegíem llavors la quantitat d'aigua necessària per arribar als 50 µl i tot seguit afegíem 50 µl de tampó de càrrega x2. D'aquesta manera igualàvem les concentracions de totes les mostres. Ho vortejàvem uns segons i seguidament ho bullíem 5 min. Carregàvem 20 µl de cada mostra.

Preparació dels gels i condicions de l'electroforesi

Muntàvem els vidres (anteriorment netejats amb etanol) on polimeritzarien els gels seguint les instruccions del fabricant, amb separadors d'1,5 mm d'amplada. Seguidament preparàvem la solució del gel separador (al 6 o al 12%):

	6%	12%
Aigua destil·lada (ml)	5,5	3,4
Acilamida-bisacrilamida 30% (ml)	2,1	4,2
Tampó tris 1,5 M (pH 8.8) (ml)	2,63	2,63
SDS 10% (µl)	110	110
PSA 10% (µl)	150	150
TEMED (µl)	10,5	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 introduíem la barreja entre els dos vidres (aproximadament uns 5 cm des de la base). Ràpidament afegíem una mica d'aigua destil·lada per sobre el gel (200 µl) per tal d'assegurar una superfície llisa del gel i també per evitar el contacte amb l'aire i excloure l'oxigen, el qual inhibiria la polimerització. Mentre el gel separador polimeritzava, es preparava la solució del gel concentrador (3,3%):

	3,3%
Aigua destil·lada (ml)	3,4
Acilamida-bisacrilamida 30%(ml)	0,6
Tampó tris 0,5 M (pH 6.8) (ml)	1,38
SDS 10% (µl)	55
PSA 10% (µl)	75
TEMED (µl)	5,5

Una vegada el gel separador havia polimeritzat, eliminàvem l'aigua de sobre el gel per capil·laritat mitjançant la introducció de paper de cel·lulosa entre els dos vidres. En aquest moment afegíem el TEMED a la solució del gel concentrador, agitàvem per inversió i l'abocàvem entre els dos vidres sobre el gel concentrador. A continuació col·locàvem amb molta cura la pinta per definir els pous del gel i ho deixàvem polimeritzar.

Una vegada polimeritzat, ja podíem col·locar els vidres amb els gels sobre el suport que constitueix la cubeta interna del sistema Mini Protean III Cell. L'omplíem amb 150 ml de tampó d'electroforesi, assegurant-nos que el gel concentrador quedava totalment submergit. Arribats a aquest punt, només ens quedava retirar la pinta i carregar els pous amb les mostres (20 µl per pou carregats amb pipeta). 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 100-120 min, fins que el front (indicat pel blau de bromofenol del tampó de càrrega) arribava a la part inferior del gel.

3.9.5. Western Blot

3.9.5.1. 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 aleshores transferides a una membrana per a la seva més fàcil manipulació; sobre aquesta membrana és on es realitzarà la immunodetecció de la proteïna desitjada.

3.9.5.2. Material

- Mini Trans-Blot (*Bio Rad*)
- Font d'electroforesi Power Pack-200 (*BioRad*)
- Paper *Whatman* 3 mm (*Whatman*)
- Membrana de difluorur de polivinil (PVDF), inmobilon-P (*Millipore*)
- Aparell d'obtenció d'imatges LAS 3000 (*Fugifilm*)

3.9.5.3. Reactius

- Tampó de transferència: Trizma Base (*Roche*) 25 mM, Glicina (*Panreac*) 192 mM, SDS (*Roche*) al 0,1% i metanol (*Panreac*) al 10% (v/v) preparat amb aigua destil·lada
- PBS
- Solució de blocatge: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 5% en PBS
- MTP: llet en pols desnatada (*Central Lechera Asturiana*) al 0,5% i Tween-20 (*Sigma*) al 0,05% en PBS
- Kit de quimioluminiscència ECL (*Amersham International*)
- Anticossos primaris i secundaris (veure taula 6 i 5, respectivament)

3.9.5.4. Procediment

Transferència

Inicialment, submergíem la membrana de PVDF amb metanol durant uns 30 s i després en aigua destil·lada durant 5 min. Seguidament la submergíem en tampó de transferència per tal que s'equilibrés. Per una altra banda, muntàvem el sistema de transferència segons les especificacions del fabricant i abans de posar la membrana sobre el gel, també deixàvem que aquest s'equilibrés durant 5 min en tampó de transferència. Una vegada la membrana i el gel s'havien equilibrat per separat, acabàvem de muntar el sistema. Vigilàvem especialment que no quedessin bombolles

entre la membrana i el gel, ja que això dificultaria una correcta transferència. El gel doncs, 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. Per tal que el tampó estigués fred contínuament i homogènia, ens ajudàvem d'una petita barra magnètica situada dins la cubeta de transferència.

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

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 passos: 1, bloqueig de la membrana; 2, incubació de la membrana amb un anticòs primari específic; 3, incubació de la membrana amb un anticòs secundari unit a una peroxidasa; 4, visualització del complex proteïna-anticòs.

Bloqueig de la membrana

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

Incubació amb l'anticòs primari específic

Després del bloqueig incubàvem la membrana amb la solució de l'anticòs primari en un petita cubeta durant tota la nit a 4 °C (per veure la relació d'anticossos utilitzats i les seves dilucions veure la taula 6). Finalitzada aquesta incubació, fèiem 4 rentats de 5 min amb 159 ml d'MTP cadascun. Els rentats es duïen a terme en cubetes cristal·litzadores.

	Anticòs	Refrència	Dilució i teixit
ErbB1	Policlonal conill	1005: sc-03 <i>Santa Cruz</i>	1/500 cor 1/1000 ronyó
ErbB2	Policlonal conill	C18: sc-284 <i>Santa Cruz</i>	1/1000 cor 1/500
ErbB3	Policlonal conill	C17: sc-285 <i>Santa Cruz</i>	1/1000 cor 1/1000 ronyó
ErbB4	Policlonal conill	06-572 <i>Upstate/Millipore</i>	1/1000 cor 1/500 ronyó
Tubulina	Monoclonal de ratolí	1 111 876 <i>Boehringer Mannheim</i>	1/10000 cor 1/10000 ronyó
Taula 6. Anticossos primaris utilitzats per a Western blot			

Incubació amb l'anticòs secundari

Acabats els rentats incubàvem la membrana amb la solució de l'anticòs secundari pertinent. La incubació tenia lloc en una petita cubeta a temperatura ambient durant 1 h. Finalitzada aquesta incubació, realitzàvem 4 rentats de 5 min amb MTP i 3 rentats més de 5 min amb PBS. Els anticossos secundaris eren utilitzats a una dilució d'1/200. La relació d'anticossos emprats es pot veure a la taula 5.

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 l'emissió de llum després de l'oxidació del luminol en presència d' H_2O_2 , en una reacció catalitzada per la peroxidasa. La llum produïda és proporcional a la quantitat de proteïna detectada pels anticossos. Aquesta llum és captada per l'aparell LAS3000, el qual digitalitza les imatges tant bon punt les obté.

Quantificació

La quantificació la realitzàvem amb el programa *Image Gauge* de la casa *Fugifilm* seguint les especificacions del fabricant.

3.9.6. Decapatge (stripping) de les membranes

Fonament

La utilització del decapatge (stripping) és molt útil en els casos en què disposem de poca quantitat de mostra. Ens permet reutilitzar una mateixa membrana per a mirar diferents antígens a partir d'una sola electroforesi i Western Blot, evitant-nos així la necessitat de realitzar múltiples electroforesis per a cada grup de mostres.

La tècnica es basa en la capacitat de l'agent reductor β -mercaptoetanol i del detergent SDS per a trencar les unions que s'han produït entre els anticossos primari, secundari i l'antigen que es troba a la membrana durant les diferents incubacions. Una vegada desenganxats i rentats, la membrana es pot incubar de nou amb un altre anticòs primari i secundari. Aquest protocol es pot aplicar diverses vegades a la mateixa membrana. Tot i que en alguns casos s'ha descrit que l'aplicació del protocol implica una petita pèrdua de proteïna de les membranes, en el cas de la membrana de PVDF aquesta pèrdua es considera pràcticament inexistent, validant així la seva utilització.

Material

- Bany termostatitzat amb agitació circular (*New Brunswick Scientific Co. Inc.*; model G76)

Reactius

-Metanol (*Panreac*)

-Tampó d'stripping: Trizma Base (*Roche*) 62,5 mM; SDS (*Merck*) 2% (p/v); β -mercaptoetanol (*Sigma*) 100 mM en aigua destil·lada

-PBS

-PBS-Tween: Tween (*Sigma*) 0,1% en PBS

Procediment

Primerament, preparàvem el tampó d'stripping, però sense afegir el β -mercaptoetanol. Paral·lelament escalfàvem el bany fins als 50 °C de temperatura. Per fer l'stripping utilitzàvem un recipient de plàstic amb tanca. Una vegada el bany assolí els 50 °C, posàvem el tampó dins el recipient i aquest al bany per tal

d'escalfar el tampó. Mentrestant, agafàvem la membrana i la submergíem en metanol durant 30 s i posteriorment la deixàvem en aigua destil·lada. Passats 5 min, anàvem a la campana d'extracció de gasos i allà afegíem primer el β -mercaptoetanol al tampó, i tot seguit col·locàvem la membrana dins el recipient (amb la cara on hi havia les proteïnes mirant amunt). Aleshores agafàvem el recipient i el posàvem dins el bany amb agitació moderada durant 30 min. Passat aquest temps, tornàvem a la campana de gasos i traspassàvem la membrana a un cristal·litzador. Allà realitzàvem primer un rentat de 5 min amb PBS i després tres rentats més de 5 min amb PBS-Tween. Una vegada finalitzats els rentats, la membrana havia de ser blocada de nou i posteriorment ja podíem procedir amb la incubació d'un altre anticòs primari (veure apartat 3.9.5. pel blocatge i les incubacions).

3.10. PCR a temps real (real-time PCR)

3.10.1. Aïllament d'RNA

Fonament

Per aïllar l'RNA hem utilitzat el mètode d'extracció basat en la utilització d'un reactiu que conté fenol i tiocianat de guanidina desenvolupat per *Chomczynski i Sacchi* l'any 1987 (253) i millorat pel primer el 1993 (254). Durant l'homogenització del teixit, el reactiu en qüestió trenca les cèl·lules i desnatura les nucleases endògenes. Posteriorment s'afegeix cloroform a la barreja i se centrifuga provocant la separació de la mostra en tres fases en les que trobem separatament l'RNA, el DNA i les proteïnes de la mostra. En el nostre cas agafem la fase on hi ha l'RNA i el recuperem fent-lo precipitar amb isopropanol.

Material

- Disruptor cel·lular (*Ultra-turrax T25, IKA®-Sabortechnik*)
- Tubs de RIA prèviament esterilitzats amb llum ultravioleta (*Deltalab*)
- Puntes de pipeta amb filtre (*Corning Incorporated*)
- Tubs eppendorfs esterilitzats
- Centrífuga (*Eppendorf, 5415 R*)
- Termo-agitador (*Eppendorf, 5437*)

Reactius

- Tripure Isolation Reagent (*Roche*)
- Isopropanol puríssim (*Panreac*)
- Etanol 75%: etanol puríssim (*Panreac*) al 75% diluït en aigua bidestil·lada

Procediment

Per a realitzar l'aïllament d'RNA sempre partíem de mostres que havien estat congelades a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Així doncs, primerament recuperàvem les mostres del congelador i les deixàvem en nitrogen líquid fins al moment de la seva utilització. Pesàvem aproximadament 50 mg de teixit, evitant en tot moment la seva descongelació i, ja dins la campana de gasos, submergíem el tros de teixit dins un tub amb 1 ml del reactiu *Tripure*. Homogenitzàvem el teixit mitjançant un disruptor cel·lular durant 15 s i ho deixàvem reposar durant 5 min a temperatura ambient per tal de trencar els complexos de nucleoproteïnes. Aprofitàvem aquest temps per a traspasar el contingut del tub a un tub eppendorf. Passats els 5 min afegíem 0,2 ml de cloroform, barrejàvem el contingut del tub amb vòrtex i ho incubàvem 10 min a temperatura ambient. Després de la incubació, centrifugàvem la mostra durant 15 min a 12.000 g i a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durant la centrifugació es formaven tres fases fàcilment diferenciables: una fase superior, aquosa i incolora, que contenia l'RNA; una fase intermèdia de color blanquinós que contenia el DNA; i finalment, la fase inferior, aquosa i vermella, que contenia les proteïnes.

En el nostre cas ens interessava només aïllar l'RNA, així que amb una pipeta recuperàvem la fase superior i la traspasàvem a un segon tub eppendorf. Allà hi afegíem 0,5 ml d'isopropanol, ho agitàvem per inversió unes quantes vegades i ho deixàvem incubant durant 10 min més a temperatura ambient. Passat el temps, centrifugàvem el tub de nou, però aquesta vegada durant 10 min també a 12.000 g i a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La presència d'isopropanol fa precipitar l'RNA, de manera que després de centrifugar el tub, apareixia un petit pellet de color blanc. Amb una pipeta extrèiem tot el líquid del tub amb molt de compte de no endur-nos el pellet, i un cop extret, afegíem 1 ml d'etanol al 75%. Agitàvem de nou per inversió i amb vòrtex, de manera que veiéssim el pellet surar en l'etanol. Aleshores tornàvem a centrifugar el tub, aquesta vegada, però, només durant 5 min a 7.500 g i a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. En acabar, tornàvem a tenir el pellet blanc al fons, així que extrèiem tot l'etanol amb una pipeta i amb molta cura. Tot i que no ho deia el protocol, nosaltres repetíem el pas de l'etanol una segona vegada per assegurar-nos que havíem eliminat tot l'isopropanol de la mostra.

Un cop extret l'etanol per segona vegada amb una pipeta, deixàvem assecar el pellet per eliminar tot l'etanol. Ho aconseguíem deixant els tubs en un termomixer durant aproximadament 10-20 min a 37 °C.

Finalment, resuspeníem l'RNA aïllat en el volum desitjat amb aigua miliQ (normalment en uns 100 µl) i ho deixàvem a -20 °C fins a la seva utilització.

3.10.2. Retrotranscripció

Fonament

La retrotranscripció inversa és una tècnica que ens permet passar l'RNA a DNA mitjançant la utilització de la retrotranscriptasa clonada del virus de la leucèmia murina (MuLV). Aquest pas és imprescindible de cara a realitzar posteriorment una real-time RT-PCR. Sempre intentàvem retrotranscriure a la vegada totes aquelles mostres que havien de ser posteriorment comparades entre si, ja que se sap que l'eficiència de la retrotranscripció no és sempre la mateixa. En un principi, però, s'assumeix que l'eficiència és del 100 %, i per tant, que tot l'RNA afegit a la reacció és retrotranscrit a cDNA.

Material

- Termociclador Gene Amp® System 2700 (*Applied Biosystems*)
- Puntes de pipeta amb filtre (*Corning Incorporated*)

Reactius

- Kit de retrotranscripció GeneAmp® RNA PCR (*Applied Biosystems*)

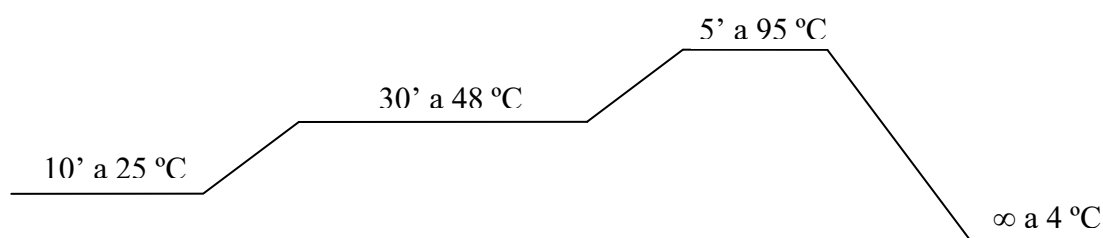
Procediment

Per realitzar la retrotranscripció partíem de les mostres d'RNA aïllat pel mètode anteriorment descrit (veure apartat 3.10.1.). En primer lloc, igualàvem les concentracions d'RNA de les mostres diluint-les si era necessari amb aigua miliQ. A continuació preparàvem el tampó de reacció a partir dels reactius subministrats pel kit de retrotranscripció i seguidament pipetejàvem als tubs corresponents la quantitat necessària de tampó i de mostra per tal de dur a terme la reacció. En general les

retrotranscripcions es realitzaven en un volum final d'entre 10 i 20 µl i la quantitat d'RNA retrotranscrit era de 0,5 a 2 µg. En cada tub de retrotranscripció hi havia:

	Volum final 10 µl	Volum final 20 µl
Mostra	3,85	7,7
Tampó de RT Taqman 10x	1	2
MgCl ₂	2,2	4,4
Barreja de Deoxy NTPs	2	4
Hexàmers aleatoris	0,5	1
Inhibidor d'RNAses	0,2	0,4
Retrotranscriptasa	0,25	0,5

Una vegada preparats tots els tubs, portàvem les mostres al termociclador i aplicàvem el següent programa:



Una vegada finalitzat les mostres eren guardades a -80 °C fins a la seva posterior utilització.

3.10.3. PCR a temps real (real-time PCR)

Fonament

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va ser desenvolupada el 1985 per *Saiki i col.* (255). El mètode permet l'amplificació de petits fragments de DNA (normalment entre 100 i 600 bases) en DNA de cadena doble. Per a aconseguir-ho, la PCR necessita dos *primers* d'uns 20 nucleòtids cadascun que siguin complementaris d'una seqüència concreta de cadascuna de les dues cadenes de DNA. Aquests *primers* són utilitzats com a punt de partida per una DNA polimerasa per tal de copiar el tros de cadena que ens interessa amplificar. Després de realitzar la primera còpia, aquests *primers* poden tornar a ser utilitzats, però aquesta vegada no només per a copiar el DNA que ha estat introduït la primera vegada, sinó també

aquell que ha estat sintetitzat durant la primera ronda de síntesi. Així doncs, seguint aquest procés s'aconsegueix una amplificació exponencial. Tenint en compte que a cada cicle és necessari separar les cadenes complementàries de DNA augmentant la temperatura, el descobriment d'una DNA polimerasa estable a altes temperatures (Taq polimerasa) provinent d'un bacteri que creix en aigües calentes (*Thermus aquaticus*) va ser un gran avenç. D'aquesta manera no és necessari afegir DNA polimerasa a cada cicle. En un primer temps, després d'uns aproximadament 40 cicles, el producte generat per la PCR era analitzat mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa i tenyit amb bromur d'etidi. Aquest procés permetia obtenir dades sobretot de caràcter qualitatiu de presència, absència o degradació i, en alguns casos, també semi-quantitatives; però no servia com a quantificació absoluta ja que en molts casos s'havia demostrat que no sempre existia una relació directe entre la quantitat de DNA inicial i la intensitat de la banda obtinguda després de la tinció amb bromur d'etidi.

Per tal de mesurar els RNAs, es va desenvolupar un sistema mitjançant el qual l'RNA era primerament retrotranscrit a cDNA, el qual era aleshores amplificat per PCR i analitzat a través d'una electroforesi en un gel d'agarosa. Tot i que aquest fet permetia quantificar els RNAs, la seva fiabilitat és encara menor degut a la introducció d'un pas extra com és la retrotranscripció.

El 1992, aquests problemes van quedar resolts gràcies al desenvolupament de la real-time PCR per *Higuchi i col.* (256). A la real-time PCR, la quantitat de producte format a cada cicle és monitorada mitjançant la quantificació de la fluorescència produïda per fluorocroms presents a la reacció, els quals emeten una quantitat de fluorescència proporcional a la quantitat de producte present a cada moment. D'aquesta manera és possible saber la quantitat de cicles necessaris per tal d'obtenir una certa quantitat de molècules de DNA de cada mostra.

Hi ha diversos sistemes al mercat per tal de realitzar una real-time PCR. En el nostre cas, vam optar per utilitzar la tecnologia *TaqMan*[®] de la casa comercial *Applied Biosystems*. Aquest sistema de senyalització utilitza l'activitat 5'-3' exonucleasa de la Taq DNA polimerasa, la qual, una vegada s'han donat els passos d'hibridació i extensió, degrada la sonda de DNA fluorescent (257). Les sondes *TaqMan*, les quals tenen una seqüència específica en funció del gen que es vol estudiar, estan marcades tant amb una molècula fluorescent indicadora (extrem 5'), com amb un segrestador de la fluorescència (extrem 3'). Mentre la sonda no està hibridada, aquestes dues molècules estan molt properes físicament, i la transferència

d'energia de ressonància (FRET) de la molècula fluorescent cap al segrestador aconseguix suprimir la fluorescència de la molècula indicadora. Generalment, els sistemes TaqMan utilitzen el fluoròfor indicador *fluoresceïna* (FAM) i el segrestador de fluorescència *rhodamina* (TAMRA).

En el moment de la hibridació, la sonda TaqMan està dissenyada per hibridar en l'espai que hi ha entre els dos encebadors. Així doncs, durant el procés de síntesi per part de la Taq polimerasa, la sonda és degradada per l'activitat 5'-3' exonucleasa d'aquesta. Si no hi ha producte, la sonda no es pot unir enlloc i no és degradada, i per tant, la fluorescència segueix segrestada. La degradació de la sonda, en canvi, provoca l'alliberament de la molècula indicadora i, conseqüentment, l'acumulació al medi de fluorescència proporcional a la quantitat de producte format. Aquest sistema de senyalització és molt eficient i específic ja que requereix la hibridació de fins a tres cadenes complementàries a diferents seqüències d'un mateix gen.

Normalment, aquesta tècnica s'utilitza per detectar patògens, anàlisi d'expressió gènica, anàlisi de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNP) i estudi d'aberracions cromosòmiques, entre d'altres. En el nostre cas l'hem emprada per l'estudi de l'expressió gènica durant diferents processos com són la hipertròfia cardíaca i el desenvolupament postnatal.

Materials

- Sistema d'alt rendiment de PCR quantitativa en temps real ABI Prism 7900 HT (*Applied Biosystems*)
- Plaques de 384 pous (*Applied Biosystems*)
- Films per tapar les plaques (*Applied Biosystems*)
- Puntes de pipeta amb filtre (*Corning Incorporated*)

Reactius

- Universal Master Mix (*Applied Biosystems*)
- Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*)
- Primers específics per a cada gen a analitzar; (veure la taula 7) (*Taqman, d'Applied Biosystems*)

GAPDH	Mm99999915_g1
ANF (Atrial Natriuretic Factor)	Mm01255748_m1
ErbB1	Mm00433023_m1
ErbB2	Mm01306795_m1
ErbB3	Mm01159999_m1
ErbB4	Mm01256814_m1

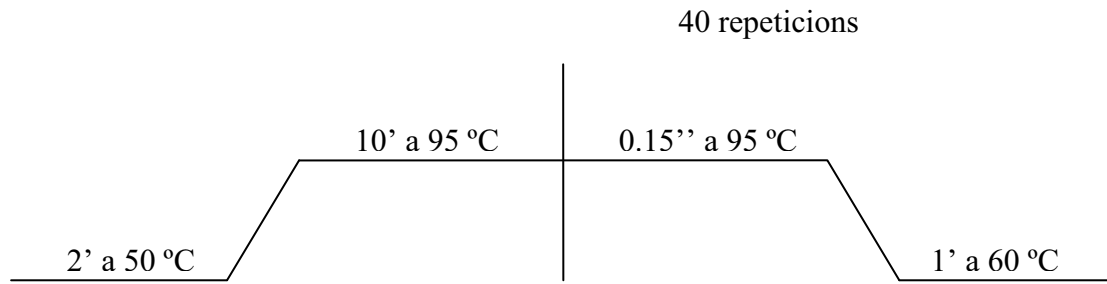
Taula 7: Relació de primers utilitzats en la real-time RT-PCR

Procediment

Per a realitzar la real-time PCR partíem de les mostres que contenien el cDNA obtingut anteriorment (veure apartat 3.10.2.). Primerament, preparàvem la barreja de la Master Mix i els *primers* que volíem utilitzar, de manera que a l'hora de carregar la placa només haguéssim de pipetejar dues vegades a cada pou: una per introduir-hi la barreja de reacció i l'altre per pipetejar-hi la mostra. Una vegada preparada, pipetejàvem primerament la barreja de reacció a cada pou i després hi pipetejàvem la mostra (de 50 a 100 ng), utilitzant una punta de pipeta diferent per a cada pou, evitant així possibles contaminacions. A cada pou hi havia doncs:

	Volum a cada pou (µl)
Master Mix x2	7,5
Primers x20	0,75
H ₂ O miliQ	4,75
Mostra (de 50 a 100 ng)	2

Una vegada carregada la placa, la cobríem amb un film i ens asseguràvem que el film quedava ben enganxat sobre la placa, evitant qualsevol tipus d'entrada o sortida de reactius o transvasament entre pous. En aquell moment, només ens quedava portar la placa als Serveis Científicotècnics i realitzar la PCR a l'aparell *ABI Prism 7900HT*. El programa utilitzat en tots els casos va ser:



Càlculs

Quan es realitza una real-time RT-PCR, es pot fer un anàlisi de quantificació absoluta, és a dir, determinar el número exacte de còpies d'un RNA específic, o bé, determinar els nivells relatius d'aquest RNA, és a dir, comparar-los amb els nivells d'un altre RNA. Per a la quantificació absoluta, és necessària la realització d'una corba patró amb l'RNA del gen d'interès. És qüestió de fer un banc de dilucions d'una quantitat de còpies coneguda del gen d'interès i realitzar la real-time RT-PCR. Posteriorment, es comparen els resultats de les mostres amb la corba patró i s'extreuen els valors del nombre de còpies inicials de cada mostra.

El mètode més utilitzat, però, a l'hora de realitzar un anàlisi del tipus real-time RT-PCR és l'anomenat $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (258). Aquest mètode parteix de la base que es compleixen dues condicions; en primer lloc, dóna per suposat que l'eficiència de la reacció és del 100%, és a dir, que a cada cicle es dobla la quantitat de producte format. Aquest fet s'acostuma a donar si el fragment a amplificar és menor de 120 bases. Per altra banda, requereix que hi hagi un gen que ens serveixi com a control endogen. Aquest control endogen ha de ser un gen que tingui uns nivells d'expressió similars entre totes les mostres de l'experiment, que no variï en funció de les diferents condicions experimentals i que durant la realització de la real-time RT-PCR estigui sotmès a la mateixa cinètica que el gen d'interès. En el nostre cas aquest gen control va ser la GAPDH.

A l'hora de realitzar els càlculs, doncs, vam aplicar l'equació següent (figura 12):

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(CT_{GIT} - CT_{GCT}) - (CT_{GIC} - CT_{GCC})}$$

On:

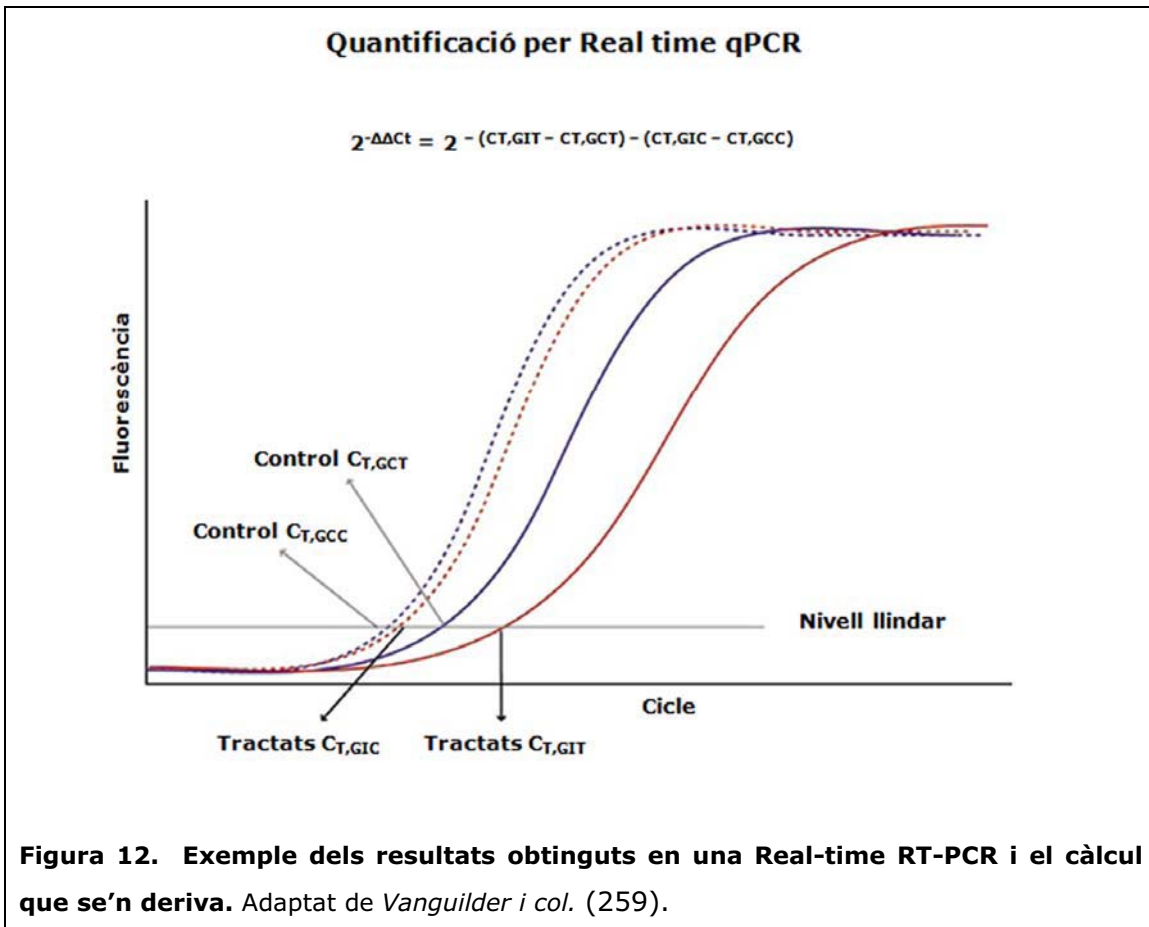
C_T = Cycle threshold, és a dir, el nivell llindar, és el cycle a partir del qual trobem una certa quantitat de mostra

$C_{T,GIT}$ = valor C_t del gen d'interès a la mostra tractada

$C_{T,GCT}$ = valor C_t del gen control a la mostra tractada

$C_{T,GIC}$ = valor C_t del gen d'interès a la mostra control

$C_{T,GCC}$ = valor C_t del gen control a la mostra control



3.11. Anàlisi estadística

Per cadascun 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. A l'hora de determinar si les diferències existents entre grups experimentals eren significatives o simplement eren degudes a la variabilitat biològica o experimental, vam utilitzar el test de la *t* d'Student quan volíem comparar parelles de valors o el test de l'ANOVA (d'un o de dos factors) quan volíem comparar

entre si més de dos grups experimentals. En alguns casos, les dades van haver de ser transformades en el seu logaritme per tal de poder realitzar aquests anàlisis.

En aquells casos en què l'ANOVA revelava diferències significatives entre els grups, empràvem un post-test per identificar-les. En funció de l'homogeneïtat de variàncies entre els grups, s'aplicava els tests de Bonferroni o Tukey (quan les variàncies no eren significativament diferents) o la T2 de Tamhane (mètode no paramètric que empràvem en cas contrari).

En tots els experiments, vam considerar que si el p-valor obtingut en les anàlisis anteriors era inferior a 0,05, la diferència observada entre les mitjanes dels grups que comparàvem era significativa i no deguda a l'atzar o a l'error experimental. A les gràfiques i taules, aquesta significativitat es representava mitjançant un asterisc (*).

L'anàlisi estadística presentat en aquest treball es va realitzar amb el programa Prisma de *GraphPad*.

4. Resultats. Articles

Ignasi Ram3rez i Sunyer i Maria Soley i Farr3s, directors de la tesi d'en Gen3s Campreci3s i Figueras titulada 'Els receptors ErbB en la resposta a l'estimulaci3 adren3rgica cr3nica en el ratol3', certifiquem que el doctorand ha participat, de la forma que s'indica a continuaci3, en els següents articles:

1.- Lorita, J., Campreci3s, G., Soley, M., Ram3rez, I. (2009) ErbB receptors protect the perfused heart against injury induced by epinephrine combined with low-flow ischemia. *Growth Factors* **27**, 1-11. En aquest article el doctorand ha fet tots els experiments que s'inclouen en la figura 1.

Índex d'impacte 2009: 2.5

2.- Campreci3s, G., Navarro, M., Soley, M., Ram3rez, I. (2009) Acute and chronic adrenergic stimulation of submandibular salivary glands. Effects on the endocrine function of epidermal growth factor in mice. *Growth Factors* **27**, 300-308. En aquest article el doctorand ha fet tots els experiments que es mostren. La Dra. Navarro havia fet experiments preliminars, dels que s'inclouen algunes dades.

Índex d'impacte 2009: 2.5

3.- Campreci3s, G., Lorita, J., Pardina, E., Peinado-Onsurbe, J., Soley, M., Ram3rez, I. (2010) Expression, Localization and Regulation of the Neuregulin Receptor ErbB3 in Mouse Heart. *J. Cell. Physiol.* (En premsa). En aquest article el doctorand ha fet tots els experiments que es mostren. El Dr. Lorita va col.laborar en experiments amb mi3cits aillats i les Drs. Pardina i Peinado van col.laborar en els estudis de RT-PCR. L'article va ser escrit pel doctorand i posteriorment revisat pels directors.

Índex d'impacte 2009: 4.6

4.- Campreci3s, G., S3nchez-Vizca3no, E., Soley, M., Ram3rez, I. (2010) Chronic β -adrenergic stimulation increases ErbB receptors and cell proliferation in mouse kidney. En el moment de preparar aquest escrit, l'article est3 en proc3s de revisi3 pels editors de *Amer. J. Physiol. Renal Physiol* (Índex d'impacte 2009: 3.7). En aquest article el doctorand ha fet tots els experiments que s'inclouen. La Sra. S3nchez-Vizca3no ha col.laborat en algunes determinacions. L'article ha estat escrit pel doctorand i posteriorment revisat pels directors.

Barcelona, 6 d'octubre de 2010.

Ignasi Ram3rez

Maria Soley

Article 1

ErbB receptors protect the perfused heart against injury induced by epinephrine combined with low-flow ischemia

Growth Factors, 2009; 27(4): 203–213

Resum

Els receptors ErbB protegeixen el cor perfós contra la lesió provocada per la combinació d'adrenalina i isquèmia de baix flux

Els receptors amb activitat tirosina quinasa ErbB són importants pel manteniment de la integritat estructural del cor i en la inducció d'hipertrofia. Addicionalment, l'activació *in vivo* d'ErbB1 per l'EGF protegeix el cor del dany provocat per l'estrès agut. Nosaltres hem estudiat aquí la possible protecció del sistema ErbB en cors aïllats als quals se'ls ha provocat l'estrès *in vitro* mitjançant la combinació d'isquèmia i la infusió d'adrenalina. En cors de ratolí perfosos, l'EGF va induir la fosforilació en tirosines d'ErbB1, però no d'ErbB2. La Neuregulina-1 β (NRG-1 β) va induir la fosforilació en tirosines tant d'ErbB4 com d'ErbB2. També vam observar diferències en les cascades de senyalització activades per cada factor de creixement. Per tal d'estressar el cor de ratolí, vam combinar l'adrenalina amb la isquèmia de baix flux. Això va resultar en (i) pèrdua de la força de contracció del ventricle esquerra (+dP/dt(max)) i de la pressió desenvolupada (LVDP) després d'un curt període d'hipercontractilitat, (ii) augment del metabolisme anaeròbic (producció de lactat), i (iii) lesió dels miòcits (alliberament de lactat deshidrogenasa (LDH)). L'EGF i la NRG-1 β van provocar efectes diferents en la contractilitat dels cors estressats. L'EGF va reduir a la meitat la pèrdua tant del +dP/dt(max) com del LVDP. Per altra banda, la NRG-1 β va potenciar encara més la hipercontractilitat just després de la reperfusió. Aquest fet és coincident amb un increment transitori del flux coronari després de la reperfusió. Tot i les diferències produïdes en la contracció, tant l'EGF com la NRG-1 β van induir efectes similars en la protecció primerenca tal i com ho indica la reducció en l'alliberament d'LDH. Els nostres resultats mostren que el sistema ErbB protegeix el cor perfós de les lesions provocades per l'estrès agut i reforcen la rellevància dels receptors ErbB i els seus lligands en la fisiologia cardíaca.

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/08977190902913731>

Article 2

Acute and chronic adrenergic stimulation of submandibular salivary glands. Effects on the endocrine function of epidermal growth factor in mice

Growth Factors, 2009; 27(5): 300–308

Resum

Estimulació aguda i crònica de les glàndules salivals submaxil·lars. Efectes sobre la funció endocrina de l'EGF

Les glàndules salivals submaxil·lars són la major font d'EGF en el ratolí. La secreció aguda d'EGF des d'aquestes glàndules protegeix el cor de lesions provocades per les catecolamines. Actualment es té poc coneixement sobre l'estimulació adrenèrgica crònica de les glàndules submaxil·lars i la possible contribució de l'EGF acumulat a la hipertròfia adaptativa del cor derivada d'aquesta estimulació adrenèrgica. Nosaltres mostrem aquí que el contingut d'EGF de les glàndules submaxil·lars no va recuperar els seus valors normals després de 24 h d'una sola injecció de fenilefrina o d'un episodi agressiu de lluita. La repetició (2 vegades al dia durant 2 dies) de l'estimulació adrenèrgica va resultar en una disminució de gairebé el 90% del contingut d'EGF de les glàndules submaxil·lars. En aquestes condicions, una nova estimulació adrenèrgica no va provocar un increment en plasma de la concentració d'EGF, ni l'activació dels receptors de l'EGF (ErbB1) en el fetge. L'administració crònica d'isoproterenol o fenilefrina (7 dies) va induir l'expressió del factor natriurètic atrial en el cor i un increment tant de la massa ventricular com de la proteïna. L'extracció quirúrgica de les glàndules submaxil·lars (sialoadenectomia) no va afectar aquestes respostes adaptatives del cor. Nosaltres concloem que l'EGF de les glàndules submaxil·lars no contribueix a la hipertròfia cardíaca, una de les respostes adaptatives induïdes per l'estimulació adrenèrgica crònica.

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/08977190903137736>

Article 3

Expression, Localization, and Regulation of the Neuregulin Receptor ErbB3 in Mouse Heart

Journal of Cellular Physiology, 2011; 226(2): 450-455

Resum

Expressió, localització, i regulació del receptor de Neuregulina ErbB3 en el cor de ratolí

Les Neuregulines (NRGs) pertanyen a la família de factors de creixement de l'EGF, els quals són lligands dels receptors ErbB. La seva expressió en el cor adult és essencial, especialment quan se sotmet el cor a estímuls cardiotòxics com poden ser els produïts per les antraciclins. Es considera que ErbB4 és l'únic receptor de les NRGs expressat en el cor adult. Quan és activat pel lligand, ErbB4 segurament dimeritza amb ErbB2 per tal d'iniciar la senyalització intracel·lular. No obstant, nosaltres mostrem aquí la presència d'ErbB3 en cors de ratolí des del naixement fins a la vida adulta mitjançant Western blots i real-time RT-PCR. Els nivells d'expressió de l'mRNA d'ErbB3 eren inferiors als observats per ErbB2 i ErbB4, però era més estables durant tot el desenvolupament postnatal. En cardiomiòcits aïllats de ratolí, vam localitzar ErbB3 a les línies Z amb una distribució semblant a la d'ErbB1. La perfusió de cors aïllats amb NRG-1 β va induir la fosforilació d'ErbB3, així com també d'ErbB2 i ErbB4. En ratolins adults, la inducció d'hipertrofia cardíaca va provocar la ràpida disminució dels nivells tant d'ErbB2 com ErbB3, però no d'ErbB1 ni ErbB4. En conclusió, els nostres resultats demostren que ErbB3, a més a més d'ErbB4, és un receptor per la NRG-1 β en el cor adult de ratolí.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.22354/abstract;jsessionid=A5EEEA514D4CD131003BBD7A25709C0F.d03t04>

Article 4

Chronic β -adrenergic stimulation increases ErbB receptors and cellular proliferation in mouse kidney

Growth Factors, 2009; 29(2-3): 94-101

Resum

L'estimulació β -adrenèrgica crònica provoca un increment dels receptors ErbB i la proliferació cel·lular en el ronyó de ratolí

Tot i que el sistema nerviós simpàtic està involucrat en les lesions provocades en el ronyó causades per diversos agents estressants, com ara la hipertensió o la isquèmia/reperfusió, sabem poca cosa sobre els efectes de l'estimulació adrenèrgica crònica en el ronyó. En cas de lesió, però, el ronyó té una gran capacitat per promoure la regeneració cel·lular en els túbuls i la recuperació funcional. El receptor ErbB1 i els seus lligands juguen un paper essencial en aquest procés. Nosaltres hem estudiat els efectes de l'administració crònica d'isoproterenol (un agonista β -adrenèrgic) en el ronyó de ratolí. L'isoproterenol va induir una pèrdua moderada i reversible de la massa renal i del contingut de proteïna no associada a disfunció renal. Vam observar un augment de la proliferació de cèl·lules tubulars (marcatge amb bromo-deoxyuridina) tant en la zona perifèrica com interior del còrtex dels animals tractats amb isoproterenol. Els receptors ErbB1 (el receptor de l'EGF), així com també ErbB2 i ErbB3 (el receptor de la neuregulina) estaven sobreexpressats en els ronyons dels ratolins tractats amb isoproterenol a nivell de proteïna, però no d'mRNA. Tots els receptors es van localitzar en les mateixes zones de la nefrona i els mateixos tipus cel·lulars. Els estudis d'immunoprecipitació després de l'estimulació amb EGF i NRG-1 β van mostrar una interacció dinàmica entre els tres receptors. En conseqüència, nosaltres concloem que els receptors ErbB potser cooperen en la resposta a l'estimulació β -adrenèrgica crònica.

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08977194.2011.578576>

Annex Article 4

ErbB4 en el ronyó: localització, desenvolupament i resposta a l'estimulació crònica dels receptors β -adrenèrgics

ErbB4 en el ronyó: localització, desenvolupament i resposta a l'estimulació crònica dels receptors β -adrenèrgics

Alguns estudis mostren la presència d'ErbB4 en el ronyó (1-3). En el transcurs de l'estudi dels receptors ErbB en el ronyó de ratolí en resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica, no només vam estudiar els receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB3, sinó que també vam abordar l'estudi del receptor ErbB4. La raó per la qual no vam afegir aquests resultats a l'article 4 va ser perquè malauradament, els anticossos contra ErbB4 dels que disposàvem no van funcionar prou bé en totes les tècniques emprades i no ens van permetre obtenir uns resultats tant consistents com els obtinguts pels altres tres receptors.

Sense dubte, els anticossos contra ErbB4 funcionaven molt bé en immunohistoquímica. Així, vam poder observar que es trobava àmpliament distribuït per tota la nefrona; concretament vam observar marca en els túbuls proximal i distal, en la nansa de Henle i en els tubs col·lectors (Figura 1). A diferència dels altres tres receptors, però, no vam observar ErbB4 ni al glomèrul ni a les cèl·lules de la línia parietal de la càpsula de Bowman. De tota manera, podem dir que el receptor ErbB4 co-localitza amb els altres receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB3 en la majoria de zones de la nefrona.

A l'hora d'estudiar la interacció del receptor ErbB4 amb els altres receptors, però, vam xocar frontalment amb la ineficàcia dels anticossos contra ErbB4. Vam observar que l'anticòs contra el receptor ErbB4 no servia per a realitzar experiments d'immunoprecipitació amb seguretat, ja que tal i com es pot observar a la figura 2, aconseguíem co-immunoprecipitar més quantitat d'ErbB4 amb qualsevol dels altres anticossos contra ErbB1, ErbB2 o ErbB3, que no pas amb els anticossos específics contra ErbB4. Tot i no poder tenir les dades completes, però, en aquest experiment sí que vam poder corroborar que tant ErbB1, com ErbB2 i ErbB3 heterodimeritzen amb el receptor ErbB4 en el ronyó.

De tots els anticossos utilitzats, el d'ErbB4 va ser el que donava resultats menys nítids en la tècnica de Western blot. En el decurs d'estudis de desenvolupament dels diferents receptors ErbB en el cor (veure article 3), també vam analitzar mostres de ronyó (Figura 3). Aquí es pot veure la menor nitidesa del senyal obtingut amb l'anticòs contra ErbB4. Tot i això, podem dir que observem dos patrons diferents d'expressió; mentre els receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB4 presenten una alta expressió a dia 1 i una subseqüent disminució dels seus nivells a mida que l'animal es fa gran,

el receptor ErbB3 presenta un increment de l'expressió als 5 i 10 dies de vida, i una posterior disminució als 30 i 90 dies, recuperant els mateixos nivells que tenia a dia 1. L'alta expressió dels receptors durant el període de creixement del ronyó és conseqüent amb la seva capacitat d'induir proliferació cel·lular, contribuint així en el desenvolupament postnatal del ronyó. El fet que trobem dos patrons diferents d'expressió, però, sembla posar de manifest que no tots els receptors de la família ErbB deuen estar contribuint de la mateixa manera al desenvolupament renal. Hipotetitzar quines podrien ser les funcions dels diferents receptors, però, seria aventurar-se massa, ja que malauradament, no s'han realitzat gaires estudis sobre la funció dels receptors ErbB en el desenvolupament del ronyó.

Els resultats dels estudis de l'estimulació β -adrenèrgica crònica indiquen que el receptor ErbB4 en el ronyó respon d'una manera semblant a la dels altres tres receptors. Per començar, vam observar que els nivells d'ErbB4 es trobaven augmentats en els ronyons dels ratolins sotmesos al tractament crònic amb isoproterenol durant 7 dies, però no en els tractats amb fenilefrina ni en els animals control (Figura 4). Aquests nivells augmentats de proteïna, però, no es correlacionaven amb els nivells d'mRNA d'ErbB4 que vam observar durant el tractament crònic amb isoproterenol (Figura 5). De fet, els nivells d'mRNA es mantenien constants durant els 7 dies que durava el tractament.

Una vegada finalitzat el tractament, el receptor ErbB4 va recuperar els nivells basals als dos dies (Figura 6), tal i com passava també amb els receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB3.

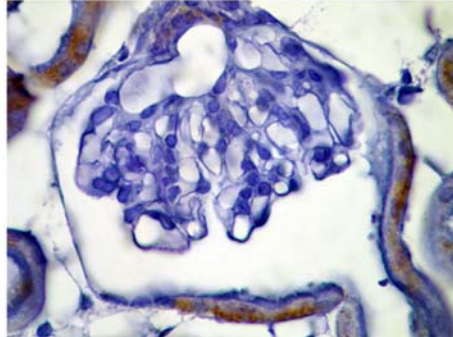
Els resultats obtinguts per ErbB4 en el ronyó de ratolí sotmès a estimulació β -adrenèrgica crònica els hem de situar en el context del quart article. És aquí on les dades sobre ErbB4, conjuntament amb aquelles sobre ErbB1, ErbB2, ErbB3 i l'augment de proliferació cel·lular, ens ajuden a entendre el paper que pot estar jugant el sistema ErbB en el ronyó durant l'estimulació β -adrenèrgica crònica en el ratolí. Nosaltres creiem que la inducció del sistema de receptors ErbB, entre ells, probablement també ErbB4, és deguda a la necessitat del ronyó d'augmentar la proliferació cel·lular en aquelles zones lleugerament danyades per l'estimulació β -adrenèrgica crònica per tal de mantenir la funcionalitat d'aquest.

Referències

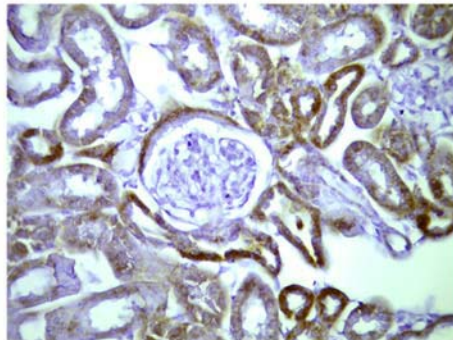
- 1. Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, Klagsbrun M.** A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26761-8.
- 2. Thomasson M, Hedman H, Junntila TT, Elenius K, Ljungberg B, Henriksson R.** ErbB4 is downregulated in renal cell carcinoma--a quantitative RT-PCR and immunohistochemical analysis of the epidermal growth factor receptor family. *Acta Oncol.* 2004;43(5):453-9.
- 3. Zeng F, Zhang MZ, Singh AB, Zent R, Harris RC.** ErbB4 isoforms selectively regulate growth factor induced Madin-Darby canine kidney cell tubulogenesis. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4446-56. Epub 2007 Aug 29. PubMed PMID: 17761534;

Figura 1

Glomèrul



Còrtex



Medul·la

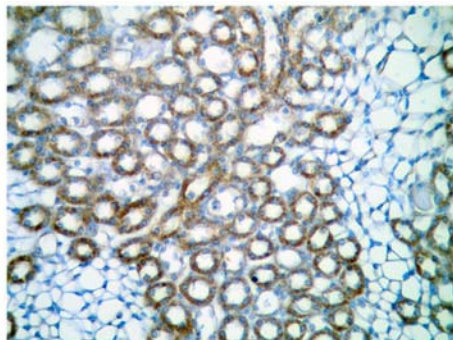


Figura 1. Distribució del receptor ErbB4 en el ronyó de ratolí. La detecció d'ErbB4 es va realitzar mitjançant immunohistoquímica en talls de ronyó de ratolí.

Figura 2

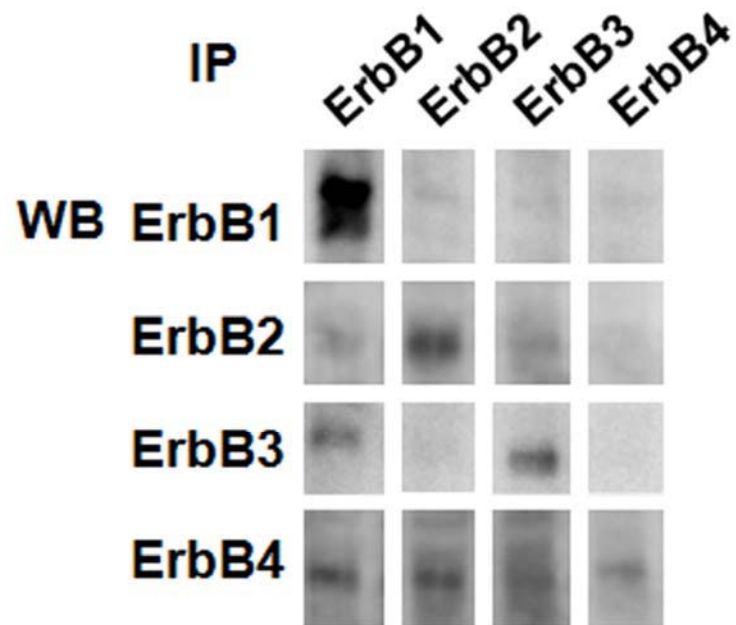


Figura 2. Immunoprecipitació dels receptors ErbB. El ronyó d'un ratolí va ser processat per a fer immunoprecipitacions amb els anticossos contra els receptors ErbB. Posteriorment es va realitzar un Western blot contra els diferents receptors ErbB.

Figura 3

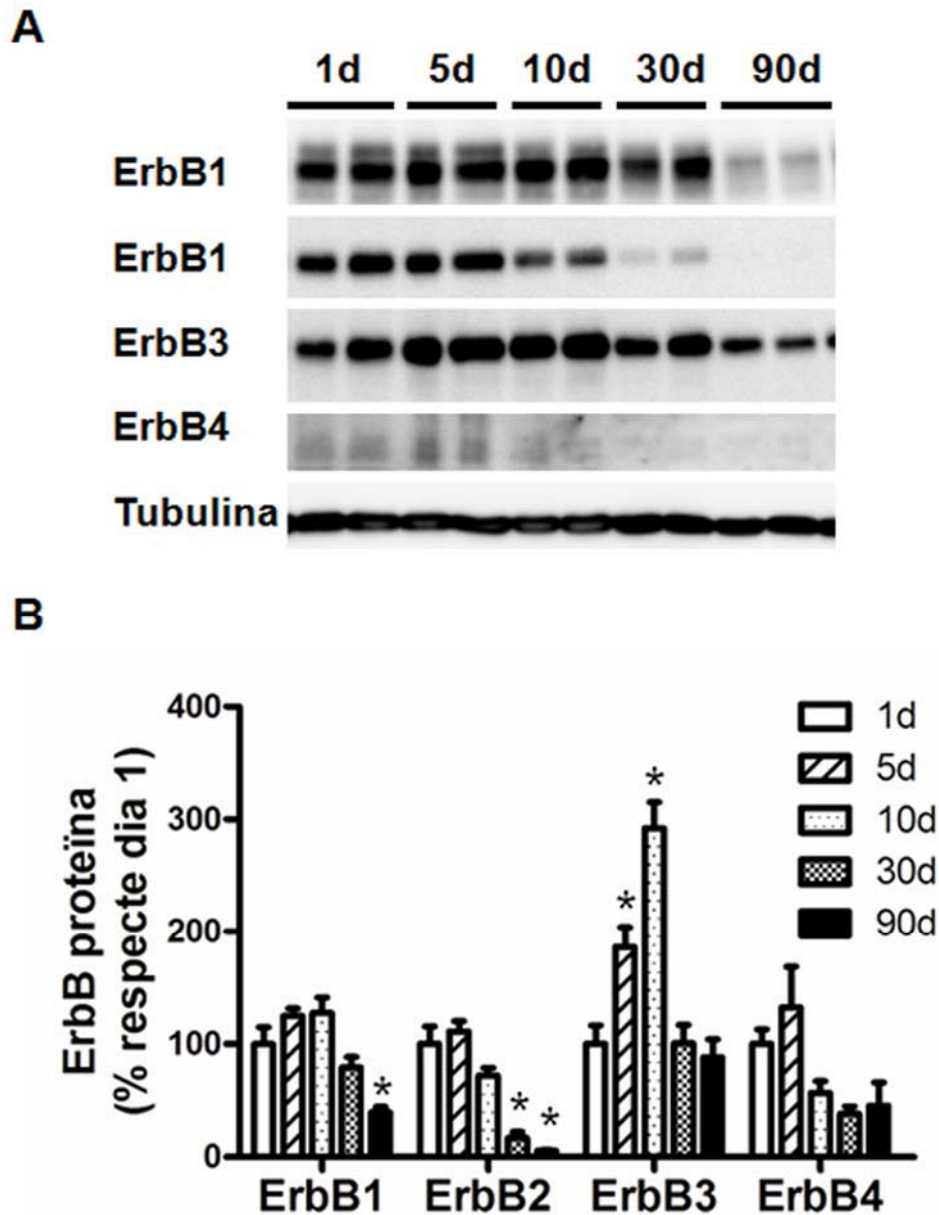


Figura 3. Receptors ErbB en el ronyó de ratolí durant el desenvolupament postnatal.

Els ronyons van ser agafats dels ratolins quan aquests tenien 1, 5, 10, 30 i 90 dies de vida tal i com s'indica a la llegenda. Els nivells de proteïna dels receptors ErbB es van analitzar mitjançant Western Blot (A) i la seva posterior quantificació (B). Les dades s'expressen amb la mitja \pm EEM de 4 animals per grup. * $p < 0.05$ vs els ratolins d'1 dia.

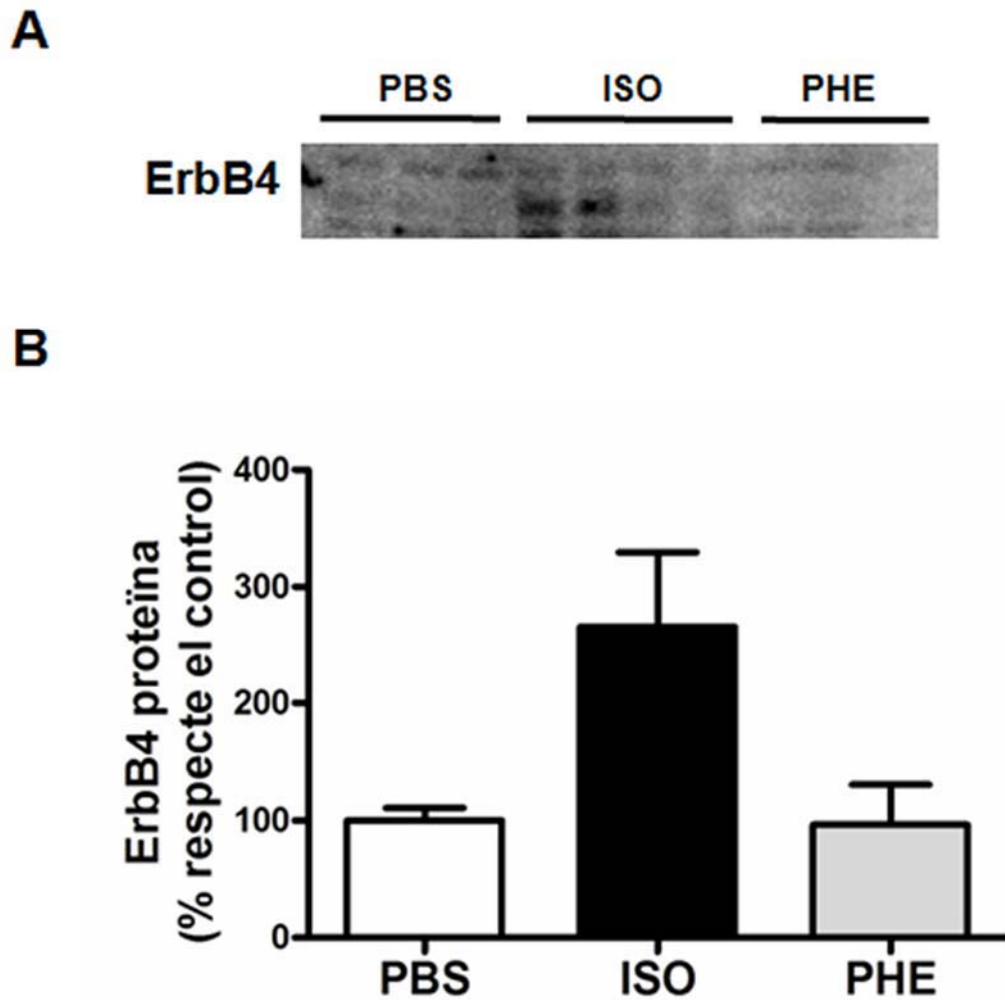
Figura 4

Figura 4. Efecte de l'estimulació β -adrenèrgica crònica en l'expressió del receptor ErbB4 en el ronyó de ratolí. Els ratolins eren injectats dues vegades al dia durant 7 dies amb isoproterenol (ISO) o fenilefrina (PHE) 30 μ mol/kg s.c. Els animals control eren injectats amb PBS. L'expressió del receptor ErbB4 va ser analitzada per Western Blot (A) i les imatges quantificades amb el programa Multi Gauge (B). Les dades s'expressen amb la mitja \pm EEM de 4 animals per grup.

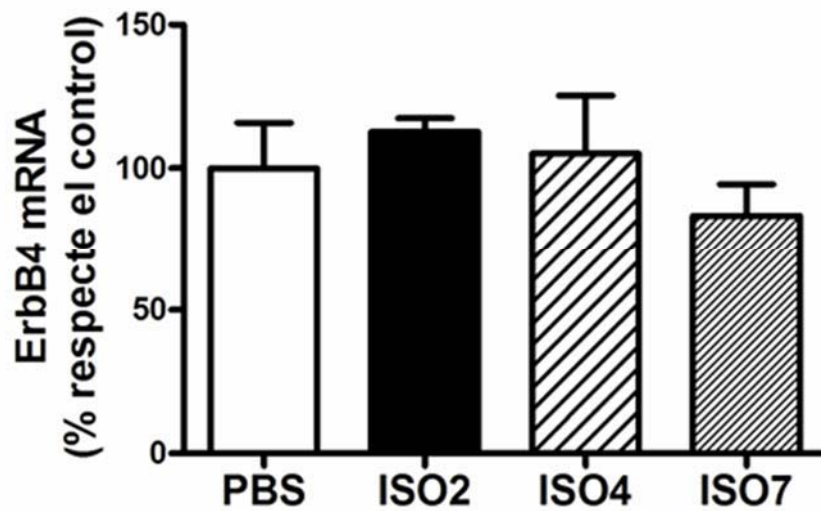
Figura 5

Figura 5. Efecte de l'estimulació β -adrenèrgica crònica en l'expressió de l'mRNA del receptor ErbB4 en el ronyó de ratolí. Els ratolins eren injectats dues vegades al dia durant 2 (ISO2), 4 (ISO4) i 7 (ISO7) dies amb isoproterenol (30 μ mol/kg s.c.). Els animals control eren injectats amb PBS. Els nivells d'mRNA d'ErbB4 van ser analitzats mitjançant real-time RT-PCR. Les dades s'expressen amb la mitja \pm EEM de 4 animals per grup. El gen de la GAPDH va ser utilitzat com a control.

Figura 6

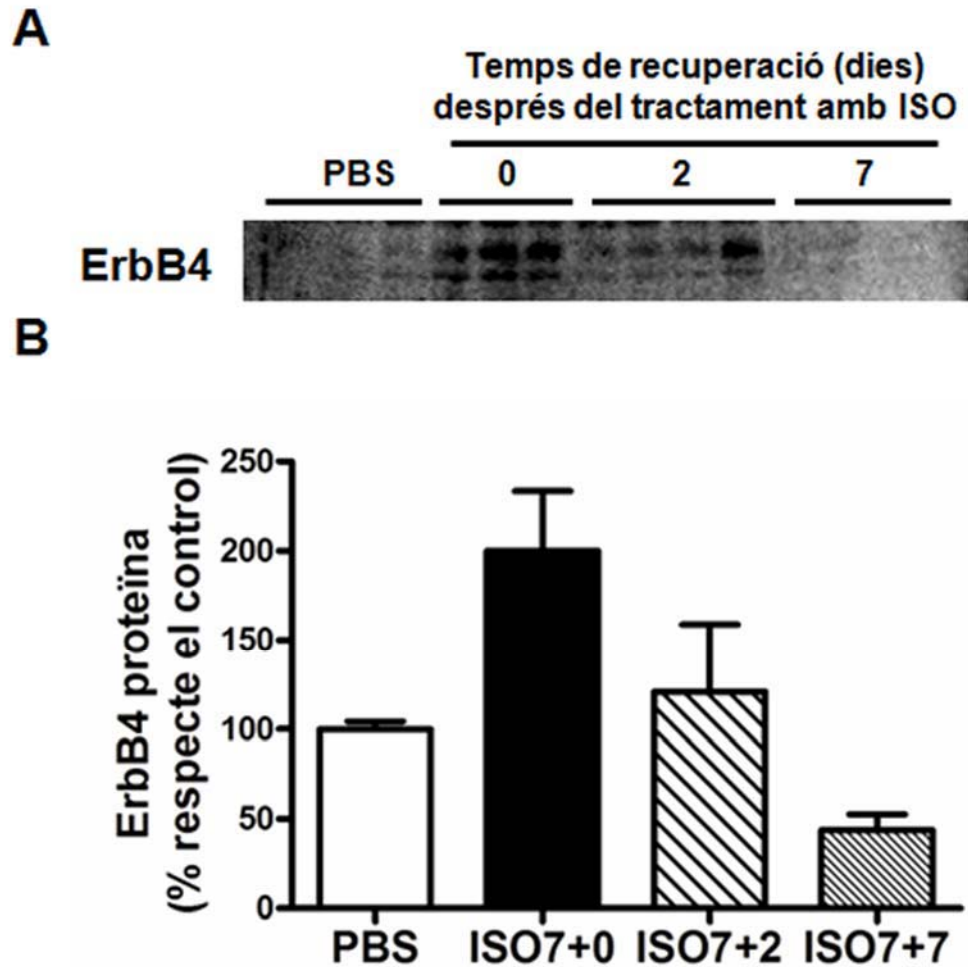


Figura 6. Recuperació d'ErbB4 en ronyó de ratolí després de l'estimulació β -adrenèrgica crònica. Els ratolins eren injectats dues vegades al dia durant 7 dies amb isoproterenol ($30 \mu\text{mol/kg}$ s.c.) i sacrificats al cap de 0 (ISO7+0), 2 (ISO7+2) i 7 (ISO7+7) dies després de l'última injecció. Els animals control eren injectats amb PBS. L'expressió d'ErbB4 va ser analitzada mitjançant Western blot (A) i les imatges quantificades amb el programa Multi Gauge (B). Les dades s'expressen amb la mitja \pm EEM de 4 animals per grup.

5. Discussió general

5.1. L'EGF de les glàndules submaxil·lars en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica

El sistema nerviós simpàtic controla processos de vital importància, especialment en situacions en les quals l'organisme necessita treure el màxim rendiment d'ell mateix, com són les situacions de fugida o lluita, per exemple. A vegades, però, aquesta descàrrega de catecolamines derivada de l'activació del sistema simpàtic, tot i necessària, pot arribar a provocar lesions en determinats òrgans, com ara el cor (19;112). En el nostre grup, fa temps que es va observar com l'EGF tenia la capacitat de disminuir la resposta de diversos teixits a l'estimulació adrenèrgica interferint directament en la seva via de senyalització. En el teixit adipós, la presència d'EGF durant l'estimulació adrenèrgica disminueix la lipòlisi mitjançant l'activació d'una proteïna G_i (133;134), mentre que en el fetge, l'EGF disminueix la glicogenòlisi mitjançant l'activació d'una fosfodiesterasa (135). En el cor, l'EGF també disminueix els nivells de cAMP durant l'estimulació adrenèrgica (29).

En el cor, aquesta interferència de l'EGF sobre l'acció de les catecolamines sembla tenir un paper protector. En experiments realitzats tant en cors perfosos com en l'animal sencer, s'ha observat que la presència d'EGF durant l'estimulació adrenèrgica disminueix les lesions provocades per les catecolamines tant a nivell estructural (189), com funcional (190). Per altra banda, se sap que l'EGF de les glàndules submaxil·lars és alliberat al plasma davant un estímul α -adrenèrgic. De fet, en un estudi *in vivo* portat a terme al nostre laboratori, van demostrar que l'EGF procedent de les glàndules submaxil·lars era necessari per tal de protegir el cor de les lesions cardíques provocades per la lluita entre mascles (189). En aquest estudi, la inhibició d'ErbB1 remetia els efectes beneficiosos de l'EGF. En aquest context, els resultats obtinguts en l'article 2 confirmen aquestes dades, ja que veiem com 1 h després d'injectar fenilefrina, la concentració d'EGF en plasma es troba augmentada 10 vegades (Article 2, Figura 1), fet que el fa accessible a qualsevol òrgan. Com a exemple, els receptors ErbB1 a fetge, el teixit amb més receptors ErbB1, es troben clarament activats 1 h després de la injecció de fenilefrina (Article 2, Figura 5). Així doncs, estem davant d'un sistema coordinat d'autoprotecció en el qual, les catecolamines provoquen l'alliberament de l'EGF de les glàndules submaxil·lars, el qual activa els receptors ErbB1 en el cor, entre altres, i aquests, finalment, interfereixen en la senyalització de les pròpies catecolamines. D'aquesta manera, el propi sistema adrenèrgic és el responsable de l'activació dels sistemes necessaris per tal de protegir el cor dels seus efectes nocius durant una estimulació aguda.

Durant l'estimulació adrenèrgica crònica, però, aquest sistema d'autoprotecció no sembla estar actuant. 24 h després d'una sola injecció de fenilefrina, el contingut d'EGF de les glàndules submaxil·lars encara és molt inferior al basal, i després de dos dies de tractament amb fenilefrina, aquest contingut és només del 10% (Article 2, Figures 1 i 4). Conseqüentment, una nova estimulació adrenèrgica després de dos dies de tractament amb fenilefrina no produeix cap increment en la concentració d'EGF en plasma, ni l'activació dels receptors ErbB1 en el fetge (Article 2, Figures 4 i 5). La prolongació del tractament en el temps, tampoc indueix una major síntesi d'EGF en les glàndules, en les quals sempre hi trobem una quantitat molt baixa d'EGF, que s'allibera ràpidament en rebre un nou estímul adrenèrgic (Article 2, Figures 4 i 5). D'alguna manera, la freqüència de repetició d'estímuls adrenèrgics en el nostre model no permet la recuperació del contingut d'EGF de les glàndules submaxil·lars, és a dir, que la velocitat d'alliberament d'EGF supera la seva velocitat de síntesi. De fet, en models més fisiològics també s'ha pogut constatar aquest fet, ja que després d'un episodi de lluita entre ratolins mascles, el contingut d'EGF de les seves glàndules submaxil·lars també es veu reduït a la meitat, i a les 24 h de l'episodi segueix sent aproximadament d'un 50% (Article 2, Figura 2).

En aquest sentit, és important destacar que en estudis més fisiològics d'estrès crònic en ratolins, com són la immobilització o la lluita, els animals acaben desenvolupant un fenomen d'habitució (112). Aquest fet implica que davant del mateix estímul estressant, l'animal allibera una menor quantitat de catecolamines, i per tant, disminueix la toxicitat de la resposta adrenèrgica (260). Així doncs, tot sembla indicar que l'EGF procedent de les glàndules submaxil·lars té una clara funció protectora en episodis d'estrès agut, però no en situacions d'estrès crònic, en les quals l'habitució sembla complir aquesta funció protectora.

En el cor, l'estimulació adrenèrgica crònica indueix hipertròfia. En aquest procés, ErbB1 hi juga un paper important, com ho demostra el fet que la seva inhibició evita el desenvolupament d'aquesta hipertròfia (204). Paral·lelament, se sap que el processament d'altres factors de creixement de la família de l'EGF en el cor, com per exemple l'HB-EGF, és un pas clau en el desenvolupament d'aquest procés (197), molt possiblement actuant a través d'ErbB1. Contràriament al que havíem hipotetitzat inicialment, els nostres resultats ens porten a concloure que l'EGF de les glàndules submaxil·lars no participa com a lligand en el procés d'hipertròfia cardíaca induïda per les catecolamines. En primer lloc, perquè la concentració d'EGF en plasma no varia respecte els valors basals en el tractament crònic amb isoproterenol (Article 2, Figures 4 i 6). Addicionalment, els paràmetres que caracteritzen la

hipertròfia cardíaca no es veuen alterats en animals sialoadenectomitzats (Article 2, Figura 8), ni tampoc els nivells de receptors del sistema ErbB (Article 2, Figura 7). Per tant, la participació de l'EGF de les glàndules submaxil·lars no sembla que pugui prendre part en aquest procés, ja que, a diferència dels episodis amb estimulació adrenèrgica aguda, en situacions d'estrès crònic, la seva disponibilitat en el cor és molt limitada.

5.2. ErbB3 en el cor de ratolí adult

La senyalització a través dels receptors ErbB en el cor és essencial durant el desenvolupament, ja que tant la manca d'ErbB2 com d'ErbB4 provoca greus defectes en la formació de les trabècules cardíques (90;96), mentre que la falta d'ErbB3 provoca defectes greus en la formació dels cúmuls endocàrdics (95). Els animals *Knock-Out* per la NRG-1 β presenten la suma de tots aquests defectes (153), fet que indica la importància de la senyalització de la NRG-1 β a través de tots aquests receptors durant el desenvolupament.

En el cor adult, les NRGs també estan implicades en un gran nombre de processos, com ara proliferació i creixement cel·lular, estructuració i organització dels miofilaments, supervivència, captació de glucosa i angiogènesi, entre altres (165;169;181;261). Des de fa ja uns anys, tots aquests efectes produïts per les NRGs s'han atribuït únicament a la senyalització a través d'ErbB4, ja que, a diferència del cor embrionari, en el cor adult només s'ha descrit la presència dels receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB4 (163;165;262). Al començament dels treballs que han conformat aquesta tesi, vam caracteritzar els receptors ErbB en el cor de ratolí adult i com s'activaven (fosforilaven) en ser estimulats amb EGF o NRG-1 β (Article 1, Figura 1). Com en el transcurs d'uns experiments preliminars nosaltres vam detectar també la presència d'ErbB3 tant en el cor sencer com en miòcits aïllats de ratolí adult (Article 3, Figura 1), vam decidir caracteritzar la seva presència en el cor.

Els estudis de l'expressió dels receptors ErbB en el cor durant el desenvolupament postnatal del ratolí, en cap cas suggereixen la desaparició d'ErbB3 en l'animal adult, sinó tot el contrari, ja que l'expressió d'ErbB3 als 90 dies de vida és superior a l'observada en nounats d'1 sol dia, tot i que en general, es manté força estable durant tot el desenvolupament postnatal (Article 3, Figura 2). En aquest sentit, el patró d'expressió d'ErbB3 durant els primers 90 dies de vida difereix sensiblement de l'observat en els receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB3, els quals

presenten alts nivells d'expressió en el moment de néixer, però van disminuint progressivament fins assolir els nivells més baixos durant l'estadi adult. Aquest fet ja havia estat descrit prèviament pels receptors ErbB2 i ErbB4 (263), i, de fet, és un patró d'expressió esperable per a receptors de factors de creixement com els ErbB, altament implicats en processos de proliferació. Aquest comportament diferencial entre les expressions d'ErbB3 i la resta de receptors ErbB durant el desenvolupament postnatal, podria ser degut al fet que estiguin participant en diferents processos. De fet, en el desenvolupament embrionari ja observem un fenomen semblant, ja que, tal i com hem comentat, mentre ErbB2 i ErbB4 estan involucrats en la formació de les trabècules, ErbB3 participa en la formació dels cúmuls endocàrdics. La millor qualitat dels anticossos i la major sensibilitat dels mètodes de real-time RT-PCR actuals poden molt bé ser la causa que diferenciï els nostres estudis d'aquells realitzats anteriorment i en justifiqui les diferències.

Un dels requeriments pels receptors ErbB a l'hora de senyalitzar és la de formar homo- o heterodimers. En el cas d'ErbB3, el fet que el seu domini tirosina-quinasa no sigui funcional deixa, doncs, l'heterodimerització com l'única via possible de senyalització a través d'aquest receptor. ErbB2 i ErbB4 es troben a nivell dels túbuls T a les línies Z dels miòcits, amb especial presència d'ErbB2 també en els discs intercalars (99;264). En l'article 3, mostrem com tant ErbB1 com ErbB3 també localitzen a les mateixes zones que ErbB2 i ErbB4 (Article 3, Figura 3), tot i que amb un patró de distribució lleugerament diferent. Mentre el receptor ErbB4 es troba distribuït homogèniament al llarg de tot el túbul T, des de la zona més superficial fins a la zona més interior del miòcit, en els casos d'ErbB1 i ErbB3, nosaltres només hem observat la seva presència a les zones més superficials d'aquests túbuls T, amb poca o nul·la presència dels receptors en les zones més interiors. En tot cas, el fet que els quatre receptors co-localitzin en algunes de les zones del miòcit és suficient per pensar que l'heterodimerització entre ells és físicament possible. En aquest sentit, la infusió dels cors amb NRG-1 β indueix la fosforilació dels receptors ErbB2, ErbB3 i ErbB4 (Article 3, Figura 4), fet que demostra que el receptor ErbB3 a cor no només hi és present, sinó que a més a més també és funcional. En tot cas, la diferent distribució al llarg dels túbuls T dels receptors ErbB3 i ErbB4, els dos receptors per la NRG-1 β , torna a suggerir rols complementaris per aquests dos receptors en el cor adult.

Tot i que tant ErbB3 com ErbB4 són receptors per la NRG-1 β , la senyalització a través de cadascun d'ells difereix lleugerament. Tal i com es pot veure a la figura 5, els dominis citoplasmàtics de tots dos receptors tenen afinitats diferents per algunes

de les principals molècules senyalitzadores, com ara Grb2, Shc o p85, la subunitat reguladora de la PI3K. Així doncs, en el cor, en funció de quin receptor activin les NRGs o la proporció d'aquests receptors en una zona i un moment concrets, determinaran la resposta final dels miòcits. En aquest sentit, hem observat com després de 7 i 14 dies d'estimulació crònica amb isoproterenol, trobem els nivells dels receptors ErbB2 i ErbB3 disminuïts respecte els animals control, però no així els nivells d'ErbB4 (Article 3, Figura 5). Aquest fet, a part d'indicar una regulació independent per cadascun dels receptors, també posa de manifest una alteració en la relació entre els receptors ErbB3 i ErbB4, i per tant, possiblement una alteració de la senyalització en el cor a través de la NRG-1 β .

Actualment, tots els efectes demostrats per la NRG-1 β en el cor han estat atribuïts a la senyalització a través d'ErbB4 i ErbB2. No obstant, un estudi recent sobre la funció cardioprotectora de la NRG-1 β en cors sotmesos a cardiotoxicitat amb doxorubicina, han demostrat que la inhibició del receptor ErbB4 no evita la protecció promoguda per la NRG-1 β , però en canvi, sí la inhibició d'ErbB2 (171). Aquest treball sembla indicar, doncs, que la NRG-1 β necessita algun altre receptor a part d'ErbB4 per tal de portar a terme la seva funció. Aquest receptor hauria de ser ErbB3. Tenint en compte que la presència d'ErbB3 en el cor ha estat obviada durant molt temps, fins ara ningú ha dedicat esforços a estudiar quines conseqüències pot tenir la senyalització a través d'ell. En tot cas, però, creiem que serà important incorporar ErbB3, conjuntament amb ErbB2 i ErbB4, en els propers estudis que es realitzin amb NRG-1 β en el cor adult.

5.3. Els receptors ErbB en la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica en el ronyó

Tal i com passa en el cor, el sistema adrenèrgic exerceix un gran control sobre el ronyó, concretament sobre la seva funció excretora i de control del volum i la pressió arterial. El desajust en aquesta senyalització, però, és sovint l'origen d'algunes patologies renals. Les catecolamines, per exemple, participen en el dany causat en el model d'isquèmia/reperfusió del ronyó (47). Paral·lelament, s'ha observat com una sola injecció d'isoproterenol augmenta l'oxidació lipídica, així com també l'aparició d'enzims antioxidants, com ara la superòxid dismutasa o la metalotioneïna (265;266), en el ronyó. En molts casos, les lesions renals no són conseqüència d'un efecte agut, sinó més aviat crònic. Així, se sap que una elevada i sostinguda estimulació adrenèrgica en el ronyó acaba desenvolupant hipertensió,

fibrosi intersticial i glomerulosclerosi, entre altres (37;45). En cas de lesió amb mort cel·lular, el ronyó posseeix una gran capacitat de regeneració mitjançant la proliferació de les cèl·lules supervivents, les quals es divideixen i ocupen l'espai deixat per les cèl·lules mortes (267).

En aquest context, en el nostre model d'estimulació adrenèrgica crònica nosaltres no hem observat cap tipus de lesió renal mitjançant diferents tincions histològiques, ni tampoc alteracions en els paràmetres que característicament defineixen la funció renal (Article 4, Figura 1 i Taules 2 i 3). El que sí que hem observat, però, és una disminució de la massa renal i el contingut de proteïna dels ronyons d'aquells animals tractats crònicament amb isoproterenol (Article 4, taula 1), juntament amb un augment de la proliferació en aquests ronyons (Article 4, Figura 2), i una recuperació posterior tant de la massa com del contingut de proteïna dos dies després d'acabar el tractament. Aquestes observacions resembren bastant el que podria ser un model de mort cel·lular seguit de regeneració. En aquest sentit, el patró de distribució en petites àrees de proliferació, especialment localitzades en les zones més profundes del còrtex renal, reforça aquesta teoria, ja que podria molt bé ser el reflex de la recuperació de zones anteriorment danyades durant el tractament crònic amb isoproterenol.

Tot i no haver observat directament una lesió renal, sabem que la prolongació en el temps de l'estimulació β -adrenèrgica acaba induint l'aparició d'hipertensió i proteïnúria (44). Així doncs, nosaltres creiem que en el nostre model, la proliferació observada està emascarant momentàniament el possible dany produït pel tractament crònic amb isoproterenol.

Durant la regeneració, les cèl·lules supervivents han de desdiferenciar-se, proliferar, migrar a les zones danyades i diferenciar-se altra vegada en cèl·lules endotelials. En aquest procés hi juga un paper clau el receptor ErbB1 (268). De fet, en situacions d'insuficiència renal aguda provocada per isquèmia/reperfusió o per diversos agents nefrotòxics, s'ha observat com tant ErbB1 com alguns dels seus lligands (TGF- α i HB-EGF) se sobreexpressen ràpidament (233;234) i són imprescindibles per tal que tingui lloc la regeneració en les zones afectades (232). En aquesta direcció és, doncs, com entenem els resultats obtinguts amb els receptors ErbB, on veiem que tant ErbB1, el receptor ErbB més estudiat al ronyó, com els seus familiars ErbB2, ErbB3 i ErbB4, presenten nivells de proteïna més elevats en els ronyons dels animals tractats crònicament amb isoproterenol que no pas en els animals control (Article 4, Figura 3; Annex, Figura 4). Aquesta sobreexpressió, però,

no té lloc tant ràpidament com en la resposta al dany agut (233), sinó que presenta un patró més progressiu, amb nivells lleugerament elevats dels receptors ja als dos dies, però assolint el màxim als set dies de tractament (Article 4, Figura 4). Un cop acabat el tractament, els receptors recuperen els nivells basals (Article 4, Figura 5; Annex, Figura 6) aproximadament als dos dies, tal i com s'observa també en models de lesió renal aguda (233).

A diferència del que succeeix en el dany agut, però, en aquest cas l'augment de proteïna d'aquests receptors no va acompanyat d'un augment en els nivells dels seus mRNAs (Article 4, Figura 4; Annex, Figura 5). Aquest fet apunta a una regulació post-transcripcional de l'expressió dels receptors ErbB com a possible causa de l'acumulació de proteïna durant el tractament adrenèrgic. El que no sabem és si es tracta d'un augment de la traducció dels mRNAs ja existents o d'una disminució en la velocitat de recanvi dels receptors, amb la conseqüent acumulació d'aquests. En tot cas, tots aquests resultats posen de manifest les diferències entre la resposta del ronyó en el nostre model d'estimulació crònica amb isoproterenol, de la resposta observada en models de lesió aguda. Aquestes diferències són, segurament, conseqüència de l'origen més progressiu de les lesions provocades per l'isoproterenol.

Arribats a aquest punt, és important ressaltar que la pèrdua de massa renal coincideix amb l'augment de proliferació cel·lular, així com també amb l'acumulació de tots els receptors ErbB en el ronyó, i que, per la seva banda, la posterior recuperació de la massa renal també coincideix amb la recuperació dels nivells basals d'expressió dels diferents receptors. Conjuntament, doncs, aquests resultats semblen posar de manifest la importància que poden estar tenint els receptors ErbB durant els processos de proliferació derivats del tractament crònic amb isoproterenol.

El fet que els quatre receptors ErbB es comportin d'una manera similar durant l'estimulació crònica amb isoproterenol, suggereix la possibilitat que estiguin col·laborant conjuntament en la resposta del ronyó, especialment en el procés de proliferació cel·lular. Per poder col·laborar, però, els diferents receptors han d'estar físicament a prop, ja que sinó, les interaccions entre ells no són possibles. A favor d'aquesta teoria tenim el fet que els quatre receptors s'expressen majoritàriament en les mateixes zones de la nefrona (Article 4, Figura 6; Annex, Figura 1). Addicionalment, en els experiments d'immunoprecipitació hem observat també com aquests receptors interaccionen dinàmicament entre ells i com aquestes interaccions es poden veure afectades per la unió als seus lligands (Article 4, Figura 7; Annex,

Figura 2). Així doncs, els resultats obtinguts en aquest treball apunten tots en la mateixa direcció i presenten alguns dels possibles mecanismes d'acció que es poden estar donant en el ronyó durant el tractament crònic amb isoproterenol.

5.4. Consideracions finals

Aquesta tesi va ser inicialment concebuda amb l'objectiu d'estudiar la implicació del sistema de receptors ErbB en el cor de ratolí en resposta a l'estimulació crònica amb catecolamines. Tot i haver ampliat els límits del cor i haver aprofundit també en altres òrgans com ara el ronyó, en general, no ens hem allunyat mai del sistema ErbB ni tampoc de les catecolamines. I és que de fet, el cor i el ronyó són precisament dos òrgans amb molta influència mútua i sotmesos a una regulació molt acurada per part del sistema nerviós. Normalment, el bon funcionament del cor és un requisit indispensable pel bon funcionament del ronyó, i viceversa. En el moment en què algun dels dos defalleix, l'altre en pateix ràpidament les conseqüències (269).

En els nostres estudis, la durada de l'estimulació crònica escollida (7 dies) no ha estat suficient per tal d'observar disfuncions en el ronyó. No obstant, en el cor vam observar una clara inducció d'hipertrofia, mentre que en el ronyó vam detectar una pèrdua de massa renal, la qual vam interpretar com una lesió amb mort cel·lular. En ambdós casos, la prolongació del tractament segurament hauria comportat l'aparició de disfuncions que a la llarga haurien derivat en insuficiències cardíaca i renal. El fet que haguem escollit aquest temps de tractament, però, ens ha permès estudiar els rols dels receptors ErbB i/o els seus lligands en el cor i el ronyó durant la fase inicial del tractament amb catecolamines, és a dir, en els estadis inicials de la resposta d'aquests òrgans a l'estrès crònic per catecolamines.

Sabem que l'EGF procedent de les glàndules submaxil·lars pot exercir un efecte cardioprotector durant l'estimulació adrenèrgica aguda. Aquí hem vist, però, que no és així durant l'estimulació adrenèrgica crònica. Aquesta resposta manté certa similitud amb el què s'observa en el ronyó en situacions d'insuficiència renal aguda. En aquestes situacions, s'ha observat com la concentració d'EGF en el ronyó i en orina disminueix dràsticament a les 24 h, i no es recupera fins més enllà dels 7 dies (236;237). Alguns autors, però, han observat com aquesta disminució de l'EGF en el ronyó va precedida per un alliberament massiu d'aquest factor en el mateix ronyó, qui sap si amb la finalitat de promoure la regeneració del dany causat (238). Així doncs, sembla ser que l'EGF emmagatzemat en els dos grans llocs de síntesi, com

són les glàndules submaxil·lars i el ronyó, és alliberat en situacions d'estrès agut amb finalitats protectores. Per altra banda, altres lligands d'ErbB1 com són el TGF- α o l'HB-EGF també es veuen alterats durant la senyalització adrenèrgica o el dany tissular, però en aquest cas, la seva acció té lloc més tardanament que la de l'EGF i en un radi d'acció més limitat (funció autocrina i paracrina). En concret, l'HB-EGF està involucrat en el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca (197), mentre que tant l'HB-EGF com el TGF- α se sobreexpressen en el ronyó durant els processos de regeneració en resposta al dany causat per isquèmia/reperfusió o per agents nefrotòxics (233;234).

Així doncs, podem observar com hi ha certa especialització entre els diferents lligands de la família de receptors ErbB, i com la regulació temporal i espacial de la seva expressió és essencial a l'hora de participar en diferents processos. En aquest cas, l'EGF sembla ser l'encarregat de parar el primer cop d'una manera general, mentre que els altres dos factors, el TGF- α i l'HB-EGF, són els responsables locals a l'hora de gestionar una resposta a més llarg termini.

És per això que pensem que l'EGF no tindria un paper important en la proliferació observada en el ronyó dels animals tractats crònicament amb isoproterenol. L'acumulació d'ErbB1 suggereix un possible rol del TGF- α i l'HB-EGF durant aquest procés. Paral·lelament a l'acumulació d'ErbB1, però, també hem observat l'acumulació dels receptors ErbB2, ErbB3 i ErbB4. Aquest fet amplia el ventall de lligands a considerar, i entre els possibles candidats, trobem les NRGs. En el cor, les NRGs disminueixen l'apoptosi provocada per l'adrenalina (176), mentre que per l'altra banda, és reconegut el seu paper en la supervivència i el creixement cel·lular (165). És per això, doncs, que creiem que les NRGs serien bones candidates a l'hora de realitzar estudis de dany renal, o com en aquest cas, d'estimulació adrenèrgica crònica, juntament amb els altres lligands comentats anteriorment. Hem de destacar que no existeixen, fins allà on coneixem, estudis sobre la funció protectora de les NRGs en el ronyó.

Tal i com ens indiquen els patrons d'expressió dels receptors ErbB durant el desenvolupament postnatal tant del cor com del ronyó, aquests receptors estan altament implicats en els processos de proliferació cel·lular. No és estrany, doncs, que en situacions en què observem proliferació, observem també una paral·lela sobreexpressió dels receptors ErbB, tal i com passa en els ronyons d'animals tractats crònicament amb isoproterenol. Tenint en compte que se sobreexpressen els quatre receptors i no només un, caldrà estudiar quina és la funció de cadascun d'aquests

receptors, i en especial dels seus lligands, que al cap i a la fi són els encarregats de començar qualsevol senyalització.

Finalment, el rol dels receptors ErbB en el control del cicle cel·lular els ha situat en l'epicentre dels estudis en oncologia. No obstant, en aquesta tesi hem intentat remarcar també el paper que juguen o poden jugar aquests receptors en molts altres processos en el cor o en el ronyó. Un dels factors importants a l'hora de plantejar un estudi i d'extreure'n conclusions és la de tenir totes les cartes sobre la taula. La majoria d'estudis en el cor, però, s'han centrat bàsicament en ErbB2 i ErbB4, mentre que en el ronyó el receptor estrella ha estat sempre ErbB1. En aquesta tesi, nosaltres hem demostrat la presència i la localització en les mateixes zones de tots els receptors ErbB tant a cor com a ronyó, i a partir d'aquí n'hem estudiat la resposta a l'estimulació adrenèrgica crònica. Serà bo, doncs, que a partir d'ara es tingui en compte tot el sistema ErbB i no només algun element per separat, ja que sinó es tenen molts números per no obtenir una visió exacte, sinó només parcial del que sigui que s'estigui estudiant.

6. Conclusions

- L'EGF procedent de les glàndules submaxil·lars només pot tenir funció cardioprotectora en situacions d'estimulació adrenèrgica aguda, però no en la crònica, ja que els nivells en glàndula es recuperen molt lentament després d'una primera estimulació. En coherència amb aquestes observacions, l'extirpació de les glàndules submaxil·lars en el ratolí no afecta la hipertròfia cardíaca induïda per l'estimulació adrenèrgica crònica ni els nivells dels receptors ErbB. Per tant, l'EGF de les glàndules submaxil·lars no intervé com activador del sistema ErbB en el procés d'hipertròfia cardíaca.

- El receptor ErbB3 s'expressa tant en el cor en desenvolupament com en el cor adult de ratolí. Aquest receptor és funcional i regulable per l'estimulació adrenèrgica. A més a més, es localitza en els túbuls T de les línies Z, tal i com també succeeix amb altres receptors ErbB.

- La disminució reversible del pes i el contingut de proteïna del ronyó, així com l'increment d'incorporació de BrdU després de l'estimulació β -adrenèrgica crònica, indica un procés de lesió i posterior regeneració. Nosaltres suggerim la participació de tot el sistema ErbB en la regeneració tubular.

7. Bibliografia

Bibliografia

1. **Civantos CB, Aleixandre dA** 2001 Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* 44:195-208
2. **Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T** 2001 Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 96:528-538
3. **Goldstein D** 1995 *Stress, Catecholamines and Cardiovascular Disease*. New York Oxford University Press
4. **Xiao RP** 2001 Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001:re15
5. **Barki-Harrington L, Perrino C, Rockman HA** 2004 Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63:391-402
6. **Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B** 2002 Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1838-H1845
7. **Michel MC, Rump LC** 1996 alpha-Adrenergic regulation of human renal function. *Fundam Clin Pharmacol* 10:493-503
8. **Feng F, Pettinger WA, Abel PW, Jeffries WB** 1991 Regional distribution of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 258:263-268
9. **Gopalakrishnan SM, Chen C, Lokhandwala MF** 1993 Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat renal proximal tubules. *Eur J Pharmacol* 250:469-472
10. **Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, Lohse MJ** 2001 Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59:515-531
11. **Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK** 1999 Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 274:16701-16708
12. **Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM** 1999 Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38:10361-10370
13. **Sulakhe PV, Vo XT** 1995 Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* 149-150:103-126
14. **Otani H, Otani H, Das DK** 1988 Alpha 1-adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscles. *Circ Res* 62:8-17

15. **Capogrossi MC, Kachadorian WA, Gambassi G, Spurgeon HA, Lakatta EG** 1991 Ca²⁺ dependence of alpha-adrenergic effects on the contractile properties and Ca²⁺ homeostasis of cardiac myocytes. *Circ Res* 69:540-550
16. **Danziger RS, Sakai M, Lakatta EG, Hansford RG** 1990 Interactive alpha- and beta-adrenergic actions of norepinephrine in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22:111-123
17. **Kissling G, Blickle B, Ross C, Pascht U, Gulbins E** 1997 alpha 1-adrenoceptor-mediated negative inotropy of adrenaline in rat myocardium. *J Physiol* 499 (Pt 1):195-205
18. **Gambassi G, Spurgeon HA, Lakatta EG, Blank PS, Capogrossi MC** 1992 Different effects of alpha- and beta-adrenergic stimulation on cytosolic pH and myofilament responsiveness to Ca²⁺ in cardiac myocytes. *Circ Res* 71:870-882
19. **Navarro-Sobrinho M, Lorita J, Soley M, Ramirez I** 2010 Catecholamine-induced heart injury in mice: differential effects of isoproterenol and phenylephrine. *Histol Histopathol* 25:589-597
20. **Watanabe AM, Hathaway DR, Besch HR, Jr., Farmer BB, Harris RA** 1977 alpha-Adrenergic reduction of cyclic adenosine monophosphate concentrations in rat myocardium. *Circ Res* 40:596-602
21. **Endoh M, Hiramoto T, Ishihata A, Takanashi M, Inui J** 1991 Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ Res* 68:1179-1190
22. **Hori M, Sato H, Kitakaze M, Iwai K, Takeda H, Inoue M, Kamada T** 1994 Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca²⁺ overload. *Circ Res* 75:324-334
23. **Downing SE, Chen V** 1985 Myocardial injury following endogenous catecholamine release in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 17:377-387
24. **Goldspink DF, Burniston JG, Ellison GM, Clark WA, Tan LB** 2004 Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? *Exp Physiol* 89:407-416
25. **Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MA** 2000 Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation* 102:344-350
26. **Todd GL, Baroldi G, Pieper GM, Clayton FC, Eliot RS** 1985 Experimental catecholamine-induced myocardial necrosis. I. Morphology, quantification and regional distribution of acute contraction band lesions. *J Mol Cell Cardiol* 17:317-338
27. **Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK** 1999 Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 31:1289-1297

28. **Kevin LG, Novalija E, Stowe DF** 2005 Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 101:1275-1287
29. **Lorita J, Escalona N, Faraudo S, Soley M, Ramirez I** 2002 Effects of epidermal growth factor on epinephrine-stimulated heart function in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1887-H1895
30. **DiBona GF, Kopp UC** 1997 Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77:75-197
31. **Muller J, Barajas L** 1972 Electron microscopic and histochemical evidence for a tubular innervation in the renal cortex of the monkey. *J Ultrastruct Res* 41:533-549
32. **Bohmann C, Schaible U, Schollmeyer P, Rump LC** 1994 Alpha 2D-adrenoceptors modulate renal noradrenaline release in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 271:283-292
33. **Elhawary AM, Pang CC** 1994 Alpha 1b-adrenoceptors mediate renal tubular sodium and water reabsorption in the rat. *Br J Pharmacol* 111:819-824
34. **Elhawary AM, Pettinger WA, Wolff DW** 1992 Subtype-selective alpha-1 adrenoceptor alkylation in the rat kidney and its effect on the vascular pressor response. *J Pharmacol Exp Ther* 260:709-713
35. **Holdaas H, DiBona GF, Kiil F** 1981 Effect of low-level renal nerve stimulation on renin release from nonfiltering kidneys. *Am J Physiol* 241:F156-F161
36. **Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C** 2010 Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 90:607-673
37. **Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, Hastings J, Aggarwal A, Esler MD** 2004 Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension* 43:169-175
38. **Grassi G, Seravalle G, Colombo M, Bolla G, Cattaneo BM, Cavagnini F, Mancia G** 1998 Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans. *Circulation* 97:2037-2042
39. **Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE** 1996 Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med* 335:1480-1485
40. **Converse RL, Jr., Jacobsen TN, Toto RD, Jost CM, Cosentino F, Fouad-Tarazi F, Victor RG** 1992 Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med* 327:1912-1918
41. **Ishii M, Ikeda T, Takagi M, Sugimoto T, Atarashi K, Igari T, Uehara Y, Matsuoka H, Hirata Y, Kimura K, Takeda T, Murao S** 1983 Elevated plasma catecholamines in hypertensives with primary glomerular diseases. *Hypertension* 5:545-551

42. **Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Tripepi G, Bonanno G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Seminara G, Cataliotti A, Stancanelli B, Malatino LS** 2002 Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation* 105:1354-1359
43. **Johnson RJ, Gordon KL, Suga S, Duijvestijn AM, Griffin K, Bidani A** 1999 Renal injury and salt-sensitive hypertension after exposure to catecholamines. *Hypertension* 34:151-159
44. **Thulesen J, Nexø E, Poulsen SS** 2000 Renal content and output of epidermal growth factor in long-term adrenergic agonist-treated rats. *Regul Pept* 90:69-76
45. **Adamczak M, Zeier M, Dikow R, Ritz E** 2002 Kidney and hypertension. *Kidney Int Suppl* 62-67
46. **Zhang H, Faber JE** 2001 Trophic effect of norepinephrine on arterial intima-media and adventitia is augmented by injury and mediated by different alpha1-adrenoceptor subtypes. *Circ Res* 89:815-822
47. **Kobuchi S, Shintani T, Sugiura T, Tanaka R, Suzuki R, Tsutsui H, Fujii T, Ohkita M, Ayajiki K, Matsumura Y** 2009 Renoprotective effects of gamma-aminobutyric acid on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 623:113-118
48. **Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B** 2006 Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:582-593
49. **Yarden Y, Sliwkowski MX** 2001 Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137
50. **Holbro T, Hynes NE** 2004 ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:195-217
51. **Hynes NE, MacDonald G** 2009 ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21:177-184
52. **Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP** 2010 The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 74:73-78
53. **Riese DJ, Stern DF** 1998 Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20:41-48
54. **Roskoski R, Jr.** 2004 The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1-11
55. **Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE** 2000 The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167
56. **Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE** 1997 ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655

57. **Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, III** 1994 Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136
58. **Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA** 2010 ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7692-7697
59. **Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA** 2006 The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 186:38-53
60. **Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW** 2003 Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284:31-53
61. **Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, .** 1984 Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309:418-425
62. **Carpenter G, Zendegui JG** 1986 Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res* 164:1-10
63. **Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J** 1989 Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8:421-427
64. **Countaway JL, Nairn AC, Davis RJ** 1992 Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267:1129-1140
65. **Ullrich A, Schlessinger J** 1990 Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212
66. **Bouyain S, Longo PA, Li S, Ferguson KM, Leahy DJ** 2005 The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15024-15029
67. **Sithanandam G, Anderson LM** 2008 The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 15:413-448
68. **Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW** 2003 The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11:495-505
69. **Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J** 1993 Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363:85-88
70. **Davis RJ** 1993 The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268:14553-14556

71. **Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, Hunter T** 1989 Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57:1109-1122
72. **Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y** 2010 Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res* 49:429-437
73. **Carnero A** 2010 The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 16:34-44
74. **Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE** 1999 ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274:17209-17218
75. **Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, Dragoi AM, Platt A, Gilmer TM, Fu XY, Chin YE** 2002 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* 277:30716-30723
76. **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP** 1999 Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19:7289-7304
77. **Sorkin A, Goh LK** 2009 Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 315:683-696
78. **Madshus IH, Stang E** 2009 Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J Cell Sci* 122:3433-3439
79. **Schulze WX, Deng L, Mann M** 2005 Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1:2005
80. **Baass PC, Di Guglielmo GM, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ** 1995 Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol* 5:465-470
81. **Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS** 1999 ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 274:8865-8874
82. **Damjanov I, Mildner B, Knowles BB** 1986 Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab Invest* 55:588-592
83. **Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ** 1990 Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5:953-962
84. **Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ** 1992 Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 7:1273-1278
85. **Srinivasan R, Poulson R, Hurst HC, Gullick WJ** 1998 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* 185:236-245

86. **Chen B, Bronson RT, Klamon LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, Magnuson T, Douglas PS, Morgan JP, Neel BG** 2000 Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet* 24:296-299
87. **Sibilia M, Wagner EF** 1995 Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269:234-238
88. **Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, .** 1995 Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269:230-234
89. **Rajagopalan V, Zucker IH, Jones JA, Carlson M, Ma YJ** 2008 Cardiac ErbB-1/ErbB-2 mutant expression in young adult mice leads to cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H543-H554
90. **Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C** 1995 Requirement for neuregulin receptor *erbB2* in neural and cardiac development. *Nature* 378:394-398
91. **Morris JK, Lin W, Hauser C, Marchuk Y, Getman D, Lee KF** 1999 Rescue of the cardiac defect in *ErbB2* mutant mice reveals essential roles of *ErbB2* in peripheral nervous system development. *Neuron* 23:273-283
92. **Crone SA, Negro A, Trumpp A, Giovannini M, Lee KF** 2003 Colonic epithelial expression of *ErbB2* is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system. *Neuron* 37:29-40
93. **Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J, Jr., Chien KR, Lee KF** 2002 *ErbB2* is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 8:459-465
94. **Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN** 2002 Conditional mutation of the *ErbB2* (*HER2*) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8880-8885
95. **Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW** 1997 *ErbB3* is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with *ErbB2*-and heregulin-deficient mice. *Development* 124:4999-5011
96. **Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G** 1995 Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the *ErbB4* neuregulin receptor. *Nature* 378:390-394
97. **Golub MS, Germann SL, Lloyd KC** 2004 Behavioral characteristics of a nervous system-specific *erbB4* knock-out mouse. *Behav Brain Res* 153:159-170
98. **Tidcombe H, Jackson-Fisher A, Mathers K, Stern DF, Gassmann M, Golding JP** 2003 Neural and mammary gland defects in *ErbB4* knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8281-8286

99. **Garcia-Rivello H, Taranda J, Said M, Cabeza-Meckert P, Vila-Petroff M, Scaglione J, Ghio S, Chen J, Lai C, Laguens RP, Lloyd KC, Hertig CM** 2005 Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1153-H1160
100. **Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S** 1972 Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 247:5928-5934
101. **Cohen S** 1960 Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and its Neuro-Cytotoxic Antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46:302-311
102. **Gray A, Dull TJ, Ullrich A** 1983 Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303:722-725
103. **Appella E, Weber IT, Blasi F** 1988 Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* 231:1-4
104. **Sanderson MP, Dempsey PJ, Dunbar AJ** 2006 Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors* 24:121-136
105. **Taylor JM, Cohen S, Mitchell WM** 1970 Epidermal growth factor: high and low molecular weight forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:164-171
106. **Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R** 1986 Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res* 14:8427-8446
107. **Fisher DA, Lakshmanan J** 1990 Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr Rev* 11:418-442
108. **Thesleff I, Viinikka L, Saxen L, Lehtonen E, Perheentupa J** 1988 The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life Sci* 43:13-18
109. **Grau M, Rodriguez C, Soley M, Ramirez I** 1994 Relationship between epidermal growth factor in mouse submandibular glands, plasma, and bile: effects of catecholamines and fasting. *Endocrinology* 135:1854-1862
110. **Byyny RL, Orth DN, Cohen S, Doyne ES** 1974 Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology* 95:776-782
111. **Tuomela T** 1990 Epidermal growth factor concentrations in submandibular salivary gland, plasma, liver, bile, kidneys and urine of male mice: dynamics after phenylephrine injection. *Life Sci* 46:1197-1206
112. **Sanchez O, Arnau A, Pareja M, Poch E, Ramirez I, Soley M** 2002 Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress. *Cell Stress Chaperones* 7:36-46
113. **Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, Jones A** 1994 Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 269:19667-19670

114. **St Hilaire RJ, Hradek GT, Jones AL** 1983 Hepatic sequestration and biliary secretion of epidermal growth factor: evidence for a high-capacity uptake system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3797-3801
115. **Burwen SJ, Barker ME, Goldman IS, Hradek GT, Raper SE, Jones AL** 1984 Transport of epidermal growth factor by rat liver: evidence for a nonlysosomal pathway. *J Cell Biol* 99:1259-1265
116. **Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP** 1985 Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313:228-231
117. **Marti U, Burwen SJ, Jones AL** 1989 Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology* 9:126-138
118. **Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P** 1985 Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* 26:920-927
119. **Tsutsumi O, Oka T** 1987 Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Am J Obstet Gynecol* 156:241-244
120. **Jansson T, Skarland H** 1990 Maternally administered epidermal growth factor stimulates fetal growth in the rat. *Acta Physiol Scand* 138:245-246
121. **Luetteke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC** 1999 Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 126:2739-2750
122. **Allen A, Flemstrom G, Garner A, Kivilaakso E** 1993 Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev* 73:823-857
123. **Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PK, Majka J, Dembinski A** 1991 Role of salivary glands and epidermal growth factor (EGF) in gastric secretion and mucosal integrity in rats exposed to stress. *Regul Pept* 32:203-215
124. **Cohen S, ELLIOTT GA** 1963 The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 40:1-5
125. **Cohen S** 1962 Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562
126. **Tsutsumi O, Kubota Y, Oka T** 1987 Effect of sialoadenectomy, treatment with epidermal growth factor (EGF) antiserum and replacement of EGF on the epidermis in mice. *J Endocrinol* 113:193-197
127. **Bennett NT, Schultz GS** 1993 Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 165:728-737
128. **Babul A, Gonul B, Dincer S, Erdogan D, Ozogul C** 2004 The effect of EGF application in gel form on histamine content of experimentally induced wound in mice. *Amino Acids* 27:321-326

129. **Ederly M, Pang K, Larson L, Colosi T, Nandi S** 1985 Epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands in various physiological states. *Endocrinology* 117:405-411
130. **Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T** 1986 A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 233:975-977
131. **Furuya S, Endo Y, Oba M, Suzuki S, Nozawa S** 1993 Effect of epidermal growth factor on human sperm capacitation. *Fertil Steril* 60:905-910
132. **Syed V, Khan SA, Nieschlag E** 1991 Epidermal growth factor stimulates testosterone production of human Leydig cells in vitro. *J Endocrinol Invest* 14:93-97
133. **Tebar F, Ramirez I, Soley M** 1993 Epidermal growth factor modulates the lipolytic action of catecholamines in rat adipocytes. Involvement of a Gi protein. *J Biol Chem* 268:17199-17204
134. **Tebar F, Grau M, Mena MP, Arnau A, Soley M, Ramirez I** 2000 Epidermal growth factor secreted from submandibular salivary glands interferes with the lipolytic effect of adrenaline in mice. *Endocrinology* 141:876-882
135. **Grau M, Soley M, Ramirez I** 1997 Interaction between adrenaline and epidermal growth factor in the control of liver glycogenolysis in mouse. *Endocrinology* 138:2601-2609
136. **Grau M, Tebar F, Ramirez I, Soley M** 1996 Epidermal growth factor administration decreases liver glycogen and causes mild hyperglycaemia in mice. *Biochem J* 315 (Pt 1):289-293
137. **Houslay MD, Kolch W** 2000 Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 58:659-668
138. **Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD, .** 1992 Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256:1205-1210
139. **Peles E, Bacus SS, Koski RA, Lu HS, Wen D, Ogden SG, Levy RB, Yarden Y** 1992 Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69:205-216
140. **Goodearl AD, Davis JB, Mistry K, Minghetti L, Otsu M, Waterfield MD, Stroobant P** 1993 Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem* 268:18095-18102
141. **Marchionni MA, Goodearl AD, Chen MS, Bermingham-McDonogh O, Kirk C, Hendricks M, Danehy F, Misumi D, Sudhalter J, Kobayashi K, .** 1993 Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362:312-318
142. **Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD** 1993 ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815

143. **Falls DL** 2003 Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30
144. **Wen D, Suggs SV, Karunakaran D, Liu N, Cupples RL, Luo Y, Janssen AM, Ben Baruch N, Trollinger DB, Jacobsen VL, .** 1994 Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* 14:1909-1919
145. **Burden S, Yarden Y** 1997 Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18:847-855
146. **Law AJ, Shannon WC, Hyde TM, Kleinman JE, Harrison PJ** 2004 Neuregulin-1 (NRG-1) mRNA and protein in the adult human brain. *Neuroscience* 127:125-136
147. **Garratt AN** 2006 "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol* 41:215-218
148. **Cote GM, Miller TA, Lebrasseur NK, Kuramochi Y, Sawyer DB** 2005 Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res* 311:135-146
149. **Carraway KL, III, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C** 1997 Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387:512-516
150. **Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ** 1997 Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387:509-512
151. **Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ** 1997 Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9562-9567
152. **Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y** 1999 Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689
153. **Meyer D, Birchmeier C** 1995 Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390
154. **Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D** 1998 The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12:1825-1836
155. **Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C** 1997 Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124:3575-3586
156. **Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE** 1996 Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4833-4838

157. **Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW** 2000 Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79-91
158. **Li L, Cleary S, Mandarano MA, Long W, Birchmeier C, Jones FE** 2002 The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland. *Oncogene* 21:4900-4907
159. **Britto JM, Lukehurst S, Weller R, Fraser C, Qiu Y, Hertzog P, Busfield SJ** 2004 Generation and characterization of neuregulin-2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24:8221-8226
160. **Kim D, Chi S, Lee KH, Rhee S, Kwon YK, Chung CH, Kwon H, Kang MS** 1999 Neuregulin stimulates myogenic differentiation in an autocrine manner. *J Biol Chem* 274:15395-15400
161. **Trachtenberg JT** 1998 Fiber apoptosis in developing rat muscles is regulated by activity, neuregulin. *Dev Biol* 196:193-203
162. **Guma A, Martinez-Redondo V, Lopez-Soldado I, Canto C, Zorzano A** 2010 Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E742-E750
163. **Rohrbach S, Yan X, Weinberg EO, Hasan F, Bartunek J, Marchionni MA, Lorell BH** 1999 Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors. *Circulation* 100:407-412
164. **Rohrbach S, Niemann B, Silber RE, Holtz J** 2005 Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium -- depressed expression and attenuated activation. *Basic Res Cardiol* 100:240-249
165. **Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA, Kelly RA** 1998 Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273:10261-10269
166. **Baliga RR, Pimental DR, Zhao YY, Simmons WW, Marchionni MA, Sawyer DB, Kelly RA** 1999 NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol* 277:H2026-H2037
167. **Lemmens K, Segers VF, Demolder M, De Keulenaer GW** 2006 Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem* 281:19469-19477
168. **Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B** 2009 Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138:257-270
169. **Sawyer DB, Zuppinger C, Miller TA, Eppenberger HM, Suter TM** 2002 Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation* 105:1551-1554

170. **Fukazawa R, Miller TA, Kuramochi Y, Frantz S, Kim YD, Marchionni MA, Kelly RA, Sawyer DB** 2003 Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol* 35:1473-1479
171. **Bian Y, Sun M, Silver M, Ho KK, Marchionni MA, Caggiano AO, Stone JR, Amende I, Hampton TG, Morgan JP, Yan X** 2009 Neuregulin-1 attenuated doxorubicin-induced decrease in cardiac troponins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1974-H1983
172. **Timolati F, Ott D, Pentassuglia L, Giraud MN, Perriard JC, Suter TM, Zuppinger C** 2006 Neuregulin-1 beta attenuates doxorubicin-induced alterations of excitation-contraction coupling and reduces oxidative stress in adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41:845-854
173. **Liu FF, Stone JR, Schuldt AJ, Okoshi K, Okoshi MP, Nakayama M, Ho KK, Manning WJ, Marchionni MA, Lorell BH, Morgan JP, Yan X** 2005 Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H660-H666
174. **Kuramochi Y, Cote GM, Guo X, Lebrasseur NK, Cui L, Liao R, Sawyer DB** 2004 Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem* 279:51141-51147
175. **Kuramochi Y, Lim CC, Guo X, Colucci WS, Liao R, Sawyer DB** 2004 Myocyte contractile activity modulates norepinephrine cytotoxicity and survival effects of neuregulin-1beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C222-C229
176. **Lemmens K, Fransen P, Sys SU, Brutsaert DL, De Keulenaer GW** 2004 Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* 109:324-326
177. **Lemmens K, Doggen K, De Keulenaer GW** 2007 Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure. *Circulation* 116:954-960
178. **Mansour H, de Tombe PP, Samarel AM, Russell B** 2004 Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase Cepsilon and focal adhesion kinase. *Circ Res* 94:642-649
179. **Heidkamp MC, Bayer AL, Kalina JA, Eble DM, Samarel AM** 2002 GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 90:1282-1289
180. **Lebrasseur NK, Cote GM, Miller TA, Fielding RA, Sawyer DB** 2003 Regulation of neuregulin/ErbB signaling by contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1149-C1155
181. **Russell KS, Stern DF, Polverini PJ, Bender JR** 1999 Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis. *Am J Physiol* 277:H2205-H2211
182. **Rabkin SW, Sunga P, Myrdal S** 1987 The effect of epidermal growth factor on chronotropic response in cardiac cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 146:889-897

183. **Rabkin SW** 1990 The effect of alteration of extracellular Na⁺ or Ca²⁺ and inhibition of Ca²⁺ entry, Na(+)-H⁺ exchange, and Na(+)-Ca²⁺ exchange by diltiazem, amiloride, and dichlorobenzamil on the response of cardiac cell aggregates to epidermal growth factor. *Exp Cell Res* 188:262-266
184. **Keiser JA, Ryan MJ** 1996 Hemodynamic effects of epidermal growth factor in conscious rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4957-4961
185. **Berk BC, Brock TA, Webb RC, Taubman MB, Atkinson WJ, Gimbrone MA, Jr., Alexander RW** 1985 Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. *J Clin Invest* 75:1083-1086
186. **Nair BG, Rashed HM, Patel TB** 1993 Epidermal growth factor produces inotropic and chronotropic effects in rat hearts by increasing cyclic AMP accumulation. *Growth Factors* 8:41-48
187. **Nair BG, Parikh B, Milligan G, Patel TB** 1990 Gs alpha mediates epidermal growth factor-elicited stimulation of rat cardiac adenylate cyclase. *J Biol Chem* 265:21317-21322
188. **Chen Z, Nield HS, Sun H, Barbier A, Patel TB** 1995 Expression of type V adenylyl cyclase is required for epidermal growth factor-mediated stimulation of cAMP accumulation. *J Biol Chem* 270:27525-27530
189. **Pareja M, Sanchez O, Lorita J, Soley M, Ramirez I** 2003 Activated epidermal growth factor receptor (ErbB1) protects the heart against stress-induced injury in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R455-R462
190. **Lorita J, Camprecios G, Soley M, Ramirez I** 2009 ErbB receptors protect the perfused heart against injury induced by epinephrine combined with low-flow ischemia. *Growth Factors* 27:203-213
191. **Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, Chang A, Zhang C, Patterson C, Lee DC** 2003 Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* 22:2704-2716
192. **Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E** 2003 Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3221-3226
193. **Yamazaki S, Iwamoto R, Saeki K, Asakura M, Takashima S, Yamazaki A, Kimura R, Mizushima H, Moribe H, Higashiyama S, Endoh M, Kaneda Y, Takagi S, Itami S, Takeda N, Yamada G, Mekada E** 2003 Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163:469-475
194. **Simpson P, McGrath A, Savion S** 1982 Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 51:787-801
195. **Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S** 1993 Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75:977-984

196. **Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F** 1991 Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69:209-215
197. **Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S** 2002 Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8:35-40
198. **Gupta S, Das B, Sen S** 2007 Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 9:623-652
199. **Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL** 2004 The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* 29:609-617
200. **McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S** 2003 Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12355-12360
201. **Damilano F, Perino A, Hirsch E** 2010 PI3K kinase and scaffold functions in heart. *Ann N Y Acad Sci* 1188:39-45
202. **Perrella MA, Maki T, Prasad S, Pimental D, Singh K, Takahashi N, Yoshizumi M, Alali A, Higashiyama S, Kelly RA, .** 1994 Regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels by hypertrophic stimuli in neonatal and adult rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 269:27045-27050
203. **Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S** 2006 ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1-10
204. **Kagiyama S, Qian K, Kagiyama T, Phillips MI** 2003 Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 41:824-829
205. **Sakurai H, Barros EJ, Tsukamoto T, Barasch J, Nigam SK** 1997 An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6279-6284
206. **Sakurai H, Tsukamoto T, Kjelsberg CA, Cantley LG, Nigam SK** 1997 EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney. *Am J Physiol* 273:F463-F472
207. **Rogers SA, Ryan G, Hammerman MR** 1992 Metanephric transforming growth factor-alpha is required for renal organogenesis in vitro. *Am J Physiol* 262:F533-F539
208. **Takemura T, Hino S, Okada M, Murata Y, Yanagida H, Ikeda M, Yoshioka K, Harris RC** 2002 Role of membrane-bound heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in renal epithelial cell branching. *Kidney Int* 61:1968-1979

209. **Takemura T, Hino S, Kuwajima H, Yanagida H, Okada M, Nagata M, Sasaki S, Barasch J, Harris RC, Yoshioka K** 2001 Induction of collecting duct morphogenesis in vitro by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Am Soc Nephrol* 12:964-972
210. **Sakurai H, Bush KT, Nigam SK** 2005 Heregulin induces glial cell line-derived neurotrophic growth factor-independent, non-branching growth and differentiation of ureteric bud epithelia. *J Biol Chem* 280:42181-42187
211. **Harris RC, Hoover RL, Jacobson HR, Badr KF** 1988 Evidence for glomerular actions of epidermal growth factor in the rat. *J Clin Invest* 82:1028-1039
212. **Feng L, Garcia GE, Yang Y, Xia Y, Gabbai FB, Peterson OW, Abraham JA, Blantz RC, Wilson CB** 2000 Heparin-binding EGF-like growth factor contributes to reduced glomerular filtration rate during glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* 105:341-350
213. **Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Krug AW, Gekle M** 2004 Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F1226-F1231
214. **Shen JP, Cotton CU** 2003 Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F57-F64
215. **Liu L, Duke BJ, Malik B, Yue Q, Eaton DC** 2009 Biphasic regulation of ENaC by TGF- α and EGF in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F1417-F1427
216. **Schrag D, Chung KY, Flombaum C, Saltz L** 2005 Cetuximab therapy and symptomatic hypomagnesemia. *J Natl Cancer Inst* 97:1221-1224
217. **Groenestege WM, Thebault S, van der WJ, van den BD, Janssen R, Tejpar S, van den Heuvel LP, van Cutsem E, Hoenderop JG, Knoers NV, Bindels RJ** 2007 Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest* 117:2260-2267
218. **Quigley R, Kennerly DA, Sheu JN, Baum M** 1995 Stimulation of proximal convoluted tubule phosphate transport by epidermal growth factor: signal transduction. *Am J Physiol* 269:F339-F344
219. **Arar M, Zajicek HK, Elshihabi I, Levi M** 1999 Epidermal growth factor inhibits Na-Pi cotransport in weaned and suckling rats. *Am J Physiol* 276:F72-F78
220. **Han HJ, Park JY, Lee YJ, Park SH** 2003 Effect of epidermal growth factor on phosphate uptake in renal proximal tubule cells: involvement of PKC, MAPK, and cPLA2. *Kidney Blood Press Res* 26:315-324
221. **Jae HH, Yeong PJ, Jung LY, Taub M** 2004 Epidermal growth factor inhibits ¹⁴C- α -methyl-D-glucopyranoside uptake in renal proximal tubule cells: involvement of PLC/PKC, p44/42 MAPK, and cPLA2. *J Cell Physiol* 199:206-216

222. **Harris RC, Daniel TO** 1989 Epidermal growth factor binding, stimulation of phosphorylation, and inhibition of gluconeogenesis in rat proximal tubule. *J Cell Physiol* 139:383-391
223. **Lee YJ, Lee YJ, Han HJ** 2007 Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl* S27-S35
224. **Norman J, Badie-Dezfooly B, Nord EP, Kurtz I, Schlosser J, Chaudhari A, Fine LG** 1987 EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: potentiation by angiotensin II. *Am J Physiol* 253:F299-F309
225. **Zhuang S, Yan Y, Daubert RA, Schnellmann RG** 2007 Epregrin promotes proliferation and migration of renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F219-F226
226. **Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM, Hyde CP, Haralson MA** 1990 Effects of epidermal growth factor on collagen synthesis by an epithelioid cell line derived from normal rat kidney. *Am J Pathol* 136:1247-1257
227. **Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG** 1997 Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273:F563-F574
228. **Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C** 1989 Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 84:1757-1761
229. **Coimbra TM, Cieslinski DA, Humes HD** 1990 Epidermal growth factor accelerates renal repair in mercuric chloride nephrotoxicity. *Am J Physiol* 259:F438-F443
230. **Norman J, Tsau YK, Bacay A, Fine LG** 1990 Epidermal growth factor accelerates functional recovery from ischaemic acute tubular necrosis in the rat: role of the epidermal growth factor receptor. *Clin Sci (Lond)* 78:445-450
231. **Morin NJ, Laurent G, Nonclercq D, Toubreau G, Heuson-Stiennon JA, Bergeron MG, Beauchamp D** 1992 Epidermal growth factor accelerates renal tissue repair in a model of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Physiol* 263:F806-F811
232. **Wang Z, Chen JK, Wang SW, Moeckel G, Harris RC** 2003 Importance of functional EGF receptors in recovery from acute nephrotoxic injury. *J Am Soc Nephrol* 14:3147-3154
233. **Hise MK, Salmanullah M, Liu L, Drachenberg CI, Papadimitriou JC, Rohan RM** 2001 Control of the epidermal growth factor receptor and its ligands during renal injury. *Nephron* 88:71-79
234. **Sakai M, Zhang M, Homma T, Garrick B, Abraham JA, McKanna JA, Harris RC** 1997 Production of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in the early phase of regeneration after acute renal injury. Isolation and localization of bioactive molecules. *J Clin Invest* 99:2128-2138
235. **Homma T, Sakai M, Cheng HF, Yasuda T, Coffey RJ, Jr., Harris RC** 1995 Induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in rat kidney after acute injury. *J Clin Invest* 96:1018-1025

236. **Safirstein R, Zelent AZ, Price PM** 1989 Reduced renal prepro-epidermal growth factor mRNA and decreased EGF excretion in ARF. *Kidney Int* 36:810-815
237. **Safirstein R, Price PM, Saggi SJ, Harris RC** 1990 Changes in gene expression after temporary renal ischemia. *Kidney Int* 37:1515-1521
238. **Schaudies RP, Nonclercq D, Nelson L, Toubeau G, Zanen J, Heuson-Stiennon JA, Laurent G** 1993 Endogenous EGF as a potential renoprotective factor in ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 265:F425-F434
239. **Flores-Benitez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cerejido M, Contreras RG** 2007 Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F828-F836
240. **Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, Friedlander G** 2000 Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* 106:225-234
241. **Chen J, Chen JK, Neilson EG, Harris RC** 2006 Role of EGF receptor activation in angiotensin II-induced renal epithelial cell hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 17:1615-1623
242. **Shah BH, Catt KJ** 2006 TACE-dependent EGF receptor activation in angiotensin-II-induced kidney disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:235-237
243. **Lautrette A, Li S, Alili R, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, Friedlander G, Terzi F** 2005 Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* 11:867-874
244. **Navarro-Sobrino M.** Hipertòfia cardíaca induïda per Isoproterenol en el ratolí. Efecte de la sialoadenectomia. 2006. Màster en biologia experimental. Universitat de Barcelona.
245. **Carley AN, Semeniuk LM, Shimoni Y, Aasum E, Larsen TS, Berger JP, Severson DL** 2004 Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E449-E455
246. **Buira I, Poch E, Sanchez O, Fernandez-Varo G, Grau M, Tebar F, Ramirez I, Soley M** 2004 Sialoadenectomy alters liver cell turn-over and function in mice. *J Cell Physiol* 198:12-21
247. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
248. **Zak B, Cohen J** 1961 Automatic analysis of tissue culture proteins with stable Folin reagents. *Clin Chim Acta* 6:665-670
249. **Rej R., Horder M.** 1984 Aspartate aminotransferase (Glutamate Oxaloacetate). In: Bergmeyer J. and Grassl M (ed). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U. Weinheim: Verlag Chemie: III 424 - III 416
250. **Horder M, Rej R.** 1984 Alanine aminotransferase (Glutamate Pyruvate Transaminase). In: Bergmeyer J. and Grassl M (ed). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U. Weinheim: Verlag Chemie: III 444 - III 450

251. **Vassault A** 1984 Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer J. and Grassl M (ed). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U. Weinheim: Verlag Chemie: III 118 - III 126
252. **Henderson AR** 1984 Lactate dehydrogenase, isoenzymes. LDH-1 (2-Hydroxybutyrate Dehydrogenase), uv-assay. In: Bergmeyer J. and Grassl M (ed). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer H.U. Weinheim: Verlag Chemie: III 150 - III 156
253. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
254. **Chomczynski P** 1993 A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532-537
255. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** 1985 Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354
256. **Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R** 1992 Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-417
257. **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM** 1996 Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994
258. **Livak KJ, Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25:402-408
259. **Vanguilder HD, Vrana KE, Freeman WM** 2008 Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44:619-626
260. **De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der GJ** 1990 Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 47:1117-1124
261. **Suarez E, Bach D, Cadefau J, Palacin M, Zorzano A, Guma A** 2001 A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J Biol Chem* 276:18257-18264
262. **Sundaresan S, Roberts PE, King KL, Sliwkowski MX, Mather JP** 1998 Biological response to ErbB ligands in nontransformed cell lines correlates with a specific pattern of receptor expression. *Endocrinology* 139:4756-4764
263. **Zhao YY, Feron O, Dessy C, Han X, Marchionni MA, Kelly RA** 1999 Neuregulin signaling in the heart. Dynamic targeting of erbB4 to caveolar microdomains in cardiac myocytes. *Circ Res* 84:1380-1387
264. **Chung KY, Walker JW** 2007 Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol* 71:1494-1502

265. **Rathore N, John S, Kale M, Bhatnagar D** 1998 Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol Res* 38:297-303
266. **Bobillier-Chaumont S, Maupoil V, Berthelot A** 2006 Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta of cadmium and isoproterenol treated rats. *J Appl Toxicol* 26:47-55
267. **Nony PA, Schnellmann RG** 2003 Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 304:905-912
268. **Hallman MA, Zhuang S, Schnellmann RG** 2008 Regulation of dedifferentiation and redifferentiation in renal proximal tubular cells by the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 325:520-528
269. **Bock JS, Gottlieb SS** 2010 Cardiorenal syndrome: new perspectives. *Circulation* 121:2592-2600