



Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica

Unidad de Inmunología

# Identificación y Caracterización Funcional de la Molécula de Membrana CD38 en Células Hepáticas Estrelladas

Tesis doctoral presentada por

**Sandra March Riera**

para optar al grado de

**Doctora en Farmacia**

Director: **Dr. Pablo Engel Rocamora**

Barcelona, Febrero del 2006



*El secreto para llegar es muy sencillo; se reduce a dos palabras; trabajo y perseverancia.*

***Ramón y Cajal***

*(Los tónicos de la voluntad)*



*A mis padres*

*A mi hermano*



## **Agradecimientos**

Al Dr. Pablo Engel, por haberme dado la oportunidad de introducirme en el mundo científico, un mundo que me entusiasma y al que quiero seguir dedicándome. Gracias por guiarme durante estos años de doctorado.

Al Dr. Jaime Bosch y al Dr. García Pagán, estar en un grupo de inmunología estudiando una célula hepática en algunos momentos no ha sido fácil, pero creo que finalmente lo he conseguido, gracias por vuestro apoyo y confianza en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio:

A Juani una gran amiga, que tuve la suerte de conocer en el laboratorio, gracias por tu amistad.

A Ifigenia por los buenos momentos compartidos y el apoyo que nos hemos dado durante estos años (espero que esta vez creas que lo he hecho mejor.....).

A Xavi, Marga, Anna, Isa, Vicky, Nuria, Bego, Lluís, Miriam, Jordi e Irene, por su compañerismo y amistad.

A Laura, mi amiga de siempre que lleva desde los 8 años apoyándome y estando presente en los momentos más importante, tal como éste.

A mis amigas farmacéuticas Marga, Aina, Mar Giné y Mar Crespi, desde que acabamos la universidad cada una de nosotras ha seguido caminos bien diferentes y con éxito, todos estos años nos hemos estado apoyando mutuamente y preocupándonos las unas de las otras, me siento feliz y afortunada de teneros a mi lado.

A Guillermo con el que espero con ilusión compartir esta nueva etapa de mi vida.

A mis Padres y a mi hermano, a quienes se lo debo todo, gracias por animarme en todo momento en conseguir mis metas.





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Introducción a las células hepáticas estrelladas.....</b>	<b>17</b>
1.1.1. Localización y fenotipos.....	17
<b>1.2. Origen embrionario de las células estrelladas del hígado.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Implicación de las células hepáticas estrelladas en diferentes procesos fisiopatológicos.....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Fibrogénesis.....	19
1.3.1.1. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso de fibrogénesis.....	20
1.3.2. Inflamación.....	22
1.3.2.1. Moléculas de adhesión.....	22
1.3.2.2. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso inflamatorio.....	24
1.3.2.2.1. Mediadores soluble.....	24
1.3.2.2.2. Moléculas de adhesión expresadas por las células hepáticas estrelladas.....	26
1.3.3. Contracción.....	30
1.3.3.1. Alteraciones en la resistencia vascular.....	32
1.3.3.2. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso contráctil.....	32
1.3.3.3. Contractibilidad de las células hepáticas estrelladas: vías de señalización.....	33
1.3.3.3.1. Movilización de Calcio.....	34
1.3.3.3.1.1. Liberación de calcio de compartimientos intracelulares.....	34
1.3.3.3.1.2. Entrada de calcio del exterior de la célula.....	35
1.3.3.3.2. Vía deRHO.....	36
<b>1.4. Introducción a la molécula de membrana CD38.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5. Funciones del CD38.....</b>	<b>39</b>
1.5.1. Receptor.....	39

1.5.1.1. Transductor de señales.....	39
1.5.1.2. Molécula de adhesión.....	40
1.5.2. Enzima.....	40
<b>1.6. Expresión del CD38.....</b>	<b>42</b>
1.6.1. Células del sistema hematopoyético.....	42
1.6.2. Otros tejidos.....	42
1.6.2.1. Células musculares.....	43
1.6.2.2. Islotes pancreáticos.....	44
1.6.2.3. Astrocitos.....	45
1.6.2.4. Osteoclastos.....	45
1.6.2.5. Células de la retina.....	45
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Producción de anticuerpos monoclonales.....</b>	<b>53</b>
3.1.1. Inmunización.....	53
3.1.2. Fusión celular.....	53
3.1.2.1. Obtención y preparación de las células de “feeders”.....	54
3.1.2.2. Obtención de los esplenocitos.....	54
3.1.2.3. Preparación de las células de mieloma (NS-1).....	55
3.1.2.4. Fusión.....	55
3.1.3. Selección en medio HAT.....	56
3.1.4. Selección de los hibridomas de interés.....	57
3.1.5. Cultivo secundario.....	57
3.1.6. Subclonaje de los híbridos mediante dilución límite.....	57
3.1.7. Expansión de los hibridomas.....	58
3.1.8. Congelado de los hibridomas.....	58
3.1.9. Purificación de anticuerpos.....	59
3.1.10. Biotinilización de anticuerpos.....	60
<b>3.2. Aislamientos celulares.....</b>	<b>61</b>

3.2.1. Aislamiento de células hepáticas estrelladas de rata.....	61
3.2.1.1. Cultivo de las células hepáticas estrelladas.....	64
3.2.1.2. Tinción “Oil-Red”.....	64
3.2.2. Aislamiento de hepatocitos y de células no parenquimáticas (Kupffer y endoteliales).....	65
3.2.3. Aislamiento de células endoteliales y células de Kupffer.....	69
3.2.3.1. Aislamiento de células de Kupffer.....	70
3.2.3.2. Aislamiento y cultivo de células endoteliales.....	70
3.2.4. Aislamiento de monocitos y linfocitos de sangre periférica de rata.....	71
<b>3.3. Perfusión hepática para la evaluación de la resistencia intrahepática..</b>	<b>72</b>
<b>3.4. Análisis de proteínas.....</b>	<b>73</b>
3.4.1. Inmunoprecipitación.....	73
3.4.2. Electroforesis de proteínas.....	76
3.4.2.1. Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	76
3.4.2.2. Detección de proteínas (Western-Blott).....	75
3.4.2.2.1. Muestras previamente biotiniladas.....	79
3.4.2.2.2. Muestras <u>no</u> biotiniladas.....	79
3.4.2.2.3. Eliminación de anticuerpos de la membrana “Stripping”.....	80
<b>3.5. Citometría de Flujo.....</b>	<b>80</b>
3.5.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	80
3.5.2. Determinación cuantitativa de F-actina.....	81
3.5.2.1. Permeabilización celular.....	82
<b>3.6. Microscopia de fluorescencia.....</b>	<b>82</b>
3.6.1. Microscopia de fluorescencia confocal.....	82
3.6.1.1. Inmunocitoquímica.....	82
3.6.1.2. Inmunohistoquímica.....	84
3.6.1.3. Marcaje de las fibras de actina.....	86
3.6.1.4. Ensayo de movilización de calcio.....	87
<b>3.7. Microscopia de Tracción.....</b>	<b>89</b>
<b>3.8. Purificación de proteínas reconocidas por anticuerpos.....</b>	<b>92</b>
3.8.1. Unión de anticuerpos monoclonales a bolas de Sepharosa CNBr-activadas.....	92

3.8.2. Inmunoprecipitación.....	94
3.8.3. Elución con TFA.....	94
3.8.4. Gel SDS-PAGE.....	95
3.8.5. Tinción de plata.....	95
<b>3.9. Inmunoensayos enzimáticos.....</b>	<b>97</b>
3.9.1. ELISA para la determinación de citocinas.....	97
3.9.2. ELISA sobre células.....	98
<b>3.10. Clonaje del CD38 de rata.....</b>	<b>100</b>
3.10.1. Extracción de RNA.....	100
3.10.2. RT-PCR.....	101
3.10.3. PCR.....	102
3.10.3.1. geles de agarosa.....	103
3.10.4. Subclonaje en vector de expresión.....	104
3.10.4.1. Obtención del DNA plasmídico.....	105
3.10.4.2. Secuenciación de DNA (método de Sanger).....	106
<b>3.11. Transfección.....</b>	<b>107</b>
<b>3.12. RT-PCR semicuantitativa.....</b>	<b>108</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1. Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de la membrana de las células hepáticas estrelladas.....</b>	<b>111</b>
<b>4.2. Pre-caracterización.....</b>	<b>112</b>
4.2.1. Estudio inmunohistoquímico.....	112
4.2.2. Análisis mediante citometria de flujo.....	115
<b>4.3. Identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos seleccionados.....</b>	<b>116</b>
4.3.1. Inmunoprecipitación de los anticuerpos 5.520, 8.9 y 14.27.....	116
4.3.2. Identificación de la proteína reconocida por el anticuerpo 14.27...	117
4.3.3. Clonaje del CD38 de rata y transfección en células COS.....	119
<b>4.4. Caracterización de CD38.....</b>	<b>120</b>
4.4.1. Estudio de la expresión del CD38.....	120
4.4.1.1. Expresión y distribución de CD38 en el hígado.....	120

4.4.1.2. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas.....	123
4.4.2. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas y activadas “ <i>in vitro</i> ” .....	124
4.4.3. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas y activadas “ <i>in vivo</i> ” .....	124
<b>4.5. Caracterización bioquímica del anticuerpo CD38.14.27.....</b>	<b>125</b>
4.5.1. Inmunoprecipitación.....	125
4.5.2. Western-Blott.....	126
<b>4.6. Estudios Funcionales del CD38.....</b>	<b>127</b>
4.6.1. El anticuerpo monoclonal CD38.14.27 funciona como un anticuerpo agonista.....	127
4.6.2. El anticuerpo CD38.14.27 induce la secreción de IL-6 independientemente del estado de activación/diferenciación.....	129
4.6.3. El anticuerpo CD38.14.27 induce la expresión de moléculas de adhesión, dependientemente del estado de activación/diferenciación	130
4.6.4. El anticuerpo CD38.14.27 induce la contracción de las células hepáticas estrelladas.....	132
4.6.4.1. Campo de desplazamiento generado por la célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27.....	132
4.6.4.2. Campo de tracción generado por la célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27.....	133
4.6.4.3. Evolución temporal del campo de fuerzas generado.....	134
4.6.5. El anticuerpo CD38.14.27 induce un aumento de la resistencia intrahepática.....	136
4.6.6. Mecanismos implicados en la contracción celular mediados por la molécula CD38.....	137
4.6.6.1. La activación del CD38 induce la formación de fibras de Stress.....	137
4.6.6.1.1. Visualización de la fibras de actina.....	137
4.6.6.1.2. Cuantificación de la F-actina.....	138
4.6.6.2. La activación del CD38 induce la fosforilación de la cadena ligera de la miosina.....	138
4.6.7. Papel del CD38 en la regulación del recambio de la matriz extracelular.....	139

4.6.7.1. La activación con el CD38.14.27 induce una disminución de los niveles del mRNA del colágeno I.....	140
4.6.7.2. La activación con el CD38.14.27 induce una disminución de los niveles de mRNA de MMP-2.....	141
4.6.7.3. La activación con el CD38.14.27 induce un aumento de los niveles de mRNA de TIMP-I.....	141
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>163</b>
<b>8. ARTÍCULOS ORGINADOS DURANTE LA TESIS.....</b>	<b>187</b>

# 1. INTRODUCCIÓN





# 1. INTRODUCCIÓN

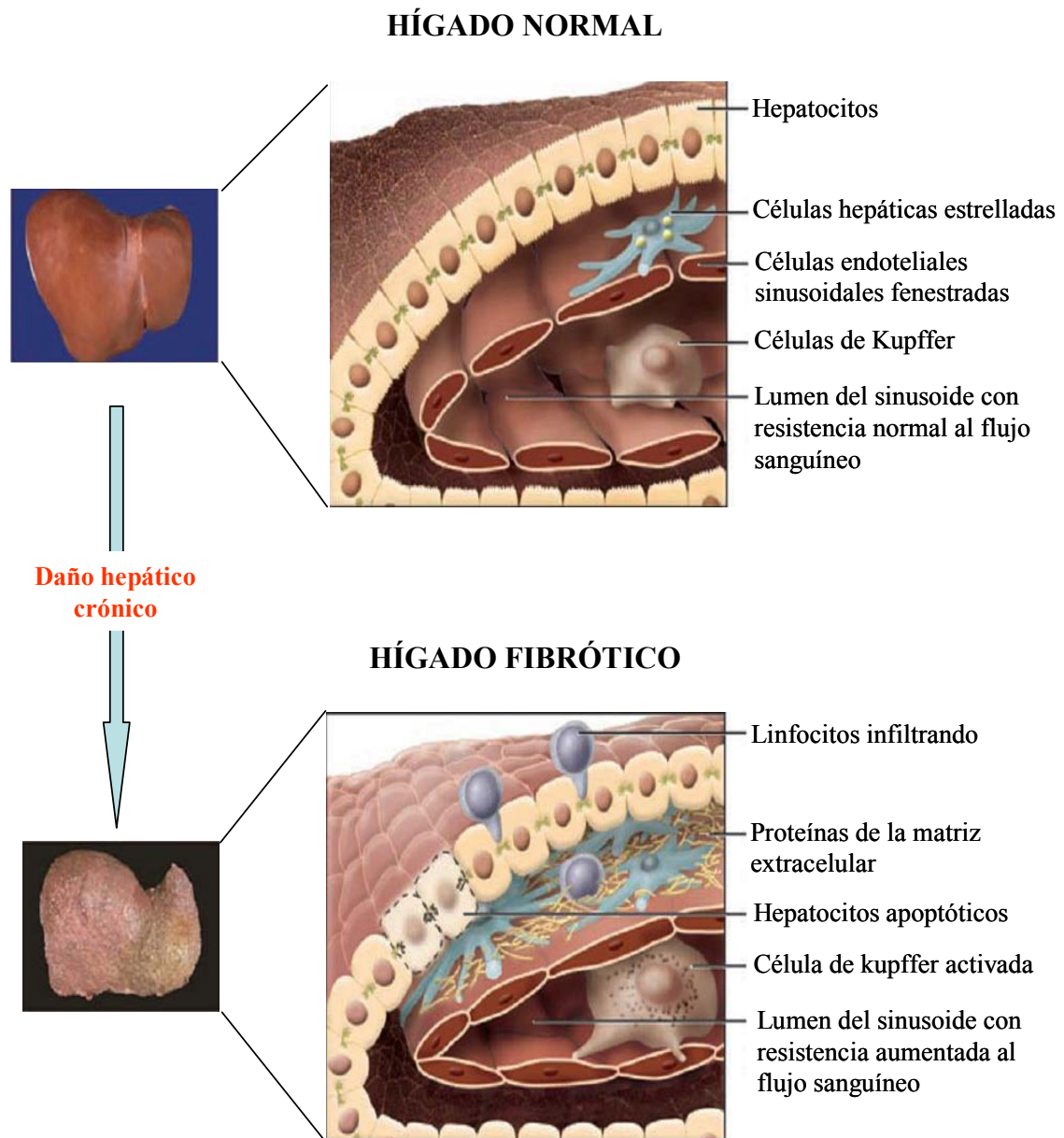
## 1.1. Introducción a las células hepáticas estrelladas

### 1.1.1. Localización y fenotipos

Las células hepáticas estrelladas representan entre 5-8% del total de las células hepáticas y un 13% del total de las células sinusoidales. Se encuentran situadas en el espacio de Disse (espacio virtual entre las células endoteliales y el parénquima) y presentan largas extensiones citoplasmáticas que rodean los sinusoides, característica que les permite regular el flujo por contracción [1, 2]. Algunas células hepáticas estrelladas se encuentran en contacto con terminaciones nerviosas, algunas de las cuales contienen neuropéptidos como la sustancia P, neuropeptido Y, somatostatina etc. [3].

En el **hígado normal**, presentan un fenotipo quiescente. Morfológicamente pueden ser identificadas por la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas que contienen vitamina A, un retículo endoplasmático rugoso (RER) poco desarrollado y un pequeño aparato de golgi. En el hígado normal funcionalmente estarían implicadas en: a) almacenamiento de retinol, b) regulación del recambio de la matriz extracelular, c) secreción de citocinas y factores de crecimiento [4] y d) control del diámetro de los sinusoides [3]

En situaciones de **lesión tisular** las células hepáticas estrelladas sufren un proceso de activación y se transforman adquiriendo un fenotipo tipo miofibroblasto, características propias de este linaje: una elevada capacidad proliferativa, sintética y contráctil. Los principales cambios morfológicos observados son la pérdida de gránulos de vitamina A, y la presencia de un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de golgi muy desarrollados. Cuando este daño hepático se convierte en crónico, estas células se perpetúan en este estado. En la **figura 1.1** se muestra esquemáticamente este cambio de fenotipo.



**Figura 1-1 Cambios en la arquitectura hepática.** En el hígado normal las células hepáticas estrelladas presentan un fenotipo quiescente, y se caracterizan por la presencia de vacuolas de gránulos de vitamina A en su citoplasma. En respuesta a un daño hepático o tras un cultivo prolongado las células hepáticas estrelladas se activan y adquieren un fenotipo tipo miofibroblasto, aumentando su capacidad proliferativa y sintética (secreción de ECM y citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas). (*Battaller and Brenner. The Journal of Clinical Investigation. 2005*)

## 1.2. Origen embrionario de las células estrelladas del hígado

El origen embrionario de estas células no está bien establecido y aún existe controversia sobre su origen. Basándose en la expresión de proteínas del citoesqueleto como la **alfa-actina** del músculo liso y filamentos intermedios de clase III como la **vimentina** y **desmina** se postula que podrían tener un origen mesenquimal. No obstante, las células hepáticas estrelladas expresen proteínas de origen neuronal como la **proteína glial fibrilar acídica** (GFAP), filamento intermedio de clase III utilizado como marcador específico de astrocitos [5], la **nestina**, filamento intermedio de clase IV utilizado como marcador de células madres neuronales (expresada solo en células hepáticas estrelladas activadas de ratas) [6], la **molécula de adhesión celular neuronal** (N-CAM) [7], la **synaptophysin** (SYN), proteína involucrada en la exocitosis de neurotransmisores [8], y **substancias neurotróficas** como factores de crecimiento neuronal (NGF), *brain-derived neurotrophin*, *neurotrophin* y sus **receptores**, la expresión de estas proteínas indicarían un posible origen neuronal. Sin embargo, tanto las sustancias neurotróficas como sus receptores han sido identificados en una variedad de células mesenquimales como los fibroblastos y miofibroblastos [9].

## 1.3. Implicación de las células hepáticas estrelladas en diferentes procesos fisiopatológicos

### 1.3.1. Fibrogénesis

La fibrosis hepática es un proceso común que ocurre tras un daño hepático crónico. Su estadio final e irreversible es la cirrosis [10, 11]. Agentes etiológicos como la ingestión crónica de alcohol, las infecciones virales (Hepatitis B y C), fármacos hepatotóxicos (p.ej. metotrexato) y ciertas enfermedades hepáticas genéticas (p.ej. hemocromatosis) causarían junto con una lesión celular a los hepatocitos el inicio de un proceso que concluiría en un desequilibrio entre los procesos de fibrólisis y fibrogénesis, a favor de éste último. El resultado es una excesiva acumulación de

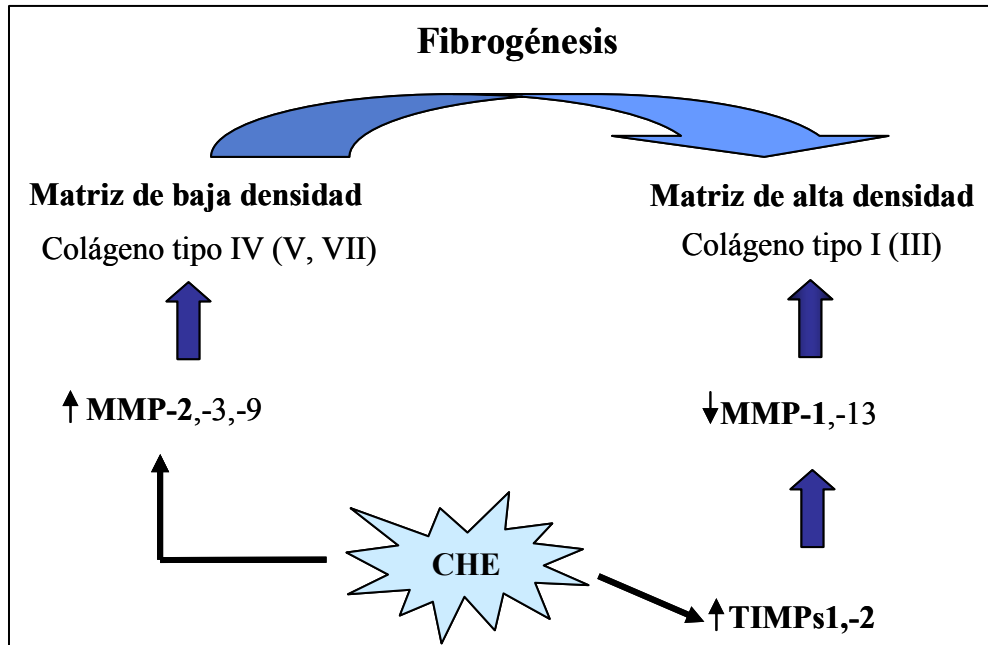
proteínas de la matriz extracelular (ECM) en el hígado. Esta excesiva acumulación de ECM daría lugar a importantes consecuencias fisiopatológicas en cuanto a su función y estructura

### **1.3.1.1. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso de fibrogénesis**

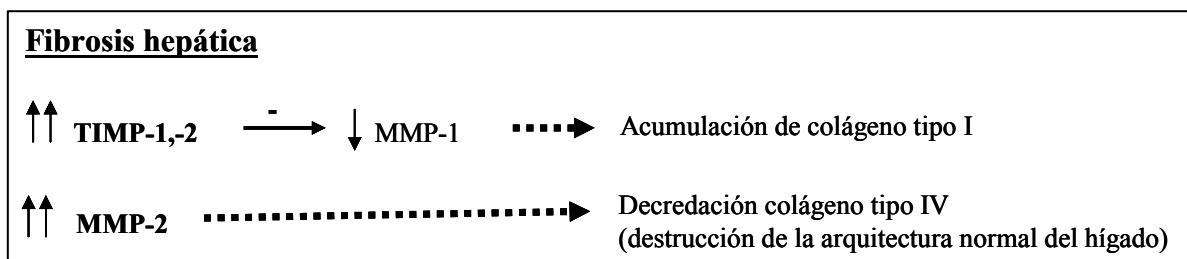
Las células hepáticas estrelladas juegan un papel principal en el desarrollo de la fibrosis hepática, al ser las principales productores de proteínas de matriz extracelular. En su fenotipo activado aumentan de forma drástica la síntesis de colágeno, principalmente tipo I y III que predomina sobre la producción de colágeno tipo IV ( $I > III \gg IV$ ) y de otros componentes de la ECM [12, 13].

A parte de los cambios **cuantitativos** respecto a la producción y acumulación de ECM observados durante el proceso de fibrogénesis también existen cambios **cuantitativos** en la composición de ECM. La matriz extracelular esta formada principalmente por colágeno tipo I, III, IV, V, VII, y por componentes no-colágeno [Glicoproteínas: (fibronectina, laminina, entactin, etc.) y Proteoglicanos sulfatados]. En el proceso de fibrogénesis la producción de ECM aumenta entre 3-5 veces, y existe un cambio en el tipo de ECM, se pasa de tener una matriz de baja densidad formada principalmente por colágeno tipo IV, V y VII a una matriz de alta densidad formada principalmente por colágeno tipo I, III. Este cambio cualitativo viene favorecido por el cambio en la actividad de las metaloproteinasas (MMP). Durante el proceso de fibrogénesis se ha observado una disminución de MMP-1 (colagenasa tipo I), y un aumento en la producción de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (responsables de la degradación de la matriz de baja densidad). Las células hepáticas estrelladas son la principal fuente de MMP-2 y MMP-3 [14-16] y las Kupffer de MMP-9 [17]. El depósito de ECM de alta densidad actúa como estímulo sobre las células hepáticas estrelladas para que produzcan más MMP-2 (retroalimentación positiva) [18, 19]. Las células hepáticas estrelladas a su vez aumentan la expresión de inhibidores de metaloproteinasas, el TIMP-1 y TIMP-2 que inhiben la actividad de las metaloproteinasas intersticiales (MMP-1), favoreciendo así este cambio cualitativo.

A



B



**Figura 1-2 Representación esquemática del cambio de matriz extracelular durante el proceso de fibrogenesis.** En la figura A se muestran las principales MMP y TIMP responsables de este cambio cualitativo. Las células hepáticas estrelladas son una fuente importante de MMP-2 y TIMP-1,-2 (remarcadas en negro). En la figura B, se muestran los principales efectos que conducen al establecimiento de la fibrosis hepática. (CHE: Célula hepática estrellada, MMP: Metaloproteinasa, TIMP: Inhibidor de metaloproteinasa).

El TGF- $\beta$ 1 es considerada la principal citocina fibrogénica. En animales TGF- $\beta$ 1 deficientes se observó que tras un daño hepático agudo la producción de colágeno tipo I era mucho menor que en los ratones *wild-type*, no obstante en ambos grupos las células hepáticas estrelladas presentaban el mismo estado de activación [20]. Por otro lado, animales transgénicos que sobreproducían la forma activa de TGF- $\beta$ 1 desarrollaban importantes lesiones fibróticas en el hígado y los riñones [21]. Los niveles de TGF- $\beta$ 1 se ha visto que están aumentados en modelos animales de fibrosis y en humanos. Existen varias fuentes de secreción de TGF- $\beta$ 1, sin embargo la expresión autocrina por parte de las células hepáticas estrelladas, parece ser la más importante [22].

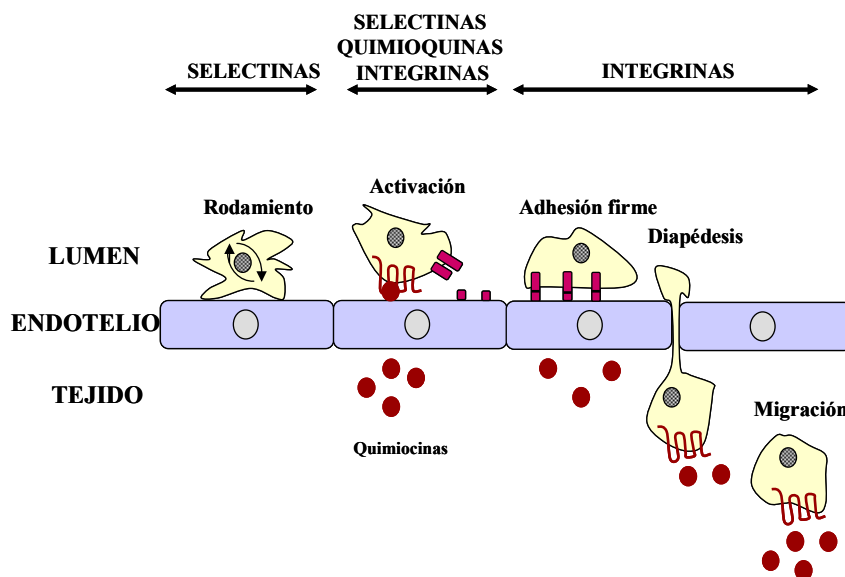
### **1.3.2. Inflamación**

Tras una lesión tisular el primer acontecimiento que tiene lugar es el reclutamiento de leucocitos con la finalidad de neutralizar el agente causante del daño y la eliminación del tejido necrótico. Esta primera fase estaría seguida por la proliferación y migración de células tipo miofibroblastos, que secretarían proteínas de la matriz extracelular. En la tercera etapa, las proteínas de la matriz extracelular serían eliminadas, las células parenquimales se regenerarían y de nuevo volveríamos a tener un tejido normal. Tras un daño tisular prolongado o cronicado, estas tres fases podrían ocurrir simultáneamente y de forma descoordinada, el resultado sería una inflamación crónica y una deposición permanente de proteínas de la matriz extracelular. Un claro ejemplo de la coordinación de estas tres etapas se daría en las hepatitis agudas, el hígado recobraría su arquitectura y función normal una vez el virus fuera eliminado. Sin embargo, en hepatitis víricas cronicadas o tras la ingesta abusiva de alcohol, las tres etapas las encontraríamos de manera simultánea y el resultado sería una constante presencia de inflamación, deposición de matriz extracelular y anormal regeneración hepática, el estadio final nos llevaría a una fibrosis seguida de una cirrosis.

#### **1.3.2.1. Moléculas de adhesión**

Las moléculas de adhesión son las responsables de la interacción que se establece entre las células del torrente sanguíneo y las células endoteliales, así como las

interacciones celulares entre leucocitos o entre leucocitos y otros tipos celulares (p.ej. Las células hepáticas estrelladas). Las tres principales familias de moléculas de adhesión son: la familia de las selectinas, la familia de las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas. La primera interacción de los leucocitos circulantes del torrente sanguíneo con el endotelio es lábil, permitiendo el rodamiento de éstos por la pared del endotelio, esta unión inicial es mediada por las selectinas, presentes en el endotelio (P-selectina y E-selectina) o en los leucocitos (L-selectina). Las quimiocinas son proteínas producidas en el foco de infección o daño tisular por diferentes tipos celulares (p.ej. leucocitos infiltrantes, células hepáticas estrelladas etc.), con capacidad de establecer un gradiente alrededor del foco inflamatorio. Estas quimiocinas pueden ser retenidas por componentes de la matriz extracelular o bien por la superficie del endotelio [23]. La interacción de los leucocitos con estas quimiocinas activa las integrinas de su superficie haciendo así posible la formación de una interacción fuerte y estable mediante la unión con miembros de la familia de las inmunoglobulinas presentes en el endotelio. Esta unión permite la adhesión de los leucocitos a la pared del vaso y su siguiente diapédesis.



**Figura 1-3 Representación esquemática del proceso de extravasación leucocitaria desde el torrente sanguíneo hasta el tejido inflamado.** Tanto las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio o los leucocitos como quimiocinas secretadas por células infiltrantes o residentes (Ej. Células hepáticas estrelladas) participan en este proceso. (Lalor and Adams. *Immunology and Cell Biology*. 2002. *Modificada*).

Así pues las interacciones producidas entre selectinas-carbohidratos, quimiocinas-receptores y integrinas-miembros de la familia de las inmunoglobulinas se produce de manera secuencial, y la especificidad del tipo de leucocitos que se reclutan en respuesta a un determinado estímulo, viene determinado por el patrón de moléculas de adhesión que se active y por el tipo de quimiocinas producidas.

### **1.3.2.2. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso inflamatorio**

Las células hepáticas estrelladas tienen la capacidad de modular el proceso inflamatorio mediante la producción de **mediadores solubles** (quimiocinas, factores de crecimiento hematopoyético, interleucinas etc.) y la expresión en su superficie de **moléculas de adhesión** (I-CAM, V-CAM y N-CAM). Las células hepáticas estrelladas se localizan en el espacio de Disse, localización óptima para interactuar tanto con los hepatocitos dañados como con los leucocitos que van transmigrando.

#### **1.3.2.2.1. Mediadores soluble**

La primera evidencia del posible papel inmunoregulador de las células hepáticas estrelladas fue reportada en 1992 cuando se demostró que las células hepáticas estrelladas eran capaces de secretar al medio el factor de crecimiento hematopoyético M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) tras su activación con PDFG (*platelet derived growth factor*), posteriores estudios demostraron la habilidad de las células hepáticas estrelladas de secretar también otros factores hematopoyéticos como el SCF (*stem cell factor*), importantes quimiocinas como MCP-1, MIP-2 y CINC, quimioattractantes como el PAF (*platelet-activating factor*) y interleucinas como la IL-6 y IL-10 [24-27].

#### **- Quimiocinas**

Las quimiocinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular, con la habilidad de regular el reclutamiento y la activación de leucocitos con una relativa especificidad por determinadas subpoblaciones leucocitarias. Basándose en la



localización de residuos conservados de cisteína, se han indentificado 4 clases de quimiocinas, nombradas de la siguiente manera: CXC, CC, C y CX3C [28].

La quimiocina **MCP-1** (*monocyte chemotactic protein-1*) es un miembro de la clase CC de quimiocinas, y fue la primera en observarse que podía ser secretada por células hepáticas estrelladas. La MCP-1 es una quimiocina con la habilidad de reclutar mayoritariamente monocitos, pero también linfocitos T activados, basófilos y células dendríticas. Los niveles de MCP-1 se han visto incrementados en situaciones de daño hepático, tanto en pacientes con hepatitis vírica crónica como en modelos experimentales de daño hepático [26, 29-31]. En ratas cirróticas por CCl<sub>4</sub>, después del aislamiento de los diferentes tipos celulares, se vio que las células hepáticas estrelladas eran las principales productoras de MCP-1 [29, 32]. La expresión de MCP-1 puede ser inducida por citocinas pro-inflamatorias (ej. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), y el grado de inducción depende del estado de activación de las células hepáticas estrelladas. Por ejemplo, en células hepáticas estrelladas es un estado quiescente la expresión de MCP-1 puede ser inducida por TNF- $\alpha$  pero no por LPS, sin embargo, en células hepáticas estrelladas activadas, el LPS también induce la expresión de MCP-1, y los efectos del TNF- $\alpha$  son mucho mayores [33].

La quimiocina **CINC** (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) (homóloga de la IL-8 humana) y **MIP-2** (*macrophage inflammatory protein*) (homóloga de GRO- $\alpha$  humana), son miembros de la familia CXC de quimiocinas. Ambas quimiocinas son potentes quimioattractantes de neutrófilos. En humanos se ha visto, que los niveles de IL-8 y GRO- $\alpha$  están altamente aumentados tanto en el suero como en homogenizados de hígado de pacientes con hepatitis de etiología vírica, existiendo una correlación entre el grado de severidad de la enfermedad y el grado de infiltración neutrofílica [34, 35]. En modelos animales, tras la infección con adenovirus para que sobreexpresaran CINC, se observó el mismo efecto, un aumento de la infiltración neutrofílica en el hígado [36]. Las células hepáticas estrelladas son una fuente importante de estas dos citocinas, pero otros tipos celulares son capaces también de producir MIP-2 y IL-8 (ej. hepatocitos y Kupffer) [37, 38].

Al igual que pasa con la quimiocina MCP-1 la expresión de MIP-2 y CINC es dependiente del estado de activación de la célula. La inducción de la expresión es mayor en células hepáticas estrelladas activadas.

### **- Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento hematopoyético como el M-SCF (*macrophage colony-stimulating factor*) y el SCF (*stem cell factor*) pueden ser secretados por células hepáticas estrelladas. Ambas citocinas están implicadas en la proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos.

El factor de crecimiento **M-CSF** esta involucrado en la proliferación, diferenciación, supervivencia y activación de células de la serie mieloide. En un cultivo de células hepáticas de ratón se demostró una expresión constitutiva de M-CSF y un incremento tras la activación con mitógenos como el PDGF (*platelet derived growth factor*) o el FGF (*fibroblast growth factor*) [25]. La expresión constitutiva de M-CSF podría tener importancia en el mantenimiento adecuado de la población de células de Kupffer en el hígado.

En procesos inflamatorios la secreción de estas dos citocinas ayuda al mantenimiento de la producción extramedular y a la supervivencia de las células involucradas en el proceso inflamatorio.

### **- Interleucina 6**

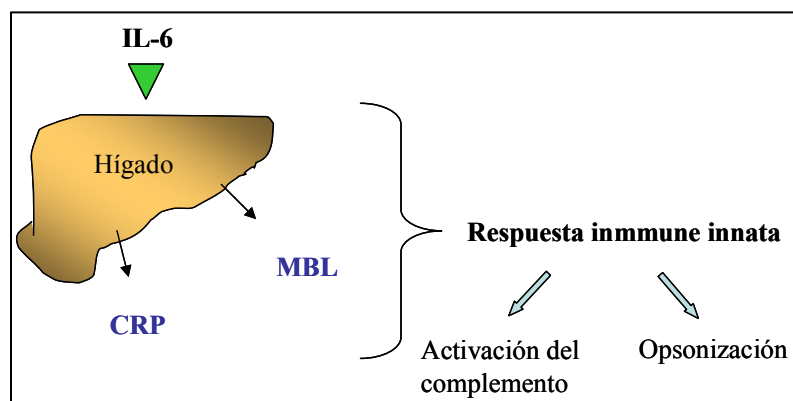
La IL-6 es una importante citocina que juega un papel clave en el proceso de inflamación y fibrogénesis. En el hígado tanto la Kupffer como las células hepáticas estrelladas son capaces de secretar IL-6 [24, 39, 40].

Uno de los efectos más importantes de la IL-6 es la iniciación de la denominada respuesta de fase aguda. Ésta conlleva un cambio en las proteínas secretadas por el hígado al plasma sanguíneo y resulta de la acción de la IL-6 sobre los hepatocitos. En la respuesta de fase aguda, los niveles de algunas proteínas plasmáticas descienden, mientras que los de otras aumentan de manera acentuada. Las proteínas cuya síntesis es

inducida se denominan proteínas de fase aguda. Las proteínas de fase aguda regulan la respuesta innata mediante la activación del complemento y la opsonización [41].

Una de estas proteínas, **la proteína C-reactiva**, es un miembro de la familia de las pentraxinas, denominadas así porque están formadas por cinco subunidades idénticas la proteína C-reactiva se une a la porción fosforilcolina de ciertos lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana y fúngica [41, 42]. La fosforilcolina se encuentra en los fosfolípidos de la membrana celular de los mamíferos, pero bajo una forma incapaz de reaccionar con la proteína C-reactiva. Cuando la proteína C-reactiva se une a una bacteria, no es capaz solamente de opsonizarla, sino también puede activar la cascada del complemento uniéndose a C1q, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento .

La segunda proteína de fase aguda de interés es la, **lectina fijadora de manano** (*mannan-binding lectin* o MBL). La MBL es capaz de iniciar la activación del complemento mediante la unión a la superficie de los patógenos, de una manera homóloga a la vía clásica [43].



**Figura 1-4 Representación esquemática del mecanismo de acción de la IL-6.** La IL-6 estimula a los hepatocitos a secretar proteínas de fase aguda. Mediante la activación del complemento y la opsonización las proteínas de fase aguda regulan la respuesta inmune innata.

Por otro lado, se ha visto que la IL-6, es capaz de modular el proceso de fibrogénesis [44], aunque existe una gran controversia sobre el papel que juega. Distintos trabajos realizados con animales IL-6 deficientes reportan resultados contradictorios [45, 46].

### 1.3.2.2.2. Moléculas de adhesión expresadas por las células hepáticas estrelladas.

Además, también se vio que las células hepáticas estrelladas eran capaces de expresar en su superficie moléculas de la familia de las inmunoglobulinas. Hasta el momento esta descrito que las células hepáticas estrelladas expresan **I-CAM-1**, **V-CAM-1** y **N-CAM** [7, 47, 48].

- ICAM-1 se une a los receptores de integrinas LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2) y Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2), localizados en linfocitos, monocitos y neutrófilos. Estudios “*in vitro*” han demostrado un aumento de la expresión de ICAM-1 en respuesta a TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$  y productos de estrés oxidativo como la proteína malondialdehydo [47, 48]. En experimentos “*in vivo*” también se observó una mayor expresión de ICAM-1 en células hepáticas estrelladas aisladas de ratas cirróticas por ligadura del colédoco [48].
- VCAM-1 se une receptores de integrinas como el VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1) y el LPAM-1 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7) expresados en diferentes subpoblaciones leucocitarias.
- N-CAM (CD56) interacciona de forma homifilica con otras células que expresen también N-CAM y de forma heterofilica puede interaccionar con proteínas de la matriz extracelular miembros de la familia de los proteoglicanos (ej. *Heparan sulfato, phosphacan y neurocan*) [49-51].

En células en cultivo se ha visto que I-CAM y V-CAM se regulan de manera similar, mientras N-CAM se regula de manera diferente. I-CAM y V-CAM se expresan en estadios tempranos de activación, mientras que la expresión de N-CAM es más tardía [47].

Citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  inducen la expresión de I-CAM y V-CAM, y reducen los niveles de mRNA para N-CAM. En cambio, factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1, PDGF o el EGF inducen la expresión de N-CAM y disminuyen la expresión de I-CAM y V-CAM [47]. Así pues, citocinas inflamatorias secretadas por células de Kupffer y leucocitos infiltrados en la fase inicial de la respuesta inflamatoria tras un daño hepático serían las responsables del aumento de la expresión de I-CAM y V-CAM, por otro lado el TGF- $\beta$  secretado más tardíamente

disminuiría el reclutamiento de leucocitos mediante la reducción de la expresión de I-CAM y V-CAM.

<b>A. MEDIADORES SOLUBLES</b>	<b>EFEECTO INFLAMATORIO</b>
<i>Quimiocinas</i>	
MCP-1	Quimiotaxis de leucocitos (mononucleares)
MIP-2	Quimiotaxis de leucocitos (neutrófilos)
CINC	Quimiotaxis de leucocitos (neutrófilos)
<i>Quimioattractantes</i>	
Fractalkine	
Osteopontin	Quimiotaxis de células de kupffer y macrófagos
PAF	Quimiotaxis de leucocitos (neutrófilos)
Complemento (ej.C5a)	Quimiotaxis de neutrófilos y monocitos
Factores hematopoyéticos	
M-CSF	Maduración de macrófagos
SCF	
<i>Citocinas</i>	
IL-10	Inhibe la inflamación y la fibrogénesis
IL-6	Síntesis de proteínas de fase aguda. Inmunidad innata
<b>B. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</b>	<b>EFEECTO INFLAMATORIO</b>
<i>ICAM-1</i>	Adhesión de células que expresan integrinas $\beta 2$
<i>VCAM-1</i>	Adhesión de células que expresan integrinas $\beta 4$
<i>N-CAM</i>	Adhesión de células que expresan CD56

**Tabla 1-1 Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso inflamatorio.** Las células hepáticas estrelladas regulan la respuesta inmune mediante la secreción de mediadores solubles y la expresión en su membrana de moléculas de adhesión. (Maher. *Seminars in Liver Disease*. 2001. *Modificada*)

Debido a la estratégica localización de estas células en el espacio de Disse, la presencia de estas moléculas en su superficie facilitaría la migración de los leucocitos por el parénquima una vez han infiltrado el hígado.

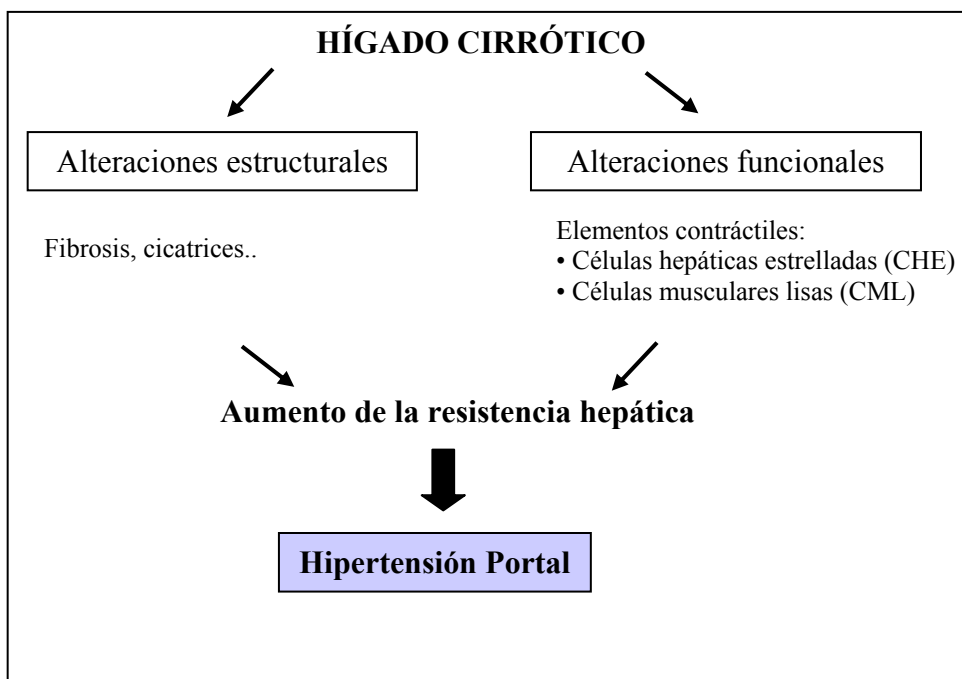
### 1.3.3. Contracción

La hipertensión portal es una de las complicaciones más graves y frecuentes de las enfermedades hepáticas crónicas: cirrosis de cualquier etiología, hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular, hepatitis alcohólica. Se caracteriza por un aumento patológico del gradiente de presión portal (gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava, que representa la presión de perfusión hepática portal) [32, 52]. Este aumento del gradiente de presión induce la formación de circulación colateral portosistémica, por la que parte de la sangre portal es derivada a la circulación general sin pasar por el hígado. Estos dos trastornos, el aumento del gradiente de presión portal y la derivación portosistémica, determinan la mayor parte de las complicaciones de la hipertensión portal.

Las complicaciones que con mayor frecuencia se asocian a la hipertensión portal son: hemorragia digestiva por rotura de varices esofagogástricas y por gastropatía hipertensiva, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática, hipoxemia arterial, trastornos en el metabolismo de los fármacos y las sustancias endógenas normalmente depuradas por el hígado, bacteriemia e hiperesplenismo. Estas complicaciones representan la primera causa de muerte y de trasplante hepático en estos pacientes [52].

La presión portal (PP) se puede cuantificar de forma indirecta según la ley de Ohm's ( $AP=Q \times R$ ), donde el gradiente de presión portal es proporcional al flujo que entra (Q) y a la resistencia hepática (R). En un hígado normal, pequeños cambios en la resistencia hepática viene contrarestandos con cambios en la entrada del flujo sanguíneo, manteniendo así los valores de presión portal dentro de los límites de normalidad. En un hígado cirrótico, en cambio la resistencia hepática esta aumentada y el flujo también. El aumento de ambos factores hace aumentar los valores de PP por encima de sus límites de normalidad [32, 52].

El aumento de la resistencia vascular (*variable R*) constituye el fenómeno fisiopatológico primario y más importante de la hipertensión portal. El aumento de la PP debido a un aumento del flujo (*variable Q*) se presentaría en un estadio más avanzado agravando la situación. Este aumento del flujo sanguíneo esta asociado al síndrome circulatorio hiperdinámico que se caracteriza por una disminución de la presión arterial y de las resistencias periféricas, aumento del gasto cardíaco y del flujo sanguíneo y vasodilatación esplácnica y sistémica [53, 54].



**Figura 1-5 .Representación esquemática de las alteraciones estructurales y funcionales causantes del aumento de la resistencia intra-hepática en la cirrosis.** Tanto alteraciones estructurales como funcionales contribuyen al aumento de la resistencia hepática y al establecimiento de la hipertensión portal.

### 1.3.3.1. Alteraciones en la resistencia vascular.

El aumento de la resistencia en la cirrosis es debido a la suma de dos componentes diferentes uno de tipo estructural, relativamente fijo e irreversible y otro de tipo dinámico, modulable por sustancias vasoactivas.

En la cirrosis se produce una notable distorsión de la anatomía del hígado debido a la existencia de fibrosis, y formación de nódulos de regeneración que presionan las venas portales y centrales y a la capilarización de los sinusoides (pérdida de fenestraciones endoteliales y deposición de colágeno en el espacio de Disse). Estas alteraciones estructurales confieren un obstáculo mecánico del lecho vascular portal haciendo aumentar la resistencia vascular.

Aunque el componente estructural es el factor más determinante del aumento de la resistencia hepática, existirían otros de tipo no fijo sino variable que contribuirían de forma significativa al aumento de dicha resistencia, como el aumento de la contracción de los elementos contráctiles, tanto del territorio sinusoidal (p.ej. las células hepáticas estrelladas) como del territorio extrasinusoidal (p.ej. las células musculares lisas) [55, 56]. Se ha visto que la resistencia vascular intrahepática puede llegar a reducirse entre un 20-30 % con la administración de diferentes fármacos [55, 57].

### 1.3.3.2. Contribución de las células hepáticas estrelladas al proceso contráctil

Debido a similitudes tanto estructurales como fisiológicas de las células hepáticas estrelladas con los pericitos presentes en otros órganos, se cree que las células hepáticas estrelladas podrían actuar como pericitos especializados en el hígado (los pericitos son células de origen mesenquimal que rodean parcialmente las células endoteliales de los vasos pequeños y con la capacidad de regular el tono vascular de estos vasos) [58]. Las células hepáticas estrelladas presentan largas prolongaciones que rodean el endotelio sinusoidal, característica que les permitiría regular el flujo por contracción. Además, se ha visto que las células hepáticas estrelladas tienen capacidad de contraerse o relajarse en respuesta a diferentes sustancias vasoactivas (**ver tabla 1-2**). Como resultado del daño hepático, estas células sufren transformación fenotípica en la que adquieren forma de huso con numerosos haces paralelos de fibra de actina adyacentes a la membrana



celular, convirtiéndose en miofibroblastos semejantes a los localizados en el tejido cicatrizal.

Agent	Effect	Proposed mechanism
Endothelin-1	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Thrombin	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Angiotensin II	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Vasopressin	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Adenosine	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ?
Substance P	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Leukotriene D <sub>4</sub>	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
PGF <sub>2</sub> /thromboxane	Contraction	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Lysophosphatidic acid	Contraction	Rho kinase
NO	Relaxation	cGMP
ANP	Relaxation	cGMP/[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Adrenomedullin	Relaxation	cAMP
Somatostatin	Relaxation	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /rho kinase?
Agents increasing cAMP/cGMP	Relaxation	cAMP/cGMP
PGI <sub>2</sub> /PGE <sub>2</sub>	Relaxation	cAMP
Y-27632 (rho kinase inhibitor)	Relaxation	Rho kinase

PG, prostaglandin; NO, nitric oxide; ANP, atrial natriuretic peptide.

**Tabla 1-2. Agentes vasoactivos con capacidad de contraer o relajar las células hepáticas estrelladas.**  
(Reynaert and Geerts, *Gut*, 2002.)

Así pues, las células hepáticas estrelladas juegan un papel principal en el desarrollo de la fibrosis hepática, (componente fijo de la resistencia hepática) que es la causa principal de la hipertensión, pero también jugaría un papel en el componente variable debido a su capacidad contráctil.

### 1.3.3.3. Contractibilidad de las células hepáticas estrelladas: vías de señalización.

Existen numerosas evidencias experimentales de la respuesta contráctil de las células hepáticas estrelladas a sustancias vasoactivas como: tromboxano A<sub>2</sub>, endotelina-1, trombina, angiotensina II y sustancia P, así como relajación en respuesta a PGI<sub>2</sub>, AMPc y PGE<sub>2</sub> [4].

Existen dos vías principales de señalización que regulan la contracción tanto en células musculares como no-musculares:

- Vía movilización de Calcio, que es la vía principal en células musculares lisas
- Vía Rho, que posee mayor importancia en células no-musculares (ej fibroblastos)

Hasta el momento no se sabe cual de las dos vías predomina en las células hepáticas estrelladas, se cree que ambas contribuyen, aunque a medida que las células hepáticas estrelladas se activan parece ser que es la vía por movilización de calcio es la que contribuye en mayor grado [59].

### 1.3.3.3.1. Por movilización de Calcio

Múltiples mecanismos han sido descritos para la regulación homeostática del calcio. Tras una estimulación agonista el aumento de los niveles intracelulares de calcio, puede ser causado por la entrada de calcio del **exterior** de la célula a través de canales voltaje dependientes o por la salida de calcio de **compartimentos intracelulares** como el retículo endoplasmático (RE).

#### 1.3.3.3.1.1. Liberación de calcio de compartimentos intracelulares

El calcio puede salir del RE a través de la activación de canales presentes en su membrana, como los receptores inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>R) y los receptores Ryanodin (RyR) [60, 61].

#### Activación receptores IP<sub>3</sub>

- La activación de receptores unidos a proteínas G (como los receptores muscarínicos, prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  o endotelina) activan a la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC), el resultado es la hidrólisis de su sustrato el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) presente en la membrana y la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Dos metabolitos biológicamente activos. El metabolito DAG activa la protein kinasa C (PKC) y el metabolito IP<sub>3</sub> induce la liberación de calcio de RE vía los receptores inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>R).

### Activación receptores RyR

- En células musculares lisas se ha demostrado que el metabolito (ciclicadenosindifosforibosa) cADPR induce la salida de calcio del retículo endoplasmático a través de los receptores Ryanodín [62-64]. La formación de cADPR a partir de su sustrato NAD es catalizado por la ciclasa cADPR. En células hepáticas estrelladas este mecanismo no ha sido previamente descrito.

#### 1.3.3.3.1.2. Entrada de calcio del exterior de la célula

### Activación canales voltaje dependientes

- Los canales voltaje dependientes tipo L (VOCC), median la entrada de calcio al interior de la célula regulando procesos de contracción en diferentes tipos celulares. En un estudio realizado tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, no se detectó actividad ni presencia de estos canales en células hepáticas estrelladas quiescentes. No obstante, tras la activación “*in vitro*” (cultivo prolongado durante 14 días de las células hepáticas estrelladas) e “*in vivo*” (células hepáticas estrelladas aisladas de ratas cirróticas), se demostró el paso de corriente a través de estos canales y por RT-PCR y Northern-Blott se detectó presencia de mRNA que codificaba para VOCC tipo L. Activando los canales VOCC tipo L presentes en células hepáticas estrelladas activadas con KCL el resultado era un aumento de los niveles de calcio seguida de la contracción de las células hepáticas estrelladas [65].

- Los canales BK(Ca) (*the large-conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel*) regulan el potencial de membrana y su repolarización. Están formados por la unidad formadora del poro ( $\alpha$ , codificada por genes *slo*) y por una unidad reguladora ( $\beta$ ). Se activaban en respuesta a cambios de potencial de membrana y a cambios en los niveles de  $[Ca^{2+}]_{int}$  bien por la entrada de calcio a través de los canales voltaje dependientes o por la salida de calcio del RE a través de los receptores Ryanodín (RyR) [66, 67].

Se ha descrito la presencia de estos canales en células hepáticas estrelladas activadas, donde se vio que el bloqueo de estos canales hacía aumentar los

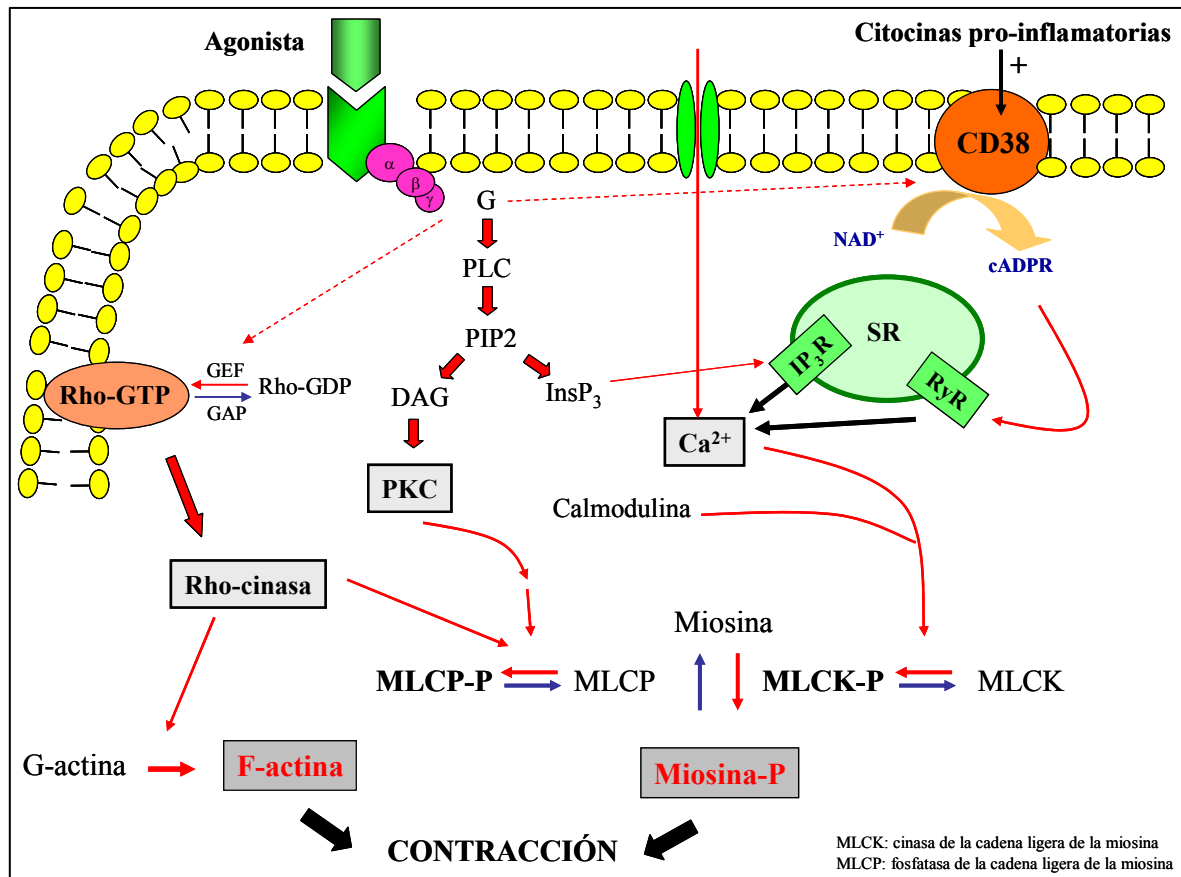
niveles de  $[Ca^{2+}]_{int}$  en respuesta a la endotelina, aumentando de este modo la capacidad contráctil de las células hepáticas estrelladas activadas [68]. Este efecto bloqueando los canales BK ya se había visto que hacía aumentar la contractibilidad de otros tipos celulares.

Como resultado de esta movilización, el calcio intracelular se une a la calmodulina (CaM), y el complejo  $Ca^{2+}/CaM$  activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que fosforila la unidad reguladora de la cadena ligera de la miosina ( $MLC_{20}$ ). El resultado es un cambio conformacional permitiendo que la miosina se deslice sobre la actina y la célula se contraiga [69].

#### 1.3.3.3.2. Vía RHO

Rho, es una pequeña GTPase (proteína bescambiadora de GTP), capaz de activar a la cinasa Rho (ROK) (una serina/treonin cinasa). ROK, es capaz de fosforilar a la fosfatasa MLCP e inactivarla. Hasta el momento, 20 proteínas Rho han sido descritas en humanos y clasificadas en 5 familias: Rho-like, Rac-like, cdc42-like, Rnd and RhoBTB. Los 3 miembros de la familia Rho-like (RhoA, RhoB, y RhoC) contribuyen en el proceso de formación de fibras de stress y contracción [70]. La proteína Rho, se activa cuando esta unida a GTP e inactiva cuando esta unida a GDP. Así pues, las proteínas GEFs (*guanin nucleotide exchange factors*) activaran a Rho intercambiando GDP por GTP y las proteínas GAPs (*GTPase-activating protein*) la inactivan cambiando GTP por GDP.

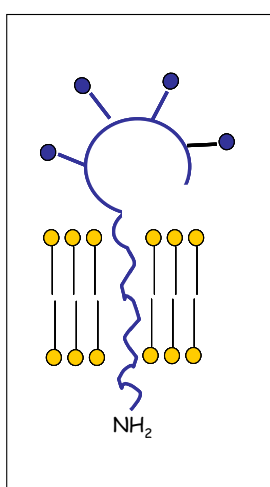
Existen dos isoformas de ROK:  $ROK\alpha$  y  $ROK\beta$ . La unión de Rho-GTP a ROK provoca un cambio conformacional en la cinasa, el resultado es la activación por autofosforilación [71]. ROK puede inhibir directamente la fosfatasa MLCP fosforilándola o indirectamente fosforilando la proteína CPI-17 (*C kinasa-potentiated phosphatasa inhibitor*), la cual entonces fosforila e inhibe la fosfatasa MLCP [72]. CPI-17, también puede ser fosforilada por la proteína cinasa C (PKC) [73].



**Figura 1-5 Representación esquemática de la principales vías intracelulares de contracción en células hepáticas estrelladas:** En rojo están marcadas la vías que inducen contracción y en azul la vías que inhiben la contracción. PLC, fosfolipasa C; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; InsP3, inositol 1,4,5-trifosfato; IP3R, receptor del inositol 1,4,5-trifosfato, RyR, receptor ryanodin; NAD, nicotinic acid adenosin, cADPR, ciclic adenosin di-fosfatoribosa; GEF, guanine nucleotide exchange factors; GAP, GTPase-activating protein, MLCK, cinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; G-actina; actina globular; F-actina; actina fibrilar. (Somlyo and Somlyo. *Journal of Physiology*. 2000. Modificada).

## 1.4. Introducción a la molécula de membrana CD38

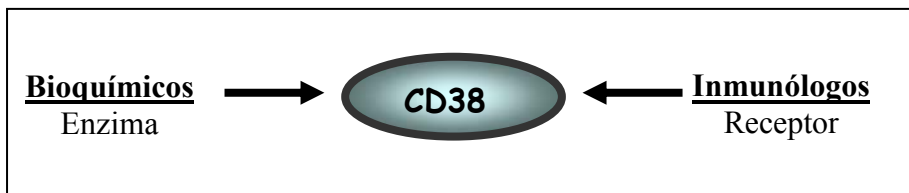
El CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II de unos 45kDa. Consta de una parte extracelular (257 aminoácidos), una región transmembrana (23 aminoácidos) y una corta cola citoplasmática (20 aminoácidos). Alrededor del 25% del peso de la molécula se lo confieren los azúcares presentes en la región extracelular [74, 75].



**Figura 1-6 Representación esquemática del CD38.** El CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II. Consta de una parte extracelular, una región transmembrana y una corta cola citoplasmática. (Deaglio and malavasi, *Leukemia Research*, 2001. Modificada.)

Originalmente fue descrita en células del sistema hematopoyético. El primer trabajo publicado sobre el CD38 data del 1980 donde se describió por primera vez el CD38 como un antígeno de diferenciación de linfocitos T [68]. Posteriormente, también se detectó la presencia del CD38 en otras células linfoides y mieloides como los linfocitos B, las células natural killer (NK) y los monocitos. El patrón de expresión en todas ellas se parecía. Había una expresión del CD38 en estadios tempranos, su expresión se perdía o disminuía durante la maduración y se volvía a expresar durante la activación [76]. En 1990 se clonó el cDNA y gracias a la aparición de anticuerpos anti-CD38 se empezaron a realizar estudios estructurales y funcionales de la molécula [77-79]. Un descubrimiento importante que llevo aún mejor conocimiento de esta molécula se dio en 1992 cuando se observó que existía una similitud estructural (similitud en la secuencia aminoacídica) con una adenosin diphosphate ribose (ADPR) ciclasa aislada del molusco, *Aplasya californica* [80]. Esta observación fue importante, ya que esta ciclasa era capaz de producir el metabolito cADPR (*cyclic adenosin diphosphate*

*ribose*), un potente segundo mensajero para la liberación de calcio. Un año más tarde se demostró que también el CD38 era capaz de catalizar la producción del metabolito cADPR [81-84]. Esta nueva función enzimática del CD38 descrita, llamo la atención de los bioquímicos, y abrió una nueva perspectiva de la molécula a los inmunólogos.



**Figura 1-7 Representación esquemática de las dos funciones principales del CD38.**

## 1.5. Funciones del CD38

El CD38 presenta dos funciones claramente diferentes e independientes entre ellas. Es un receptor y a la vez un ectoenzima. Como receptor esta involucrado en la transducción de señales al interior de la célula y en la adhesión de leucocitos al endotelio y como enzima cataliza la producción de metabolitos que inducen movilización de calcio.

### 1.5.1. Receptor:

#### 1.5.1.1. Transductor de señales:

El CD38 es capaz de transducir señales dentro de la células tras la unión con su contra-receptor o tras el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales agonistas. El efecto que causa es diferente según el tipo celular y el microambiente. En linfocitos T, B y NK parece ser que transduce señales de activación, ya que induce la producción y secreción de citocinas [85] e inhibe la apoptosis de las células del centro germinal; en cambio, en células B precursoras humanas de la medula ósea el CD38 inhibe la proliferación e induce la apoptosis [86].

El CD38, presenta un corta cola citoplasmática sin posibles sitios de fosforilación, eso hace que para translucir señales al interior de la célula tras su activación tenga que

asociarse tanto física como funcionalmente a diferentes complejo según el tipo celular. En linfocitos T el CD38 se asocia al complejo TCR/CD3 para transducir señales, en linfocitos B al CD19 y en NK al CD16 [79, 87-90].

CD38 - CD3 en LT
CD38 - CD19 en LB
CD38 - CD16 en NK

**Tabla 1-3 Asociación de CD38 a los principales complejos de transducción de señales de LT, LB y NK.**

### 1.5.1.2. Molécula de adhesión:

El CD38 también se ha visto que actúa como molécula de adhesión mediando interacciones célula-célula. En el modelo HUVEC/linfocitos es donde mejor se ha caracterizado esta interacción. Se trata de una interacción débil tipo lectina. En 1998 el grupo de Malavasi propuso el CD31 como ligando del CD38 [91].

### 1.5.2. Enzima:

El CD38 es un enzima extracelular o ectoenzima, similar a otros marcadores linfocitarios como el CD26, CD39 y CD73 [92]. La parte catalítica se encuentra en el exterior de la célula, eso quiere decir que su sustrato también ha de encontrarse en el exterior celular. El sustrato del CD38 es el NAD(P)<sup>+</sup>, un metabolito que normalmente se localiza en el interior de la célula y en muy bajas concentraciones en el medio extracelular, pero en sitios de necrosis celular y daño tisular aumenta la concentración extracelular de NAD<sup>+</sup> [93, 94]. Así pues, en condiciones homeostáticas normales, una mínima cantidad de sustrato es alcanzable para el CD38, limitando su actividad catalítica. Sin embargo, cerca de un foco inflamatorio o infeccioso, aumenta la concentración de NAD a niveles suficientes para ser utilizado por el CD38.

El CD38 puede catalizar la producción de diferente productos a partir de NAD(P)<sup>+</sup>, como los metabolitos: Nicotamida, NAADP (nicotinic acid-adenine dinucleotide



phosphate), ADPR y cADPR [81, 95, 96]. Los tres últimos se ha visto que tienen capacidad de regular la movilización de calcio en células [95, 97, 98].

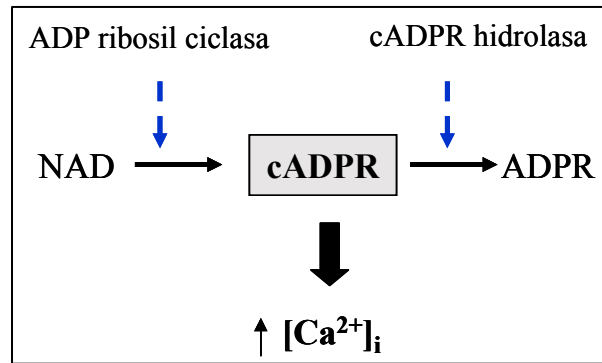


Figura 1-8 Representación esquemática de la actividad catalítica del CD38.

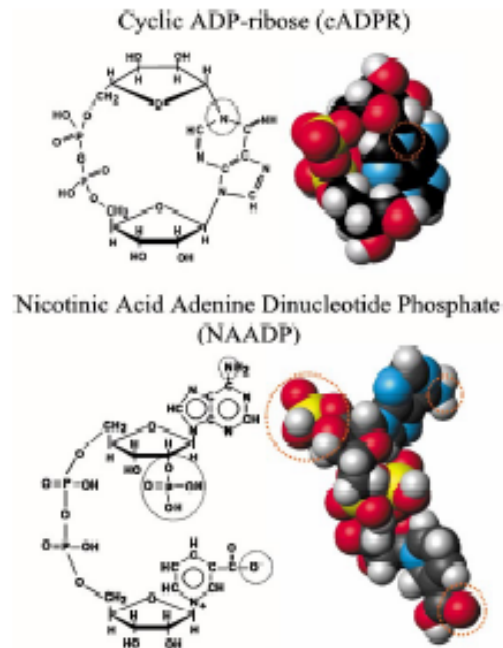


Figura 1-9 Representación esquemática estructural de los metabolitos cADPR y NAADP. (Hon Cheung Lee. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001)

## 1.6. Expresión del CD38

### 1.6.1. Células del sistema hematopoyético:

En humanos, las células de la serie linfoide por lo general presentan el mismo patrón de expresión. Expresión del CD38 en estadios tempranos de maduración, perdida durante la maduración y reexpresión con la activación. En linfocitos T aproximadamente el 80% de los timocitos expresan CD38, la mayoría de los linfocitos T circulantes son CD38 negativo y gran parte de los linfocitos T residentes expresan de nuevo CD38 [78, 99]. En linfocitos B se ha visto que el CD38 se expresa en células pre-B localizadas en la medula ósea y en células plasmáticas [100].

En cambio el patrón de expresión varia en las células de la serie mieloide. Los monocitos circulantes expresan CD38 y cuando estos se diferencian a macrófagos disminuyen de forma drástica su expresión [101].

En ratón existen grandes diferencias respecto a la distribución descrita en humanos. Por ejemplo, la mayoría de las células pre-B localizadas en la medula ósea no expresan CD38, en cambio linfocitos B nativos aislados del bazo expresan altos niveles de CD38 [102]. Otra gran diferencia la encontramos en las células de la serie mieloide, los monocitos circulante no *primados* y los precursores mieloides de la medula ósea expresan niveles muy bajos de CD38 en cambio la mayoría de macrófagos tiene una expresión elevada. En linfocitos T, en cambio, el patrón de expresión es similar al observado en humanos.

### 1.6.2. Otros tejidos

Aunque originalmente el CD38 fue descrito en células del sistema hematopoyético, en los últimos años se ha demostrado la presencia del CD38 en otros tipos celulares. En un estudio realizado en rata niveles de mRNA para CD38 fueron detectados en hígado, corazón, tiroides, intestino, cerebro y páncreas [103]. En estudios realizados en humanos la expresión en otros tipos celulares ha sido mejor caracterizada. Se ha demostrado la presencia de CD38 en:

### 1.6.2.1. Células musculares:

Se ha detectado la presencia de CD38 tanto en **células musculares** lisas (SMC) como estriadas. En células musculares lisas de diferentes territorios (vías aéreas, arterias coronarias, conductos seminíferos, intestino) se ha visto que el aumento de los niveles de cADPR induce un aumento de los niveles intracelulares de calcio, provocando un aumento de la contracción. [64, 104-107].

Existen varios trabajos sobre el papel del CD38 en las vías aéreas. En un estudio realizado con animales deficientes en CD38, se vio que la respuesta de las vías aéreas (resistencia que proporciona el pulmón) a dosis decrecientes de metacolina estaba disminuida en los animales CD38 deficientes [105].

Las enfermedades inflamatorias de las vías aéreas como el asma, se caracterizan por una severa broncoconstricción causada por una hipersecreción y una hiperrespuesta de las células musculares lisas, que son el principal componente contráctil en este territorio. Se define hiperrespuesta como el aumento de la reactividad en respuesta a espasmógenos. Esta alteración de la respuesta contráctil de las células musculares lisas puede ser debida a:

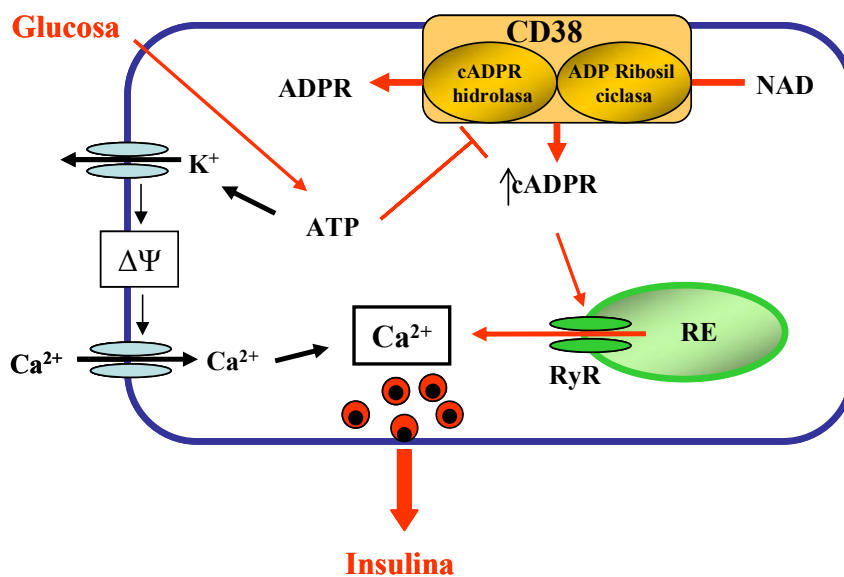
- Cambios en la expresión de receptores de membrana (ej. *Tachykinin*, *kradykinin* y *cysteinyl leukotrienes* [108-110])
- Alteraciones de las moléculas transductoras de señales.
- Cambio de la propiedades contráctiles

El calcio es la molécula que sirve de unión entre los segundos mensajeros producidos tras la estimulación agonista y el aparato contráctil de las células musculares lisas que llevan a su contracción. Se cree que el aumento de los niveles del calcio intracelular después de la estimulación de agonistas es la principal causa que desencadena una hiperrespuesta [111]. El calcio liberado de compartimientos intracelulares tras la estimulación con agonistas es el que contribuye en mayor grado. Existen dos mecanismos posibles; liberación de calcio del retículo endoplasmático vía receptores IP<sub>3</sub> o vía los receptores Ryanodin (RyR). En un estudio realizado con células musculares lisas procedentes de vías aéreas humanas (ASM) se vio que tanto el TNF- $\alpha$ , la interleucina 1 $\beta$ , como el IFN- $\gamma$  eran capaces de aumentar la expresión de CD38, la

actividad de la ciclasa ADP-ribosil y los niveles de calcio en respuesta a agonistas [104, 111].

### 1.6.2.2. Islotes pancreáticos:

Se ha detectado la expresión de CD38 en **células betas pancreáticas**. La presencia de esta molécula esta relacionada con una vía alternativa de secreción de insulina. En la vía clásica, la glucosa hace aumentar los niveles intracelulares de calcio de la células beta pancreáticas, en 1984 se propuso que este aumento de calcio provendría del exterior de la células [112]. Concentraciones milimolares de ATP producidas durante el metabolismo de la glucosa, inhibirían los canales de potasio, causando la despolarización de la membrana y la siguiente obertura de los canales calcio-voltage dependientes. En 1993 se propuso una vía alternativa, se vio que el metabolito cADPR producido por el enzima CD38, era capaz de inducir la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático vía los receptores Ryanodin (RyR), y este aumento de calcio intracelular induciría la secreción de insulina [113]. La razón es porque el ATP producido inhibe la actividad cADPR hidrolasa del CD38 (el ATP compite por el mismo sitio de unión que el cADPR, por tanto hay menos degradación), acumulándose así el metabolito cADPR [82, 114]. En un estudio realizado en una población japonesa con diabetes tipo II se ha identificado un polimorfismo en el gen del CD38 [115].



**Figura 1-10. Representación esquemática de los mecanismos de inducción de Insulina clásico (en negro) y vía CD38 (rojo).** La Lys-129 del la hidrolasa cADPR es el sitio de unión del metabolito

cADPR para su posterior hidrólisis, el ATP producido durante el metabolismo de la glucosa es capaz también de unirse a este mismo sitio, inhibiendo así la hidrólisis del metabolito cADPR, y por tanto favoreciendo su acumulación. El cADPR induce la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático vía los receptores Ryanodin. En la vía clásica (en negro) el ATP inhibe los canales de potasio, causando la despolarización de la membrana y la siguiente obertura de los canales Calcio-voltage dependientes. (*Okamoto, Int. Journal of experimental Diabetitis Res., 2002, modificada*)

### 1.6.2.3. Astrocitos:

Se ha demostrado la presencia de CD38 en **astrocitos**, donde se ha visto que el cADPR regula la liberación de diferentes neurotransmisores como el GABA [116]. También las **células de Purkinje** expresan CD38, se cree que la presencia del CD38 en estos tipos celulares estaría relacionada con los procesos de memoria [117].

### 1.6.2.4. Osteoclastos:

En los **osteoclastos** se ha detectado la presencia de CD38. En estas células el CD38 estaría involucrado en procesos de reabsorción ósea [118]. En un estudio realizado en una población de mujeres caucásicas se demostró una relación entre la presencia de un polimorfismo de gen del CD38 y una mayor incidencia de osteoporosis [119].

### 1.6.2.5. Células de la retina:

Son las células de la retina las que expresan CD38. Su función está relacionada con los procesos de visión [120, 121].

Table 1  
Physiological and pathological implications inferred from tissue distribution of the CD38 molecule<sup>a</sup>

CD38			
Tissue	Cellular distribution	Putative function	Pathologic implications
Bone marrow	Hematologic precursors plasma cells	Homing and apoptosis; marker of precursor cell commitment	Prognostic marker in MM (negative) and in AML (positive)
Thymus	Throughout thymic development	Unknown	Unknown
Spleen/lymph nodes	Germinal center B cells	Rescue from apoptosis	Prognostic marker in B-CLL (negative)
Blood	T, B, NK and monocyte subsets; platelets and erythrocytes	Interaction with endothelium	Unknown
Gut	Intra epithelial and <i>lamina propria</i> lymphocytes	Mucosal immunity	Inflammatory bowel diseases (?)
Brain	Purkinje cells; neurofibrillary tangles	Memory process	Alzheimer's disease
Prostate	Epithelial cells	Unknown	Benign prostatic hyperplasia
Pancreas	$\beta$ -cells	Insulin secretion	Type II diabetes mellitus
Bone	Osteoclasts	Bone resorption	Osteoporosis (?)
Eye	Retinal cells	Vision process	Unknown
Muscle	Sarcolemma of smooth and striated muscle	Muscle contraction (?)	Unknown

<sup>a</sup> AML, acute myeloid leukemia; B-CLL, B-chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma.

**Tabla 1-4 Distribución del CD38 en diferentes tejidos.** (*Deaglio and Malavasi, Leucemia Research, 2001.*)

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## 2.1 HIPÓTESIS

Las células hepáticas estrelladas juegan un papel funcional importante en diferentes procesos como la fibrogénesis, la inflamación y la contracción.

Nuestra hipótesis es que señales transducidas a través de proteínas de membrana de las células hepáticas estrelladas podrían tener un papel funcional importante en diferentes procesos fisiopatológicos y podrían ser utilizadas como posibles dianas terapéuticas.

## 2.2 OBJETIVOS

### Objetivos generales:

Identificar y posteriormente estudiar nuevas moléculas de membrana expresadas en las células hepáticas estrelladas.

### Objetivos concretos:

1. **Caracterización de moléculas de la membrana de las células hepáticas estrelladas.**
  - a. Generar un panel de anticuerpos monoclonales contra proteínas de la membrana de las células hepáticas estrelladas.
  - b. Caracterizar bioquímicamente y clonar los genes de las proteínas reconocidas por los anticuerpos.
  - c. Determinar la expresión de las proteínas reconocidas por los anticuerpos.
  
2. **Caracterización funcional de CD38 de las células hepáticas estrelladas.**
  - a. Determinar la función de CD38 en la movilización de calcio.
  - b. Determinar la función de CD38 en la inducción de secreción de IL-6.
  - c. Determinar la función de CD38 en la inducción de la expresión de las moléculas de adhesión I-CAM-1, V-CAM y N-CAM.
  - d. Determinar el papel de CD38 en los mecanismos de contracción celular.
  - e. Determinar el papel de CD38 en la regulación del recambio de la matriz extracelular.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

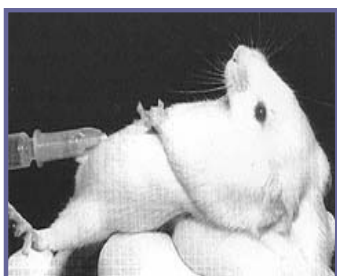


## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Producción de anticuerpos monoclonales

#### 3.1.1. Inmunización

Hembras de ratón de la cepa Balb/c fueron inmunizadas con células hepáticas estrelladas acabadas de aislar. Se realizaron 3 inyecciones intraperitoneales en un intervalo de 2 semanas. Las células antes de inyectarse al ratón fueron lavadas 3 veces con tampón fosfato (PBS). Se inyectaron aproximadamente  $0,5-10 \times 10^6$  células por ratón e inmunización.



**Figura 1-1 Inmunización intraperitoneal de un ratón Balb/c**

#### 3.1.2. Fusión celular

El objetivo es la fusión de un linfocito B productor de anticuerpos monoclonales con una célula de mieloma de ratón Balb/c, el resultado de la fusión es un hibridoma, una célula inmortal con capacidad ilimitada de producir un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno. La fusión celular fue realizada 3 días después de la última inmunización, utilizando una modificación de la técnica original de Köhler y Milstein [122]. Resumiendo, las células esplénicas de los ratones inmunizados fueron fusionadas en una proporción de 4/1 con células de mieloma murino de ratón NS1, utilizando polietilenglicol al 50%.

#### Reactivos y material

- Polietilenglicol al 50% (PEG) (Sigma ref P-7181)
- HAT (50X) (Hipoxantina, aminopterina y timidina) (Sigma ref H0262)
- HT (50X) (Sigma ref H0137)

- Medio selectivo de cultivo HAT: RPMI + 20 % suero fetal de ternera + Glutamina + Penicilina + HAT (100 $\mu$ M de hipoxantina, 400 nM de aminopterina y 16  $\mu$ M de Timidina)

*Nota: El suero fetal utilizado ha de ser especial para hibridomas o hay que pre-testarlo previamente*

- Placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano
- Material quirúrgico
- Células feeders procedente del lavado peritoneal de 3 ratones

### **3.1.2.1. Obtención y preparación de las células de “feeders”**

Las células feeders son principalmente macrófagos que provienen del lavado intraperitoneal y que secretan una serie de citocinas que favorecen el crecimiento de los hibridomas.

#### **Reactivos y materiales:**

- Ratón Balb/c de 9 semanas
- Jeringas de 5 ml con una aguja de 19G, pre-cargada con RPMI
- Material quirúrgico

#### **Protocolo:**

- Después de rociar el ratón con etanol del 70%, separar la piel del peritoneo. El peritoneo ha de estar intacto, sin ningún poro.
- Inyectar 5 ml de medio de cultivo RPMI en el lado izquierdo del peritoneo y seguidamente extraer el volumen inyectado. *Nota: Se suelen extraer 3ml de los 5 ml inyectados. Aproximadamente se necesita 1 ratón por cada 6 placas. Se recomienda preparar un día antes las placas con las células de feeders, si hubiese algún problema de contaminación con estas células, estaríamos a tiempo de preparar otras placas antes del inicio de la fusión (100 $\mu$ l/pozo).*

### **3.1.2.2. Obtención de los esplenocitos**

- a) Extraer el bazo del lado izquierdo y colocarlo en una placa de petri con 10 ml de medio.
- b) Con ayuda de 2 agujas torcidas de 25G extraer los esplenocitos, y recogerlos en un tubo de 15ml.

- c) Esperar unos 2 minutos para que sedimenten los agregados en el fondo del tubo.
- d) Transferir a un tubo limpio las células y disgregar con ayuda de una pipeta de 10 ml subiendo y bajando unas 20 veces.
- e) Lavar los esplenocitos 3 veces con RPMI sin suero fetal mediante centrifugación (1500rpm, 5 minutos, temperatura ambiente).

*Nota: contar el número de esplenocitos, aproximadamente se obtienen entre 100-150 millones.*

### **3.1.2.3. Preparación de las células de mieloma (NS-1)**

Se descongelan 5-7 días antes de la fusión, el día previo a la fusión se les adiciona el doble de medio para que se encuentren en fase exponencial. La proporción de células para la fusión ha de ser de 3-4 esplenocitos por cada célula NS-1.

- a) Lavar las células con RPMI sin suero fetal (1500rpm, 5 minutos, 21°C).

*Nota: Las cultivamos en flascos de 175cm<sup>2</sup>, el día de la fusión la concentración suele ser de 1 millon/ml. Por tanto, para la fusión cogemos 40 ml, para respetar la proporción 4:1.*

### **3.1.2.4. Fusión**

- a) Resuspender en 20 ml de medio y en un mismo tubo las células de mieloma y los esplenocitos obtenidos en los apartados 1 y 2. Mezclar y centrifugar en condiciones suaves (1000rpm, 10 minutos, 21°C).
- b) Quitar el sobrenadante hasta la última gota, colocar el tubo en un baño a 37°C y realizar la fusión utilizando polietilenglicol al 50% y siguiendo la siguiente secuencia:

#### **Secuencia de la fusión**

- Añadir 1ml de PEG gota a gota durante 1 minuto y en agitación.
- Incubar 1 minuto agitando
- Añadir 1 ml de RPMI gota a gota durante 1 minuto y en agitación
- Añadir 2 ml de RPMI gota a gota durante 1 minuto y en agitación
- Añadir 5 ml de RPMI gota a gota durante 1 minuto y en agitación
- Añadir 10 ml de RPMI gota a gota durante 1 minuto y en agitación
- Completar con RPMI hasta un volumen final de 50ml.

**Tabla 3-1 Secuencia de la fusión.**

- c) Centrifugar las células fusionadas (1000rpm, 10 minutos, temperatura ambiente).
- d) Resuspender las células en medio selectivo y distribuir las en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano en medio de cultivo selectivo HAT enriquecido con células feeders. Este cultivo se mantiene durante 15 días y los sobrenadantes de los diferentes pocillos se testan.

*Nota: Aproximadamente las células se distribuyen entre 15-20 placas de 96 pocillos, previamente preparadas el día anterior con células feeders. Se distribuyen a razón de 100µl/pozo. Los sobrenadantes fueron testados mediante citometría de flujo (ver apartado 3.5.1).*

Los anticuerpos monoclonales que se presentan en esta tesis son el producto de 14 fusiones.

### 3.1.3. Selección en medio HAT

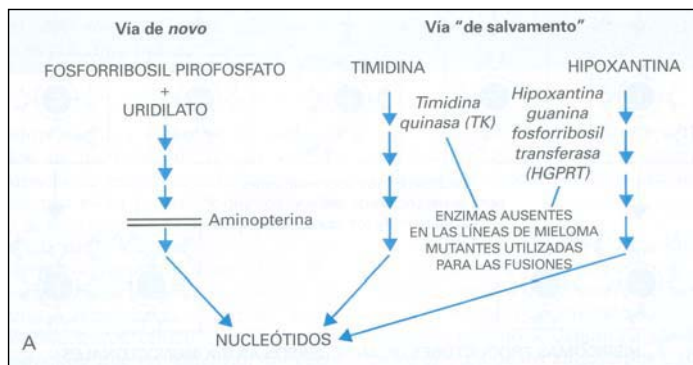
Las células NS1 pueden crecer en medio normal pero no en medio de selección HAT debido a una mutación en la vía de síntesis de nucleótidos (ver **figura 3-2**). La fusión de los esplenocitos (células normales) con esta línea de mieloma mutada le proporcionan los genes necesarios para el crecimiento en este medio de selección. Por otro lado, los genes proporcionados por la línea NS1 hacen a los hibridomas inmortales. Existen dos vías de síntesis de nucleótidos:

- La vía *de novo*
- La vía de salvamento

En la **vía de novo** se sintetizan los nucleótidos purínicos y timidilato a partir de fosforribosil pirofosfato y uridilato, respectivamente, en varios pasos, uno de los cuales implica la transferencia de un grupo metilo o formilo desde el tetrahidrofolato activado. Fármacos antifolato como la aminopterina, bloquean la activación del tetrahidrofolato, inhibiendo de esta manera la vía *de novo* de síntesis de nucleótidos.

Las células tratadas con aminopterina pueden utilizar la **vía de salvamento** de síntesis de nucleótidos donde las purinas son sintetizadas a partir de Hipoxantina (adicionada exógenamente) por el enzima HGPRT (Hipoxantina-guanosina fosforribosiltransferasa) y el timidilato es sintetizado por la enzima TK (Timidita-cinasa) a partir de timidina. Así pues, las células pueden crecer en presencia de aminopterina si el medio de cultivo está suplementado con hipoxantina y timidina (medio HAT).





**Figura 3-2 Representación esquemática de las vías de síntesis de nucleótidos.** (Abbas, *Inmunología Celular y Molecular*, Mc Graw Hill, 1999)

### 3.1.4. Selección de los hibridomas de interés

La selección de hibridomas secretores de anticuerpos reactivos frente a células hepáticas estrelladas, se realizó primero mediante citometría de Flujo (ver apartado 3.5.1), los que dieron positivos se comprobó mediante microscopia de fluorescencia que estuvieran marcando células con gránulos de vitamina A en su interior.

### 3.1.5. Cultivo secundario

Las células de los pocillos positivos fueron transferidas a placas de 24 pocillos en medio suplementado con HT (100µg/ml de hipoxantina y 16 µg/ml de timidina) durante 2-3 semanas.

*Nota: Si alguno de los hibridomas de interés, le cuesta crecer podemos volver a enriquecer el medio con feeders (ver apartado 3.1.2.1).*

### 3.1.6. Subclonaje de los híbridos mediante dilución límite

Una vez seleccionados los hibridomas secretores de interés, procedimos a subclonarlos mediante una técnica de dilución límite. Las células del hibridomas a subclonar se reparten en 4 placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células se siembran en cada placa a una concentración de 10, 5, 2.5, 1.25 células por cada pocillo (100µl/pocillo) respectivamente.

Tras un periodo de 10 días se testan los sobrenadantes de los pocillos en los que ha habido crecimiento celular (se escoge para testar aquella placa donde aproximadamente ha crecido una clona cada 4 pocillos). Se considera clonado un hibridoma cuando todos los sobrenadantes testados son positivos. Si no es así, se realiza otro subclonaje, escogiendo una de las clonas positivas.

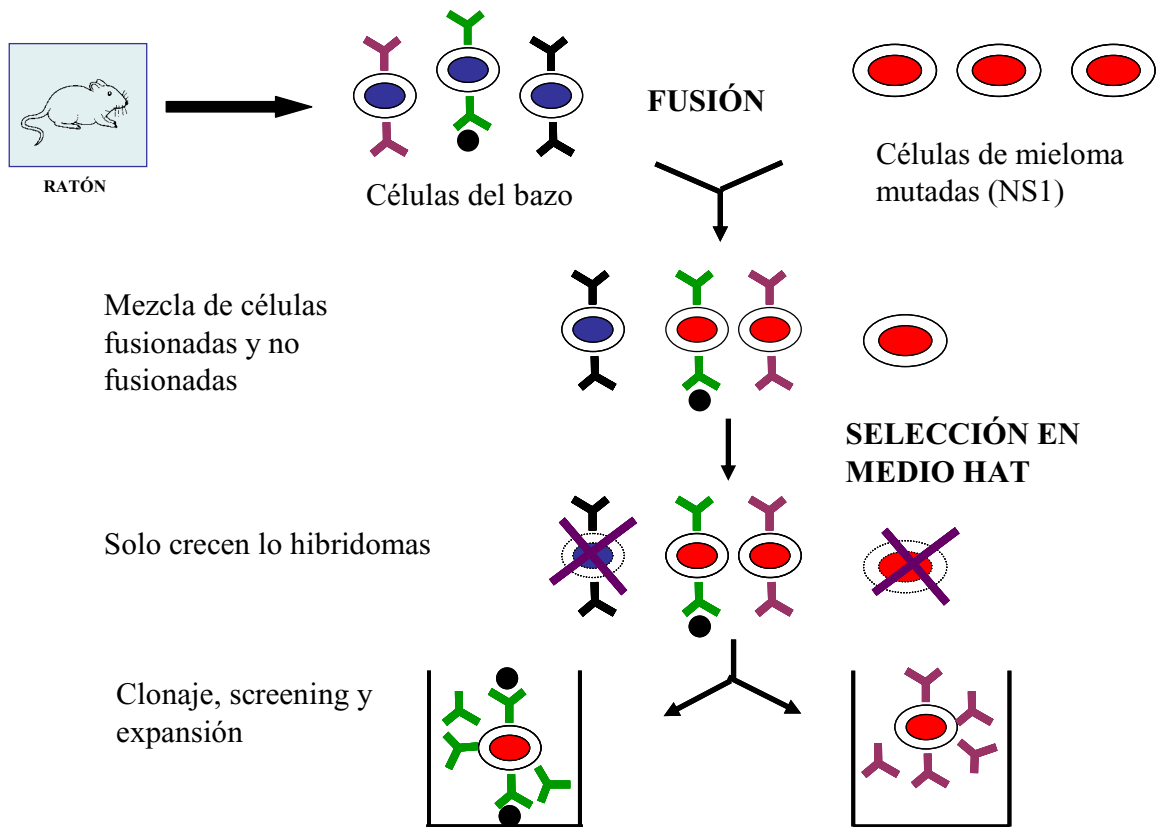


Figura 3-3 Representación esquemática del proceso de producción de anticuerpos monoclonales.

### 3.1.7. Expansión de los hibridomas

Una vez subclonado el hibridoma de interés se puede proceder a su expansión. Se recomienda hacerlos crecer primero en un pozo de 24, en este momento podemos eliminar el suplemento HT. Después de que muestren un buen crecimiento se transfieren a un flasco de 25cm<sup>2</sup> o de mayor tamaño.

### 3.1.8. Congelado de los hibridomas

Los hibridomas de interés se recomienda que se vayan congelando en cada punto del proceso. Esto nos permitiría recuperar de nuevo el hibridoma si surgiese algún problema.

#### Protocolo:

Las células a congelar se resuspenden en una solución de suero fetal de ternera, a una concentración aproximada de  $10 \times 10^6$  células / 0.5 ml de suero fetal, seguidamente se

añade suero fetal que contiene un 20% de DMSO (Sigma) gota a gota (dilución final del DMSO 10%). Se distribuyen las células en criotubos y tras una noche en un congelador de -80°C, los tubos se introducen en contenedores de nitrógeno líquido.

### 3.1.9. Purificación de anticuerpos

La purificación de anticuerpos se realizó mediante cromatografía de afinidad a partir de sobrenadantes de cultivos establecidos en medio RPMI suplementado con un 20 % de suero fetal. Para la purificación de los anticuerpos se suele utilizar proteína A o G aisladas de *Staphylococcus A* o *Streptococcus G*. Ambas proteínas se unen de manera no covalente a la región Fc de los anticuerpos. El grado de afinidad de la proteína A o G por la región Fc de los anticuerpos varía según el isotipo del anticuerpo y la especie en el que hayan sido producidos éstos (ver **tabla 3-2**).

La concentración aproximada de anticuerpo presente en un sobrenadante procedente de un cultivo *in vitro* es de aprox. 5-10µg/ml y de aprox. 1mg/ml si se utilizan flascos de cultivo de alto rendimiento (INTEGRA CELLLine-1000, Cultek ref.90005), en una ascitis la concentración es aprox. 2-10 mg/ml. Según la tasa de unión de nuestra columna con estos datos podemos calcular el volumen óptimo necesario que hemos de utilizar para la purificación.

Protein A/G Affinities for Monoclonal Antibodies	
Antibody Isotype	Affinity
Human IgG <sub>1</sub>	Protein A or Protein G
Human IgG <sub>2</sub>	Protein A or Protein G
Human IgG <sub>3</sub>	Protein G
Human IgG <sub>4</sub>	Protein A or Protein G
Rat IgG <sub>1</sub>	Protein G (weakly)
Rat IgG <sub>2</sub>	Protein G
Rat IgG <sub>2b</sub>	Protein G (weakly)
Rat IgG <sub>3c</sub>	Protein G (weakly)
Mouse IgG <sub>1</sub>	Protein G
Mouse IgG <sub>2a</sub>	Protein A or Protein G
Mouse IgG <sub>2b</sub>	Protein A or Protein G
Mouse IgG <sub>3</sub>	Protein G

Protein A/G Affinities for Polyclonal Sera	
Species	Affinity
Human	Protein A or Protein G
Horse	Protein G
Cow	Protein G
Pig	Protein A or Protein G
Sheep	Protein G (weakly)
Goat	Protein G (weakly)
Rabbit	Protein A or Protein G
Chicken	Protein G (weakly)
Hamster	Protein G (weakly)
Guinea Pig	Protein A
Rat	Protein G (weakly)
Mouse	Protein A or Protein G (both weakly)

**Tabla 3-2 Grados de afinidad de la proteína A|G según isotipo y especie de procedencia de los anticuerpos.**

#### Materiales:

- Kit de purificación de anticuerpos monoclonales. Affi-Gel Protein-A MAPS II (Monoclonal Antibody Purification System), (BioRad ref. 153-6159)
- Membrana de diálisis (Sigma ref. D-9277)
- 4 Litros de PBS para la diálisis

**Protocolo:**

- a) Purificar los anticuerpos deseados siguiendo las instrucciones del Kit de BioRad.  
*Nota: Se purifican mediante cromatografía de afinidad, utilizando una técnica modificada para la purificación de IgG con proteína A.*
- b) Dializar la proteína con el fin de eliminar las sales que puedan interferir en nuestro estudio, esta se realiza con dos cambios de PBS 1X, a 4°C durante 24-48 horas, en constante agitación.
- c) Medir los niveles de proteína con un espectrómetro a una longitud de 280nm. Para calcular la concentración de proteína, la relación entre densidad óptica (O.D) y concentración de proteína (mg proteína/ml) es de: 1.35 / (1mg/ml).
- d) Analizar por electroforesis el grado de purificación y alicuotar. Mantener el anticuerpo a -20°C.

*Nota: los anticuerpos que se vayan a utilizar para realizar estudios funcionales, hay que asegurarse que estén libres de endotoxinas ("LPS free"). En este caso, se trabajara durante todo el proceso de purificación en condiciones estériles (bajo campana de flujo laminar), se filtraran todas las soluciones y tampones y el PBS utilizado en las diálisis se autoclavará. Los anticuerpos que se vayan a utilizar para fenotipar conviene adicionarles azida (0.01%) para evitar su contaminación.*

**3.1.10. Biotinilización de anticuerpos**

El marcaje de los anticuerpos con biotina permite la utilización de avidinas/streptavidina conjugadas a enzimas o fluorocromos.

**Reactivos:**

- Solución 1 M Carbonato sódico, pH 9.5 [ $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  (1M/1M)] (para preparar 100ml: 0.84g de  $\text{NaHCO}_3$  más 0.356g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Biotina (Stock: 2.5 mg/ml disueltos en DMSO) (Sigma ref. B-2643)
- La concentración óptima de los anticuerpos que se quieran biotinar ha de ser entre 1-0.5 mg/ml en PBS

**Protocolo:**

- a) En un tubo mezclar:

- 850 µl del anticuerpo a biotinar
  - 50 µl de la solución 1 M de carbonato sódico
  - 32 µl de la solución de biotina
  - 70µl de PBS
- b) Dejar el tubo en agitación rotatoria en la noria tapado de la luz durante 3 horas y 30 minutos a temperatura ambiente.
- c) Dializar frente a 2 litros de PBS durante toda la noche a temperatura ambiente.
- d) Dializar por segunda vez toda la noche frente a 2 litros de PBS a 4°C.

## **3.2. Aislamientos celulares**

### **3.2.1. Aislamiento de células hepáticas estrelladas de rata**

#### **Reactivos, materiales y aparatos**

- Enzimas: Pronasa (Roche ref. 1459643), Colagenasa A (Roche ref. 103586), Dnasa (Roche ref. 104159)
- Medio GBSS (“*Gey’s Balanced Salt Solution*”) (Sigma ref. G9779)
- Heparina 0.1%
- Ketamina (Ketolar® 50mg/ml, Pfizer ref. 631028)
- Solución salina
- Seda trenzada del numero 3/0
- Angiocath G20 o catéter de polietileno p100
- Jeringas de 1 ml con agujas de 35G
- Gasas estériles
- Material de cirugía estéril: pinzas, tijeras, coger, etc.
- Placa de petri estéril
- Hojas de bisturí
- Filtros para tubos Falcon (diámetro del poro 100µm) (BD Biosciences ref. 352360)
- Filtros de 0.22µm de diámetro de poro. (Reactiva ref. 99522)
- Bomba peristáltica con los correspondientes tubos y conectores
- Centrífuga con cabezal basculante

*Nota: los enzimas colagenasa y Dnasa se compraron liofolizados, conviene resuspender el vial, llevarlo a una concentración stock óptima (recomendable 10mg/ml), filtrar, alícuotar (recomendable 2 ml) y congelar a -20 °C.*

**Protocolo:**

- a) Poner los medios en el baño a 37°C.
- b) Anestesiarse la rata mediante inyección intraperitoneal con ketamina (Ketolar 100mg/kg). *Nota: suele ser necesario inyectar un volumen de 0.7 ml, y aproximadamente tarda en dormirse unos 20 minutos.*
- c) Abrir el abdomen de la rata mediante una incisión longitudinal. Se recomienda primero separar la piel del peritoneo y con un juego nuevo de cirugía estéril realizar la incisión longitudinal en el peritoneo a través de la línea alba.
- d) Apartar los intestinos lateralmente y cubrir toda la zona con gasa estériles para minimizar posibles problemas de contaminación.
- e) Diseccionar la vena cava infrahepática inferior y la vena porta.
- f) Pasar sedas por ambas venas y dejar lazos preparados:
  - vena porta: pasar seda antes de la arteria hepática
  - vena cava inferior infrahepática: pasar sedas antes de los riñones.
- g) Inyectar 300 µl de heparina a través de la vena cava inferior.
- h) Canular la vena porta y fijar bien con las sedas (canular con un angiocath G20 o con un catéter p100).
- i) **Lavado:** Perfundir el hígado de manera no recirculante con 150 ml de GBSS más 1 ml de heparina a un flujo de 20ml/minutos durante 2.5 minutos seguidos de un flujo de 10ml/minuto durante 10 minutos. Pocos segundos después del inicio de la perfusión, cortar la vena cava inferior infrahepática.

**Solución de lavado:** 150ml de GBSS + 1 ml de heparina

**Velocidad del flujo de perfusión:**

- 50ml → 20ml/min (36 rpm) ⇒ 2.5'

- 100ml → 10ml/min (18 rpm) ⇒ 10'

- j) **Digestión “in vivo”:** Añadir 300mg de pronasa, 30 mg de colagenasa y 10 mg de Dnasa a 200ml de GBSS. Perfundir a un flujo de 10ml/minuto durante 5 minutos, seguidamente cerrar la vena cava inferior infrahepática anudando el lazo previamente preparado y seguir perfundiendo a una velocidad de 5ml/minuto durante 30 minutos.

***Solución para la digestión “in vivo”***

- 200ml GBSS
- 300mg pronasa
- 30mg colagenasa
- 10mg Dnasa

***Velocidad del flujo de perfusión:***

- 50ml → 10ml/min (18 rpm) ⇒ 5'
- Clump
- 150ml → 5ml/min (9 rpm) ⇒ 30'

- k) Extraer el hígado y recogerlo en una placa de petri.
- l) Disgregar el hígado con ayuda de un bisturí. A partir de este momento se trabaja bajo una campana de flujo laminar.
- m) **Digestión “in vitro”:** Añadir 40 mg de pronasa, 10 mg de colagenasa y 10 mg de Dnasa a 100 ml de GBSS. Incubar el hígado disgregado con esta solución a 37°C durante 10 minutos e ir agitando cada minuto.

***Solución para la digestión “in vitro”***

- 100ml GBSS
- 40mg pronasa
- 10mg colagenasa
- 10mg Dnasa

- n) Filtrar las células en suspensión sobre un filtro “falcon” de 100µm de diámetro de poro. Si no se dispone de estos filtros, se pueden utilizar gasas estériles.

- o) Centrifugar la suspensión durante 4 min a 500rpm y recoger el sobrenadante.
- p) Centrifugar el sobrenadante a 1600 rpm durante 5 minutos.
- q) Lavar las células 2 veces a 1600 rpm durante 5 minutos con PBS (si queremos inmunizar ratones con las células aisladas) o con medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal (si queremos cultivar las células).

En la **figura 3-4** se muestra esquemáticamente el proceso de aislamiento.

### **3.2.1.1. Cultivo de las células hepáticas estrelladas**

Si las células se quieren cultivar, resuspender en medio ISCOVE (Invitrogen ref. 21980-032) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera, penicilina, glutamina y 1% de fungizona (Life Technology ref 1529026). A los 3-4 días se pueden llegar a obtener 2 frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con una confluencia aproximada de un 70%. La pureza del cultivo a los 3-4 días puede ser valorada mediante una tinción de “Oil-Red”.

### **3.2.1.2. Tinción “Oil-Red”**

Con la tinción de “Oil-red’ podemos valorar la pureza de un cultivo de células hepáticas estrelladas de rata a los 3-4 días de haber sido aisladas.,

Las principales células contaminantes que nos podemos encontrar son: las células endoteliales y las células de Kupffer. Debido a las condiciones de cultivo a los 3-4 días apenas encontramos células endoteliales o células de Kupffer.

La tinción de Oil-Red tiñe las vesículas intracitoplasmáticas de vitamina presentes en las células hepáticas estrelladas, concretamente tiñe los ácidos grasos que se esterifican con el retinol.

### **Reactivos**

- “Oil Red” (Sigma ref. 19819-6)
- Alcohol isopropílico (60%)
- Paraformaldehído 4%
- Medio de montaje acuoso

### *Preparación soluciones:*

- “stock”: 0.5 g de oil-Red y 100 ml de alcohol isopropílico 99%
- Trabajo: 60 ml de la solución stock y 40 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Dejar reposar 10-15 minutos y filtrar. El filtrado es estable durante 1-2 horas



**Protocolo**

- a) Fijamos las células con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a 4°C.
- b) Lavamos las células 2 veces con PBS, seguidos de 2 lavados más con alcohol isopropílico al 60%.
- c) Teñimos con la solución de “Oil-Red” durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos.
- d) Diferenciamos con alcohol isopropílico al 60 %.
- e) Montar con un medio acuoso.

### **3.2.2. Aislamiento de hepatocitos y de células no parenquimáticas (Kupffer y endoteliales)**

El protocolo de aislamiento de hepatocitos y de células no parenquimáticas es común, **excepto en el último paso**, donde la centrifugación a bajas revoluciones permite separar los hepatocitos de las células no parenquimáticas. Los hepatocitos, debido a su mayor tamaño, los encontraremos en el sedimento y las células no parenquimáticas en el sobrenadante.

**Reactivos, materiales y aparatos:**

- Enzimas: Colagenasa A (Roche ref. 10358)
- Soluciones Hank I y Hank II (ver preparación en la página siguiente)
- Heparina 1%
- Solución salina
- Seda trenzada del número 3/0
- Angiocath G20 o catéter p100
- Jeringas de 1 ml con agujas de 35G
- Gasas estériles
- Material de cirugía estéril: pinzas, tijeras, coger
- Placa de petri estéril
- Hojas de bisturí
- Filtros para tubos Falcon (diámetro del poro 100µm) (BD Biosciences ref. 352360)
- Filtros de 0.22µm de diámetro de poro (Reactiva ref. 99522 )

- Bomba peristáltica con los correspondientes tubos y conectores
- Centrifuga con cabezal basculante

### ***Preparación de las soluciones necesarias para el asilamiento***

Las soluciones de trabajo se preparan el mismo día del asilamiento a partir de soluciones stock previamente preparadas.

### **Soluciones “stock”**

#### **Hanks 10X (Vf=1 litro)**

- NaCl. 80 g
- KCl: 4 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0.6 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.6 g
- H<sub>2</sub>O q.s.p 1 litro

#### **Krebs X4 (Vf=1 litro)**

- NaCl: 27.6 g
- KCl: 1.44 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.52 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1.18 g
- NaHCO<sub>3</sub>: 8 g
- H<sub>2</sub>O q.s.p 1 litro

### **Soluciones de trabajo** (preparación en el momento del aislamiento)

#### **Hanks Hepes (Vf=625 ml)**

- Hanks x10: 62.5 ml
- NaHCO<sub>3</sub>: 1.31 g
- Hepes: 1.875 g
- H<sub>2</sub>O q.s.p 625 ml
- Gasear con carbógeno (95%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub>) y añadir durante el gaseo el HEPES. Ajustar pH 7.4.

#### **Hanks I (Vf=250ml)**

- Hanks Hepes: 250 ml
- Egta: 0.057 g
- BSA: 5 g
- Heparina: 0.875U.I (0.875 ml del vial de heparina de1000 U.I/ml)
- Filtrar

**Hanks II (Vf=300ml)**

- Hanks Hepes. 300 ml
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . 0.1755 g
- Filtrar

**Krebs (Vf=250 ml)**

- Kreb's X4. 62.5 ml
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . 0.093 g
- Hepes: 1.5 g
- $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p 250 ml
- Gasear con carbógeno (95% $\text{O}_2$  5% $\text{CO}_2$ ) y añadir durante el gaseo el HEPES. Ajustar pH 7.4.

*Nota: Todos los reactivos utilizados fueron de sigma*

**Protocolo:**

- a) Poner el medio Hank's I y II (sin colagenasa) en el baño a 37°C.
- b) Anestesiarse la rata mediante inyección intraperitoneal con ketamina (Ketolar 100mg/kg).
- c) Abrir el abdomen de la rata mediante una incisión longitudinal. Se recomienda primero separar la piel del peritoneo y con un juego nuevo de material quirúrgico estéril realizar la incisión longitudinal en el peritoneo a través de la línea alba.
- d) Apartar los intestinos lateralmente y cubrir toda la zona con gasas estériles para minimizar posibles problemas de contaminación.
- e) Diseccionar la vena cava infrahepática inferior y la vena porta.
- f) Pasar sedas por ambas venas y dejar lazos preparados:
  - vena porta: pasar seda antes de la arteria hepática
  - vena cava inferior infrahepática: pasar sedas antes de los riñones.
- g) Inyectar 300  $\mu\text{l}$  de heparina a través de la vena cava inferior.
- h) Canular la vena porta y fijar bien con las sedas (canular con un angiocath G20 o con un catéter p100).

*Nota: hasta este punto el procedimiento es el mismo que en el aislamiento de células hepáticas estrelladas (ver apartado 3.2.1).*

- i) Cortar la vena cava inferior infrahepática y perfundir el hígado de manera no recirculante con **Hank's I** (37°C) durante 5-10 min a una velocidad de flujo de 20ml/min (100-200 ml) (36 rpm). *Nota: el tiempo suficiente hasta que veamos que queda limpio de sangre.*
- j) Cortar la cava inferior suprahepática (opcional, el rendimiento es similar si no se corta) y perfundir con **Hank's II**.
- k) **Digestión "in vivo"**: Añadir 30mg de colagenasa al medio Hank'II y perfundir a una velocidad de flujo de 10ml/min durante 5 minutos (50 ml)(18 rpm), cerrar la vena cava inferior infrahepática y seguir perfundiendo a una velocidad de flujo de 5ml/min durante 30 minutos (150 ml)(9 rpm).
- l) Extraer el hígado y recogerlo en una placa de petri.
- m) Disgregar el hígado con ayuda de un bisturí. A partir de este momento se trabaja en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar.
- n) **Digestión "in vitro"**: Añadir 10 mg de colagenasa a 100 ml de medio Hank's II. Incubar el hígado disgregado con esta solución a 37°C durante 10 minutos e ir agitando cada 2 minutos.
- o) Filtrar las células en suspensión sobre un filtro "falcon" en un Erlenmeier que contenga 100 ml de Kreb's frío. Dejar reposar durante 10-15 minutos.  
*Nota: se puede optar también por filtrar sobre 4 tubos de 50 ml que contengan 25 ml de medio Kreb's. Resulta más cómodo.*
- p) Lavar 3 veces las células con la solución de Kreb's. Centrifugando la suspensión durante 3 min a 400 rpm (50 g). Regoger:
  - el sedimento si queremos los hepatocitos.
  - el sobrenadante si queremos aislar células no parenquimáticas.

*Nota: Los 3 lavados son opcionales y sobretodo si solo vamos a quedarnos con la fracción de células no parenquimáticas (el sobrenadante).*

### 3.2.3. Aislamiento de células endoteliales y células de Kupffer

Iniciamos el aislamiento de células endoteliales y células de Kupffer a partir de la fracción de células no parenquimáticas aisladas según el protocolo explicado anteriormente (ver **apartado 3.2.2** “aislamiento de hepatocitos y células no parenquimáticas”).

#### Reactivos y materiales:

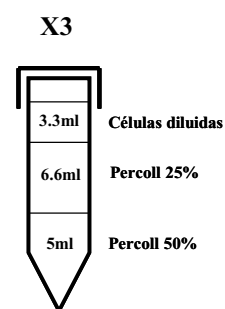
- Percoll (Amersham ref. 17-0891-02)

#### Protocolo:

- a) Partimos de la fracción de células no parenquimáticas obtenidas según el protocolo del **apartado 3.2.2**.
- b) Después de la centrifugación a bajas revoluciones (4 min a 500rpm), nos quedamos con el sobrenadante que es donde se encuentran las células no parenquimáticas (en el sedimento encontramos los hepatocitos).
- c) Centrifugamos el sobrenadante a 800 g (1700 rpm) durante 10 minutos a 4°C
- d) Decantamos y diluimos el sedimento (cel. no parenquimáticas) en 10 ml de PBS
- e) Centrifugamos a 500 rpm 4 min.
- f) Recogemos el sobrenadante y centrifugamos a 1700 rpm 5 min.
- g) Resuspendemos el pellet en 10 ml de PBS.
- h) Preparamos un percoll: 50%/25% en tubos de 15 ml (3 tubos).

#### Preparación del percoll:

1. 5 ml de percoll al 50% (fondo del tubo):
  - 2.5 percoll + 2.5 ml de **PBS 1%**
2. 6.6 ml de percoll al 25%
  - 1.65ml percoll + 4.95 ml **PBS 1%**
3. 3.3 ml del sedimento diluido en PBS.



#### TOTAL PARA 3 TUBOS:

- 50%: 7.5 ml percoll + 7.5 ml PBS 1%
- 25%: 4.95 ml percoll + 14.85 ml PBS 1%

*Nota: se recomienda realizar el percoll en 3 de tubos de 15 ml en vez de en un solo tubo de 50 ml, porque la formación del halo es mucho mejor debido al menor diámetro de los tubos.*

- i) Centrifugar a 800 g durante 25 min a temperatura ambiente (utilizar centrífuga basculante).
- j) Recoger la interfase entre el percoll 25%-50% (rica en células de Kupffer y endoteliales) transferirla a tubos de 15 ml (mejor utilizar 3 tubos para poder diluir al máximo el percoll que podamos coger).
- k) Añadir a cada tubo 15 ml de PBS y mezclar suavemente.
- l) Centrifugar a 800 g durante 10 minutos a 4°C.
- m) Resuspender las células en medio RPMI suplementado con un 10% suero fetal de ternera, penicilina y glutamina.
- n) Sembrar las células en una placa de petri para cultivos y incubar a 37°C al 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> (incubador) durante aprox. 45 minutos o hasta que veamos que las células de Kupffer quedan adheridas a la placa. El rendimiento en este punto es aproximadamente de 4x10<sup>6</sup> cells/ml.

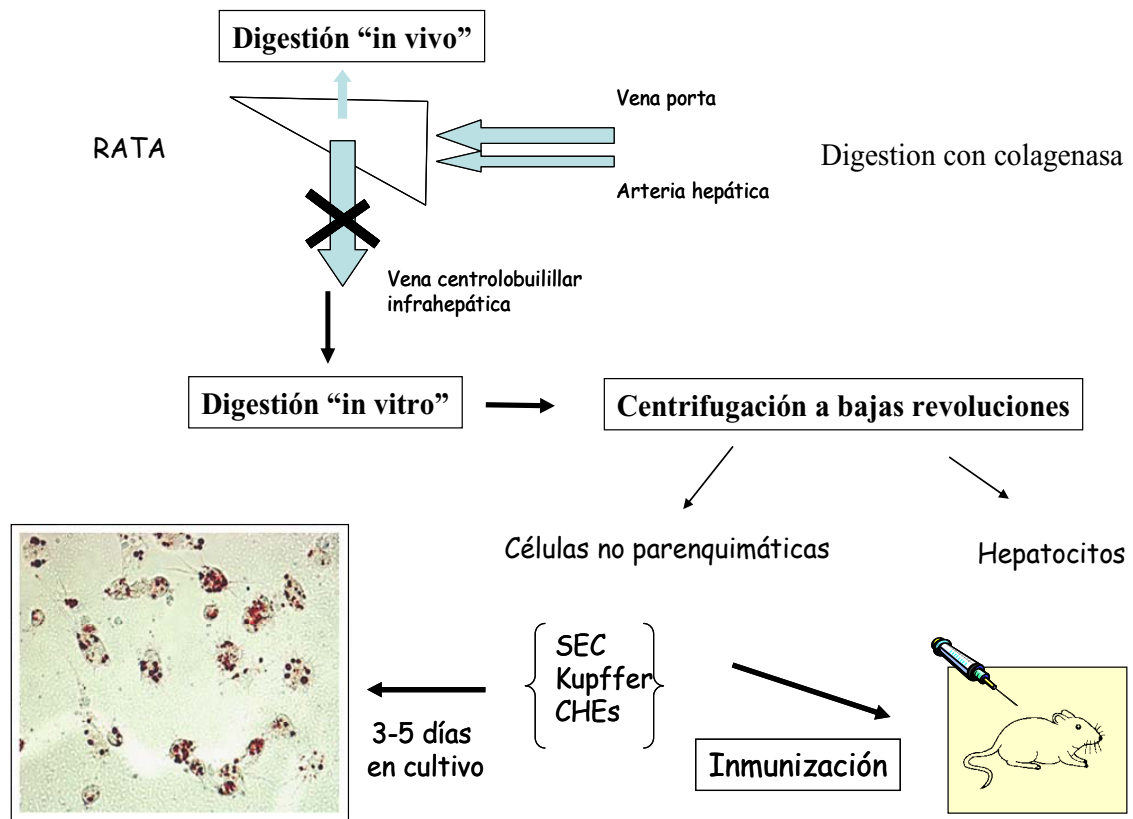
Al cabo de aproximadamente 45 minutos en el sobrenadante encontraremos mayoritariamente las células endoteliales y adheridas las células de Kupffer.

#### **3.2.3.1. Aislamiento de células de Kupffer**

Hacer dos lavados previos de la placa de petri con PBS a temperatura ambiente (para evitar contaminaciones con células endoteliales). Las células adheridas (Kupffer mayoritariamente) las desenganchamos añadiendo PBS frío y agitando suavemente, transferimos las células a un tubo de 15ml y lavamos 2 veces con medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal.

#### **3.2.3.2. Aislamiento y cultivo de células endoteliales**

En el sobrenadante encontramos una población enriquecida de células endoteliales. Después de lavarlas dos veces, pueden ser utilizadas o cultivadas en un frasco previamente tratado con fibronectina y con medio suplementado con factores de crecimiento endotelial.



**Figura 3-4 Representación esquemática del proceso de aislamiento de células hepáticas estrelladas.**  
(SEC: Células sinusoidales endoteliales, CHE: Células hepáticas estrelladas)

### 3.2.4. Aislamiento de monocitos y linfocitos de sangre periférica de rata.

Las células mononucleares de sangre periférica se separan mediante un gradiente de Ficoll.

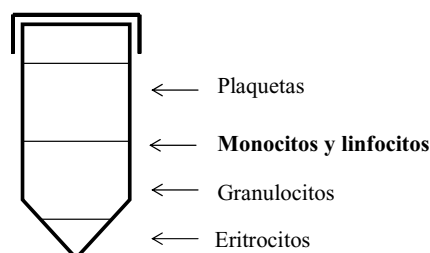
#### Reactivos:

- Ficoll (Histopaque-1077) (Sigma ref. H-8889)

#### Protocolo:

- Diluir la sangre 1/5 en PBS. La sangre la extraemos con un jeringa heparinizada G19 de la vena cava inferior infrahepática y se recoge en tubos que contienen EDTA.
- Añadir 3 ml del Ficoll en la base del tubo y encima ir añadiendo lentamente 10 ml de la sangre diluida. Se recomienda utilizar tubos de 15 ml.

- c) Centrifugar a 18000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- d) Recoger la interfase donde se encuentran los monocitos y los linfocitos.



- e) Lavar las células 2 veces con PBS.

En este punto del protocolo mediante citometría de flujo según los parámetros SSC (Side angle light scatter) y FSC (Forward angle light scatter) podemos diferenciar las dos poblaciones. Pero si queremos separarlas seguimos con el protocolo.

- f) Lavar las células con medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal.
- g) Sembrar las células en una paca de petri de cultivos y incubar a 37°C al 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> (incubador) durante aproximadamente 2 horas.
- h) Al cabo de 2 horas, adheridos encontraremos mayoritariamente los monocitos y en el sobrenadante los linfocitos.
- i) Los monocitos se pueden desenganchar utilizando PBS frío.

### 3.3. Perfusión hepática para la evaluación de la resistencia intrahepática

- a) Anestesiarse la rata y realizar una laparotomía (ver apartado **b-d** de la sección 3.2.1)
- b) Perfundir con una solución de Krebs Bicarbonatada (SBBK) a través de la vena porta. Esta solución se bombeará desde un reservorio y será gaseada continuamente con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> a través de un oxigenador de membrana y mantenida a 37°C por un intercambiador de calor.
- c) Rápidamente, se introducirá otro catéter por la aurícula para recoger el “outflow” del hígado. Mediante una conexión tipo “y”, se conectará un catéter de polietileno al catéter portal (“inflow”) y otro a la vena cava (“outflow”). Ambos catéteres serán conectados a sensores de presión lo que permitirá determinar la presión de entrada y salida del hígado y obtener el gradiente de perfusión hepático como la diferencia de



ambas. También se conectará intercalado en el sistema de entrada un sensor de flujo (transonic system) lo cual permitirá la monitorización continua del flujo portal. El flujo de presión se establecerá a 35 ml/min y se dejará estabilizar el sistema durante 30 min. De estos parámetros se derivará la resistencia vascular hepática.

- d) Para evaluar el efecto del anticuerpo CD38.14.27 sobre la resistencia vascular hepática. Se preincubará el hígado después del periodo de estabilización con una dosis de 200µg del anticuerpo CD38.14.27 o un anticuerpo irrelevante, posteriormente se evaluará la respuesta de la vasculatura intrahepática añadiendo dosis crecientes de metoxamina ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $0.5 \times 10^{-4}$  M) al reservorio.

### 3.4. Análisis de proteínas

#### 3.4.1. Inmunoprecipitación

##### Materiales:

- Biotina (Biotin 3-sulfo-N-hydroxy-succinimide ester) (Sigma ref. B-5161)
- Bolas de *sepharosa* unidas a proteína A. (Amersham ref.17-0780-01)
- Tampón de carga: para prepara 50ml a una concentración de 3X (10ml de Tris 6.8 1M, 3g de SDS, 15ml de glicerol, 2.5ml de  $\beta$ -mercaptoetanol y Azul de Bromofenol)
- Tampón de lisis:

<u>Reactivos</u>	<u>Conc. final</u>	<u>Volumen final = 100ml</u>
1. NP40	1%	1ml
2. NaCl	150mM	0.877g
3. NaF	100mM	0.42g
4. EDTA	10Mm(0.5M)	2ml
5. PMSF	1mM	18mg/1ml etanol (0.018g)
6. PAO	100µl	1.68mg/ ~ 100µl DMSO (0.0017g)
7. NaVO <sub>3</sub>	2mM	0.0368g
8. NaPyr	10mM	0.446g
9. Hepes	50mM	1.2g ó 5ml (Hepes 1M)
10. TRIS	10mmol	0.121g
11. Aproptinina	(1µg/µl)	100µl (de un stock a 10µg/ml)
12. Pepsatina	(5µg/µl)	200µl (de un stock a 10µg/ml)
13. Leupeptina	(5µg/µl)	20µl (de un stock a 1µg/ml)

*PMSF* (Phenylmethanesulfonylfluoride), *PAO* (Phenylarsine oxide), *NaVO<sub>3</sub>* (Orto vanadato sódico), *NaPyr* (Pirofosfato sódico)

*Nota: Inhibidores de proteasas: Leupeptina, Pepsatina, Aproptinina, PMSF.*

*Inhibidores de fosfatasa: NaF, NaVO<sub>3</sub>, NaPyr*

**Las soluciones utilizadas fueron las siguientes**

**10X Solución Ripa**

	<u>500ml</u>	<u>[ ] final</u>
TRIS HCl pH8 (1M)	50ml	100mM
EDTA (M 372.24)	1.86g	10mM
EGTA	1.90g	10mM
NaF	0.21g	10mM

**“High Ripa Salt”**

	<u>100ml</u>	<u>[ ] final</u>
NaCl (M58.44, 99.7%)	2.93g	0.5M
TRITON (x100)	1ml	1%
BSA	100mg	1mg/ml
RIPA 10X	10ml	1X

**“Low Ripa Salt”**

	<u>100ml</u>	<u>[ ] final</u>
NaCl	0.87g	0.15M
DOC	0.2g	0.2%
BSA	100mg	1mg/ml
SDS(10%)	0.5ml	0.05%
RIPA 10X	10ml	1X

**TNE (Vf=500ml)**

TRIS 50mM	25ml a 1M
NaCl 150mM	15ml a 5M
EDTA 5mM	5ml a 0.5M

**Protocolo:**

Protocolo para un frasco de 75 cm<sup>2</sup>.

- Lavar 3 veces las células con PBS.
- Disolver 2 mg de Biotina en 4 ml de PBS y añadirsele al cultivo celular, incubar durante 20 minutos a 4°C.
- Retirar la solución de biotina y bloquear con RPMI sin suplementos, durante 10 minutos a 4°C.
- Retirar el RPMI y lavar de 1 a 2 veces con PBS frío.

- e) Adicionar 1 ml del tampón de lisis, y con ayuda de un “scraper” desenganchar las células de la base del frasco y transferirlas a un eppendorf. Incubar durante 20 minutos a 4°C.
- f) Se obtiene el lisado celular por centrifugación a 14 000 rpm durante 20 minutos y a 4°C. *Nota: En este punto, se puede guardar el lisado congelándolo a -80 °C o seguir con el proceso de inmunoprecipitación.*
- g) Los lisados son sometidos a un proceso de “pre-clearing” para minimizar uniones inespecíficas. Los lisados son incubados con 30 µl de bolas *sepharosa* unidas proteína-A previamente hidratadas con PBS, durante 30 minutos a 4°C con movimientos rotatorios. Repetimos este proceso 3 veces. En el segundo y tercer lavado adicionamos un anticuerpo irrelevante.

*Nota: Para hacer los “pre-clearing” se da un pulso a máxima revolución (aprox. 12000 rpm), se recoge el sobrenadante en un eppendorf limpio y se adiciona de nuevo los 30µl de bolas de sepharosa, se agita con el vortex y de nuevo realizamos un periodo de incubación. Con esta serie de lavados minimizamos la formación de uniones inespecíficas entre antígeno-anticuerpo, antígeno-bolas de sepharosa proteína A.*

- h) Para la inmunoprecipitación de la proteína de interés, los lisados son incubados con 10 µg del anticuerpo correspondiente (optimo entre 2-10µg de anticuerpo). Se deja durante 4 horas o toda la noche a 4 °C con movimientos giratorios (norria).
- i) Se lavan las bolas de *sepharosa*- proteína A con 2 ciclos de RIPA High seguidos de RIPA Low, seguidos de 2 lavados con TNE.

<b>1) X2</b>	- 1ml RIPA high	<b>2) X2</b>	- tampón TNE
	- <b>vortex</b>		- <b>lavar</b>
	- <b>pulso y sacar SN</b>		
	- 1 ml RIPA low		
	- Idem		

*Nota: Para lavar se da un pulso a máxima revolución (aprox. 12000 rpm), se elimina el sobrenadante y se adiciona 1 ml de las soluciones de lavado correspondientes, se agita con el vortex y de nuevo realizamos un pulso.*

- j) Adicionar 35  $\mu$ l de tampón de carga a cada muestra. Las muestras son desnaturalizadas a 100°C durante 10 minutos (en este punto las muestras se pueden guardar congeladas a -80°C o seguir con la electroforesis).
- k) Finalmente los precipitados son separados mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE

### 3.4.2. Electroforesis de proteínas

#### 3.4.2.1. Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

##### Materiales:

- Tampón de electroforesis: para preparar 1 litro de solución 10X (30g de Tris Base, 144g de Glicina y 10g de SDS)
- Tampón de carga: para preparar 50ml a una concentración de 3X (10ml de Tris 6.8 1M, 3g de SDS, 15ml de glicerol, 2.5ml de  $\beta$ -mercaptoetanol y Azul de Bromofenol). *Nota: Las muestras puede interesar reducirlas o no. El  $\beta$ -mercaptoetanol es el agente reductor si no se quieren utilizar condiciones reductoras no adicionar al tampón de carga.*
- Marcador de pesos moleculares (Bio-Rad ref 1610318)
- Los geles fueron preparados en lámina (“slab”) para electroforesis vertical de tipo discontinuo (gel apilador y gel separador). El tamaño del gel fue variable dependiendo de los requerimientos experimentales; habitualmente, se utilizaron placas de 10 x 8 cm (ancho x altura) y con un espesor de 0.75-1.5 mm
- Las placas, peines y espaciadores se lavaron con agua, se secaron y se desengrasaron con etanol. Para la electroforesis se utilizaron aparatos y sistemas comerciales (Hoefer-Biorad)
- Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Reactivos	gel resolutivo 12%	gel empaquetador
Poliacrilamida	4 ml	750 $\mu$ l
TRIS 1M	3.7ml (pH8.8)	625 $\mu$ l (pH6.8)
H <sub>2</sub> O	2.23ml	3.5ml
SDS 10%	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS 20%	150 $\mu$ l	70 $\mu$ l
Temed	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<i>Total volumen</i>	<i>10ml</i>	<i>5ml</i>

Tris, trietanolamina; SDS, sodio dodecilsulfato; APS, persulfato de amonio; TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamida.

*Nota: según el porcentaje del gel que queramos, variaremos el volumen de poliacrilamida y H<sub>2</sub>O. Por ejemplo: geles del 10%: 3.3ml de poliacrilamida y 2.9ml de H<sub>2</sub>O; geles del 8%: 2.65ml poliacrilamida y 3.6ml de H<sub>2</sub>O.*

### **Protocolo:**

- a) Primero se prepara el gel separador y se vierte entre las placas de vidrio, se deja reposar en posición vertical hasta que polimerice. El oxígeno es un inhibidor de la polimerización, por esta razón se añade suavemente agua o etanol, lo suficiente para cubrir el gel (unos 150µl). Cuando el gel polimeriza (15 minutos aprox.) se vierte el agua o el etanol. Luego se añade el gel apilador y se inserta el peine para formar los pozos, procurando que no queden burbujas de aire atrapadas, se deja polimerizar durante 5-10 minutos. Se retira el peine y se lavan los pozos con tampón de electroforesis.
- b) Una vez preparado el gel se cargan las muestras previamente preparadas.

*Nota. Las condiciones de corriente son aproximadamente de 120 V constantes (aprox. 50mA/gel).*

### **3.4.2.2. Detección de proteínas (Western-Blott)**

#### **Materiales:**

- Tampón de transferencia: para preparar 2 litros de Tampón; 6g Trizma, 28.84g Glicina, 1g SDS (ó 10 ml SDS 10%), 400 ml de Metanol. Este Tampón puede ser reutilizado 2-3 veces.
- Solución de lavado: TTBS 1X: Para preparar 1litro de solución 10X (24 g de Tris, 80g de NaCl, y 20ml de Tween-20. Ajustar el pH a 7.6)
- Solución de bloqueo: TTBS 1X con 5% de leche desnatada.
- “Stripping buffer”: 2% SDS, Trizma pH 2-3, 5% Tween-20
- Kit de quimioluminiscencia ECL (Pierce ref 34080)

- Si se trata de muestras biotiniladas: Avidina peroxidasa (Roche ref. 1089153)
- Si se trata de muestras no biotiniladas: anti-mouse peroxidasa (Dako ref. P 0260)
- Casset para el revelado
- Películas (Curix RP-2, AGFA)

**Protocolo:**

- a) Finalizada la electroforesis se monta el sistema húmedo para transferir las proteínas del gel a la membrana; para ello se siguen los siguientes pasos:
- a.1. Sobre una mesa limpia y lisa, se colocan 2 hojas de papel Whatman 3MM empapadas con tampón de transferencia.
  - a.2. Se cubre con una membrana de nitrocelulosa (PVDF), previamente tratada con metanol durante 1 minuto, e hidratada con Tampón de transferencia.
  - a.3. Sobre la nitrocelulosa se coloca el gel previamente humedecido con el tampón de transferencia. Tener cuidado de que no queden atrapadas burbujas de aire entre la nitrocelulosa y el gel.
  - a.4. Seguidamente se cubre el gel con 2 hojas de papel Whatman 3MM humedecidas con tampón de transferencia. Se pasa un tubo como rodillo para asegurarse que no queden burbujas de aire en el sándwich.
  - a.5. Sobre uno de los soportes de transferencia, se coloca una esponja humedecida con tampón de transferencia.
  - a.6. Se coloca el “sándwich” del paso “a.4”, sobre la esponja del paso “a.5” y finalmente se cubre con otra esponja también humedecida con el tampón de transferencia. Se cubre con el soporte de acrílico del equipo de transferencia y se introduce con cuidado de no mover o perturbar los elementos del sándwich.
- b) El sándwich en la cubeta debe estar cubierto con tampón de transferencia al menos lo suficiente para cubrir el gel y la membrana. Tener cuidado con la polaridad, para transferencia de geles de SDS, la migración a la membrana es de cátodo a ánodo. Por lo general la transferencia se realiza a amperaje constante (aprox. 0.3 mA), el voltaje está regulado por el amperaje, el tiempo de transferencia es de 45-60 minutos, con agitación magnética en la cámara fría (4°C aprox.). El tiempo de transferencia depende del porcentaje del gel y del tamaño de las proteínas a transferir. *Nota: Para geles de aprox. 10x8 cm, con proteínas aprox. de 50Kd, las condiciones que utilizamos fueron de amperaje constante (aprox. 0.3 mA) durante 1h.*

- c) Desmontar el sándwich y lavar la membrana con TTBS 1X.
- d) Bloquear la membrana con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación constante.
- e) Lavar la membrana con TTBS 1X durante 5 minutos para retirar el exceso de albúmina o leche desnatada.

A partir de este punto la detección de la proteína será diferente según si la muestra ha sido previamente marcada (con biotina) o no.

#### **3.4.2.2.1. Muestras previamente biotiniladas**

- a) Incubar la membrana bloqueada con una solución de Avidina peroxidasa (dilución 1/5000 en PBS), durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- b) Lavar la membrana 3 veces con TTBS 1X, cada lavado se recomienda que sea mínimo de 5 minutos en agitación circular (“Shaker”) y con un volumen suficiente para que cubra toda la membrana.
- c) La detección de la proteína es realizada haciendo uso del substrato de kit de quimioluminiscencia ECL.

#### **3.4.2.2.2. Muestras no biotiniladas**

- a) Añadir el anticuerpo primario diluido en TTBS 1X, a la concentración recomendada, incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
- b) Lavar la membrana, 2 veces con TTBS 1X durante 5 minutos cada vez en agitación.
- c) Incubar la membrana con el segundo anticuerpo comercial, el cual está conjugado con peroxidasa (dilución 1/10000 en TTBS 1X). Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- d) Lavar 2 veces con TTBS 1X, durante 10 minutos cada vez.
- e) La detección de la proteína es realizada haciendo uso del substrato del Kit de quimioluminiscencia ECL.

Colocar la membrana en el casset. Exponer la membrana a una película y revelar. El tiempo de exposición depende de la intensidad de la señal. Si no se tienen datos previos

se recomienda hacer una primera exposición de 1 minuto y revelar, según el resultado modificar el tiempo de exposición.

*Nota: Las membranas después de haber sido transferidas, y antes de ser bloqueadas pueden ser conservadas durante un cierto periodo de tiempo a 4°C en TTBS 1X.*

### **3.4.2.2.3. Eliminación de anticuerpos de la membrana “Stripping”.**

El anticuerpo secundario y primario pueden ser eliminados de la membrana para realizar un segundo marcaje en la misma membrana.

#### **Reactivo:**

- Solución de “Stripping”: 2% SDS, Trizma pH 2-3, 5% tween-20.

#### **Protocolo:**

- a) Sumergir la membrana en la solución de “Stripping” y dejar agitándola intensamente durante unos 20 minutos. Es recomendable a los 5 minutos cambiar la solución de “Stripping” para asegurarnos un pH ácido. *Nota: se ha de añadir el volumen necesario para que quede bien cubierta la membrana.*
- b) Lavar la membrana dos veces durante 2 minutos cada vez, con TTBS 1X, agitando suavemente.
- c) Bloquear la membrana y continuar con el protocolo de detección

## **3.5. Citometría de Flujo**

### **3.5.1. Inmunofluorescencia indirecta**

#### **Reactivos, materiales y aparatos:**

- Antisuero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón fluoresceinado (Caltag ref. M35001.)
- Streptavidina PE-Cy5: (Pharmlingen ref. 554062)
- Tampón de lavado: PBS 1X, 2% suero fetal de ternera, 0.01% azida sódica. Mantener a 4°C
- Tampón de fenotipado: Al tampón de lavado se le adiciona 5-15 % de suero de conejo previamente inactivado por calor (30 minutos a 56°C). Con este tampón



diluiremos tanto las células como el antisuero. La utilización del suero de conejo nos permite bloquear los posibles sitios de unión de los anticuerpos a través de la región Fc.

- Citómetro de Flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systes, San Jose, CA. Equipado con el programa CellQuest™)

#### **Procedimiento:**

- a) Lavar las células 2 veces con aprox. 4 ml de tampón de lavado (4min a 1600rpm)
- b) **1º Incubación:** Adicionar al “pelet” de células, previamente resuspendidas en 50µl de tampón de fenotipado, los anticuerpos primarios correspondientes, si utilizamos sobrenadantes adicionar 50µl. Incubar aproximadamente durante 30 minutos a 4°C.  
*Nota: se recomienda utilizar  $0.5 \times 10^6$  células por marcaje (tubo).*
- c) Lavar una vez las células con el tampón de lavado
- d) **2º Incubación:** Incubar las células con 50µl durante 30 minutos a 4°C con un antisuero conjugado con FITC o con una Streptavidina conjugada a PE-Cy5 si en la primera incubación hemos utilizado anticuerpo biotinilados.
- e) Lavar una vez las células con el tampón de lavado
- f) Adquisición y análisis mediante un citómetro de flujo.

*Nota: utilizamos el canal FL-1 para el fluorocromo FITC y el canal FL-3 para el fluorocromo PE-Cy5. Con la combinación de estos dos fluorocromos podríamos hacer un doble marcaje sin necesidad de compensar. Se adquirió un mínimo de 5000 células de la población de interés, la fluorescencia fue cuantificada en escala logarítmica. Los controles negativos se situaron en un valor de intensidad de fluorescencia de 5.*

### **3.5.2. Determinación cuantitativa de F-actina.**

Para la determinación cuantitativa de F-actina se utilizó el reactivo Phalloidina conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes ref A12379). La phalloidina se une de manera específica a los filamentos de F-actina.

El protocolo que seguimos fue similar al explicado en el apartado 3.5.1, previa permeabilización celular para permitir el marcaje intracelular de la Phalloidina (5µl/tubo).

### 3.5.2.1. Permeabilización celular

- a) Lavar las células con tampón de lavado (4 min a 1600rpm)
- b) **Fijación:** incubar las células durante 10 minutos a temperatura ambiente con 200-400µl de formaldehído 3.7%.
- c) Añadir PBS hasta arriba del todo del tubo y centrifugar
- d) **Permeabilización:** Incubar las células con una solución de PBS + Tritón 0.1% durante 3-5 minutos a temperatura ambiente.
- e) Añadir PBS hasta arriba del todo del tubo y centrifugar
- f) **Bloqueo:** Incubar las células durante 30 minutos con una solución de PBS-BSA 1%.  
*Nota: Se recomienda adicionar 100µl/tubo, para después añadir los reactivos correspondientes sin tener que volver a centrifugar*

*Nota: Si se realiza un doble marcaje, y un antígeno es de membrana y el otro es intracelular, primero se realiza el marcaje del antígeno de membrana, después se permeabiliza la célula (Ver apartado 3.5.2.1), y finalmente se realiza el marcaje del antígeno intracelular.*

## 3.6. Microscopía de fluorescencia

### 3.6.1. Microscopía de fluorescencia confocal

Microscopio utilizado: Leica TCS NT, Heidelberg, Germany

#### 3.6.1.1. Inmunocitoquímica

##### **Materiales:**

- Cubre-objetos circulares. Si plantamos las células en placas de 24 se precisa cubre-objetos de un diámetro de 13mm (Aname ref. 72280)
- Solución de bloqueo: PBS + 2% BSA. Con esta solución también diluiremos los anticuerpos

- Antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Cy3 rat ads (Jackson Lab ref 115-165-100). *Nota: es conveniente, para evitar problemas de inespecificidad, que el antisuero que utilizamos este previamente preabsorbido con inmunoglobulinas de la especie con la que estemos trabajando.*
- Paraformaldehido (se recomienda tener un stock de paraformaldehido al 20% congelado)
- Fluoromount-G (Southern Biotechnology ref. 0100-01)

**Protocolo:**

- a) Lavar las células con una solución de PBS + 2% de suero fetal durante 5 minutos agitando circularmente (“*Shaker*”) (1ml/pozo).
- b) **Fijación:** incubar las células con PBS + 4% paraformaldehid durante 10 minutos a 4°C (500µl/pozo).
- c) Lavar 2 veces las células con PBS durante 5 minutos cada vez y agitando circularmente.
- d) **Bloqueo:** Incubar las células con la solución de bloqueo durante mínimo 15 minutos a temperatura ambiente.
- e) Lavar 2 veces con PBS.
- f) **1ª Incubación:** Incubar con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- g) Lavar 2 veces con PBS.
- h) **2ª Incubación:** Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- i) Lavar 2 veces con PBS.
- j) Montar con Fluoromount-G (dejar caer una gota sobre el portaobjetos y montar encima el cubreobjetos con las células), dejar secar 30 minutos, en ausencia de luz con el fin de no perder la fluorescencia. Las imágenes son observadas y analizadas en el microscopio confocal. Estas pueden permanecer guardadas a 4°C durante varios meses.

### 3.6.1.2. Inmunohistoquímica

#### **Materiales:**

- Biopsias de tejido hepático, de aproximadamente del tamaño de medio dado, y si fuera posible que proviniesen de lóbulos diferentes.
- Medio de congelación de tejidos (OTC) (Jung ref. 0201 08926)
- Sacarosa al 33% (preparar un stock al 88%)
- Silane (Sigma ref. A3648)
- Acetona
- Solución de bloqueo: PBS + 2% BSA. Con esta solución también diluiremos los anticuerpos
- Antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Cy3 rat ads. (Jackson Lab ref 115-165-100). *Nota: es conveniente, para evitar problemas de inespecificidad, que el antisuero que utilizamos este previamente preabsorbido con inmunoglobulinas de la especie con la que estemos trabajando.*
- Paraformaldehido (se recomienda tener un Stock de paraformaldehido al 20% congelado)
- Dispensador de disolvente hidrófobo (Dako ref. S-2002)
- Fluoromount-G (Southern Biotechnology ref. 0100-01)
- Criostato

#### **Protocolo:**

- a) Extraer las biopsias del tejido de hepático, y lavar con suero fisiológico para retirar el exceso de sangre.
- b) **Fijación:** Fijar las muestras colocándolas en un tubo de 15ml con 10 ml de paraformaldehido al 2% en PBS (1ml paraf.20% en 9ml PBS) durante 1 h a 4°C.
- c) **Crioprotección:** colocar las muestras en un tubo con 10ml de solución de sacarosa al 33% [3.5ml(88%)/6.5mlPBS  $\Rightarrow$  10ml sol.sacarosa al 33%] dejar toda la noche a 4°C o hasta que las muestras bajen al fondo del tubo.
- d) **Congelación:** El proceso ha de ser rápido, se recomienda utilizar nitrógeno líquido y sino se puede realizar la congelación sobre nieve carbónica colocando las muestras sobre una placa de cobre. Las muestras en este punto pueden guardarse a -80 °C hasta que se precisen.

e) **Realización de los cortes con el criostato:**

- Preparación de los porta-objetos pre-tratados con silane
  - 7' en acetona + 2-4% silane
  - 5' en acetona
  - 5' en H<sub>2</sub>O (X2)

Hay que ir agitando circularmente las cubetas (“Shaker”).

*Nota: Conviene pre-tratar los portaobjetos el día de antes para que se sequen bien.*

- Embeber las muestras congeladas con OTC
  - Realizar cortes con el criostato de entre 5-10µm y recogerlos con los portaobjetos pre-tratados con el silane.
  - Dejar los cortes planos a temperatura ambiente 20 minutos para que se sequen.
- f) Con un disolvente hidrófobo (Dako pen) realizar un círculo cerrado alrededor de cada muestra.
- g) **Hidratación:** Hidratar los cortes durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente.
- h) **Fijación:** Fijar las muestras con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a 4°C (100µl/muestra) (stock de paraformaldehído al 20% ⇒ dilución 1/5 ⇒ 1ml paraformaldehído 20% / 4ml PBS).
- i) Lavar las muestras 3 veces con .PBS (5 minutos cada lavado y en agitación).
- j) **Permeabilización:** Cubrir la muestra con PBS + 0.1% TRITON durante 15 minutos a temperatura ambiente (si se quieren realizar marcajes intracelulares).
- k) Lavar 2 veces por inmersión con PBS. *Nota: Para los lavados podemos utilizar cubetas que llevan incorporados unos soportes para 12 portaobjetos, las cubetas se llenan de PBS se sumerge el soporte con los portaobjetos y se dejan en agitación circular durante 5 min.*
- l) **Bloqueo:** Incubar las muestras con una solución de PBS +BSA 2-3% durante mínimo 15 minutos a temperatura ambiente.
- m) Lavar 2 veces con PBS.
- n) **1ª Incubación:** Incubar las muestras con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1-2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (100µl/muestras).
- o) Lavar 2 veces con PBS.

- p) **2ª Incubación:** Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45min-1h a temperatura ambiente.
- q) Lavar 3 veces con PBS
- r) Montar con Fluoromount-G (dejar caer una gota sobre el cubreobjetos y colocarlo sobre el portaobjetos con las muestras), dejar secar 30 minutos, en ausencia de luz con el fin de no perder la fluorescencia. Las imágenes son observadas y analizadas en el microcopio confocal. Estas pueden permanecer guardadas a 4°C durante varios meses.

*Nota: durante todo el proceso hay que procurar que las muestras no se sequen, conviene realizar todas las incubaciones en una atmósfera húmeda. Si las muestras se secan podemos tener problemas de autofluorescencia.*

### 3.6.1.3. Marcaje de las fibras de actina.

#### Reactivos:

- Phalloidin conjugada con TRITC

#### Protocolo:

- a) Lavar las células 2 veces con PBS.
- b) Fijar las muestras con una solución de formaldehído al 3.7% v/v en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- c) Lavar 2 o más veces con PBS.
- d) **Permeabilizacion:** colocar cada cubre en una placa de petri y tratar con una solución de Triton X-100 al 0.1 % (10µl/10ml) en PBS entre 3 y 5 minutos.
- e) Lavar 2 o más veces con PBS.
- f) **Bloqueo:** preincubar las células fijadas con una solución de PBS + 1% BSA durante 20-30 minutos.
- g) Lavar 1 vez con PBS.
- h) **Marcaje:** Añadir la solución de Phalloidin conjugada con TRITC (0.15 µM Phalloidin-TRITC en PBS 1% BSA). Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (en general, cualquier temperatura entre 4°C y 37°C es apropiada). Para evitar evaporaciones, incubar en una atmósfera húmeda.
- i) Lavar 2 o más veces con PBS.

- j) Montar con Fluoromount-G (dejar caer una gota sobre el portaobjetos y encima montar el cubreobjetos con las células), dejar secar el medio de montaje durante 30 minutos, en ausencia de luz con el fin de no perder la fluorescencia. Las imágenes son observadas y analizadas en el microscopio confocal. Estas pueden permanecer guardadas a 4°C durante varios meses.

#### 3.6.1.4. Ensayo de movilización de calcio

##### Reactivos:

- Placas de cultivo de 6 pozos o placas de petri de 9 cm<sup>2</sup>
- Cubre-objetos circulares. El diámetro a de ser el adecuado a la cámara donde se vaya a realizar los experimentos en el microscopio de confocal, en nuestro caso los cubre-objetos tenían un tamaño de 22 mm (Aname ref 72224-01)
- Fluo-4 acetoximetil ester (Fluo-4-AM): (Molecular Probes)
- Ácido Pluorónico: (Molecular Probes)
- Solución de lavado: DMEM + 25 mM de HEPES

##### Protocolo:

##### *Carga de las células con Fluo-4:*

- a) Lavar las células con la solución de lavado. *Nota: Es importante que este medio no contenga suero fetal porque las esterasas presentes en el fetal podrían cortar el grupo acetoximetil (AM) que esta unido al Fluo-4.*
- b) Incubar las células con 3µM de Fluo-4 acetoximetil ester y 0.02% de ácido Pluorónico.

1.5ml medio + :

- **Fluo-4-AM: 4.5µl** (del stock 1mM)
- **Acido Pluorónico: 3µl** (del stock 10%)

*Nota: Hay que mezclar bien el Fluo-4-AM y el Ac. Pluorónico en un eppendorf con una pipeta y después añadirlo al medio. El grupo acetoximetil (AM) da solubilidad al Fluo-4 para que entre dentro de la célula. El ácido Pluorónico es un detergente que permite*

solubilizar el Fluo-4, ya que este es muy poco soluble. Una vez dentro de la célula las esterasas presentes en el citoplasma cortan el grupo AM y el Fluo-4 queda retenido dentro de la célula.

c) Esperar 30 minutos a temperatura ambiente o 15 minutos a 37°C.

*Nota: Es el tiempo óptimo para que entre el Fluo-4 dentro de la célula. Se recomienda cargar a temperatura ambiente porque no interesa una entrada a la célula por medio de endosomas ya que estos tienen en su interior muchas esterasas que cortarían el grupo AM quedando retenido el Fluo-4 dentro de ellos y no permitiendo una distribución uniforme por todo el citoplasma. Por tanto, es mejor cargar a RT para bajar la actividad de los endosomas y favorecer una entrada a la célula de forma pasiva y uniforme.*

d) Desesterificación: incubar 10 minutos las células con DMEM. Durante este tiempo se da tiempo a que las esterasas intracelulares corten el grupo AM y el Fluo-4 quede retenido en el interior de la célula.

e) Lavar con DMEM 3 veces. *Nota: estos 3 lavados son importantes para eliminar el grupo AM libre que sale fuera de la célula y es tóxico.*

#### ***Mediciones de los niveles de calcio intracelular***

a) Colocamos el cubre-objetos con las células cargadas con el Fluo-4 en la cámara y añadimos 300 µl medio.

b) Visualizamos las células cargadas con un objetivo de 40X y aceite de inmersión. Las imágenes se adquieren cada 3 segundos.

c) Grabamos un basal de 5 minutos o hasta que las células se estabilicen

d) Añadimos a la cámara el estímulo correspondiente en un volumen de 200 µl. *Nota: El volumen final en la cámara será es este punto de 500 µl, hay que tenerlo en cuenta para adicionar la concentración deseada del estímulo.*

e) Grabamos unos 10 minutos o según perfil.

f) Adicionamos Ionomicina (10 µM) en un volumen de 200 µl. Será nuestro control positivo. De este modo verificamos, que las células son respondedoras.

g) Adicionamos EGTA (1.5 mM) (es opcional).



h) Análisis: se determinan las regiones de interés (ROI). Los cambios en la concentración intracelular de calcio se determinan según el ratio de fluorescencia  $F/F_0$ . Donde F es la intensidad de fluorescencia en un momento determinado del Fluo-4, y  $F_0$  es la intensidad de fluorescencia base. *Nota: El Fluo-4 emite fluorescencia cuando se une al calcio intracelular.*

### 3.7. Microscopía de Tracción

La microscopía de tracción nos permite cuantificar la tracción ejercida por una célula sobre su sustrato en respuesta a un determinado estímulo.

#### **Materiales:**

##### *Activación de los cubres*

- N NaOH o bien Alcohol ácido
- 3-aminopropyltrimethoxysilane. (Sigma ref. 28177-8)
- 10 % Glutaraldéhid (diluido en PBS)
- Plus One Repel-Silane ES. (Amersham ref. 17-1332-01 o cualquier otro silane repelente que se utilice para hacer los geles de Western Blot)

##### *Preparación de los geles*

- 40% Acrylamide solution. (BioRad ref. 161-0140, 500 ml)
- 2% Bis solution. (BioRad ref. 161-0142, 500 ml)
- Fluorescent latex beads (Molecular Probes) En nuestros experimentos se utilizó las F-8811, que tiene un tamaño de 200 nm y emiten en amarillo-verde. El tamaño ha de ser este, pero el color puede ser el que más interese.
- 10 % Persulfat de Amonio. (BioRad ref.161-0700)
- TEMED. (Sigma ref.T-9281)

##### *Activación de los geles*

- Sulfo-SANPAH. (Pierce-Cultek ref. 22589). 10 mM (5mg/ml) en 1:20 (DMSO:HEPES). Preparación: diluir primero 5 mg de sulfo-SANPAH en 50  $\mu$ l de DMSO y añadir después 950  $\mu$ l de HEPES 200 mM
- PBS/HEPES 2X
- Colágeno I (0.2 mg/ml)

**Medidas de tracción**

- Tripsina-EDTA 10X. (Sigma ref. T-4174)
- Medio ISCOVE sin rojo fenol (Invitrogen)

**Protocolo:****1. Activación de los cubres**

- a) Sumergir los cubres en 0.1 N NaOH o bien en alcohol ácido. Dejar secar mediante un flujo de aire.
- b) Untar los cubres con 3-aminopropyltrimethoxysilane y dejar secar durante 5 minutos.
- c) Sumergir los cubres en agua destilada durante 5 minutos hasta que desaparezca la capa formada por el silane.
- d) Agitar los cubres en otro recipiente con agua destilada durante 10 minutos. Utilizar un agitador orbital.
- e) Agitar los cubres en un recipiente con 10% glutaraldéhidido durante 30 minutos.
- f) Lavar los cubres con agua destilada.
- g) Secar los cubres mediante un flujo de aire.
- h) Por otro lado, los cubres que servirán de “tapa” de los geles se han de tratar con un silane repelente para posteriormente poderlos desenganchar mas fácilmente.

**2. Preparación de los geles**

- a) Preparar la mezcla de acrilamida y bis en agua destilada según las concentraciones deseadas.
- b) Añadir las *beads* fluorescentes a una concentración 1/125 volumen.
- c) Sonicar la mezcla (en caso de no disponer de un sonicador, agitar en un vórtex).
- d) Añadir el persulfato de amonio 10% a una concentración 1/200 volumen.
- e) Añadir el TEMED a una concentración 1/2000 volumen.
- f) Poner el volumen deseado de poliacrilamida sobre el cubre tratado.
- g) Cubrir la mezcla con el cubre tratado con el silane repelente.
- h) Colocar el “sándwich” boca abajo y mantenerlo durante 40 minutos en una atmósfera húmeda.
- i) Cuando gelifique, sacar el cubre que hace de tapa con mucho cuidado.
- j) Guardar los cubres con el gel de poliacrilamida en una placa de petri con agua a 4°C hasta que se quieran activar.

### **3. Activación de los geles**

- a) Sacar el agua de la placa de petri.
- b) Añadir sulfo-SANPAH sobre la superficie del gel (el volumen necesario para cubrir toda la superficie).
- c) Iluminar el gel durante 5 minutos con luz ultravioleta. Colocar el gel a 15 cm de la fuente de luz. Se puede utilizar la fuente de UV de la campana de cultivos.
- d) A partir de este punto se ha de trabajar en condiciones estériles.
- e) Lavar los geles con PBS/HEPES dos veces.
- f) Recubrir los geles con colágeno I.
- g) Dejar actuar durante 2-4 horas a 4°C.

### **4. Cultivo de las células**

- a) Eliminar los restos de colágeno lavando con PBS.
- b) Cultivar las células según el procedimiento habitual. Utilizar una concentración de células muy baja para asegurarse que se plantan muy aisladas. Las células se han de plantar con antelación suficiente para garantizar que estén bien adheridas en el momento del experimento.
- c) En algún momento anterior al inicio del experimento el medio se ha de sustituir por un medio sin suero (opcional según la actividad de la células) y sin rojo fenol (ej. Medio ISCOVE sin rojo fenol).

### **5. Protocolo de medidas**

- a) Colocar el gel con las células sobre la platina del microscopio.
- b) Seleccionar una célula aislada y que parezca estar bien adherida.
- c) Adquirir una imagen de campo brillante o contraste de fase de la célula.
- d) A partir de este momento no se podrá mover la platina en el plano X-Y.
- e) Adquirir una imagen de fluorescencia de la superficie del gel.
- f) Realizar las medidas que interesen, añadiendo los diferentes estímulos.
- g) Durante el experimento se podrá mover el objetivo por si hace falta reenfocar la superficie del gel, nunca en este punto mover la platina.
- h) Al final del experimento, añadir tripsina 10X caliente y dejar actuar.
- i) Desenganchar la célula con un chorro de medio, utilizando una micropipeta.
- j) Comprobar que la superficie sigue enfocada y reenfocar si hace falta, adquirir una imagen de la superficie del gel relajado.

El formato en el que se han de registrar las imágenes es el siguiente: {

- Digitalización: 16 bits
- Tamaño: 1024x1024 píxeles
- Objetivo: 40X

## 3.8. Purificación de proteínas reconocidas por anticuerpos

### 3.8.1. Unión de anticuerpos monoclonales a bolas de Sepharosa CNBr-activadas

Las bolas de Sepharosa CNBr-activadas, nos permiten la unión covalente de ligandos que contengan aminas primarias. La reacción es espontánea, rápida y fácil de llevar a cabo.

#### Reactivos:

- Bolas de *Sepharosa* CNBr-activadas 4B: (Amersham ref.17-0430-01)
- Solución de activación de las bolas: 1mM HCl [42.5µl de HCl en 0.5l H<sub>2</sub>O (HCl: pureza: 36.6%, ρ.1.16Kg/l)].
- Solución de unión: 0.1M Tampón carbonato + 0.5M NaCl pH 8.3-9 (para preparar 0.5 litros: 3.78g de NaHCO<sub>3</sub>, 0.5g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 14.6g de NaCl)
- Solución de Bloqueo de grupos reactivos: 0.1M TRIS.HCl pH 8 (para preparar 0.5 litros: 6.05g de Tris.)
- Solución de eliminación de uniones electrostáticas (no covalentes):
  - o 0.1M TRIS-HCl + 0.5M NaCl pH 8 (para preparar 0.5l: 6.05g de Tris y 14.5g NaCl)
  - o 0.1M de acetato sódico + 0.5M NaCl pH 4: (para preparar 0.5 litros: 4.1g Na<sub>2</sub>H<sub>3</sub>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O y 14.5g de NaCl)

*Nota: Los reactivos utilizados para preparar las soluciones fueron de Sigma*

#### Protocolo:

- a) Dializar los anticuerpos a unir frente a 2 litros de tampón de unión durante toda la noche a 4°C realizando al menos un par de cambios. Determinar la concentración aproximada de proteínas (anticuerpo) en dicho dializado.

- b) Pesar la cantidad necesaria de polvo seco liofilizado. Las proporciones a tener en cuenta son las siguientes: 1g de polvo liofilizado (bolas de *sepharosa*) proporciona unos 3.5ml de gel hinchado y 1ml de gel hinchado permite unir entre 5 y 10mg de proteínas.

**Equivalencias:**

1g *sepharosa* -----3.5ml gel

1ml gel-----5-10mg Proteína (ej. Anticuerpo o BSA)

- c) *Activación de las bolas:* Resuspender el polvo con la solución de activación (HCl 1mM) y una vez hinchado, proceder a su lavado (2500rpm 4min). Es muy importante que la duración de todo el proceso de hinchado del gel con HCl no exceda los 15 minutos. *Nota: Utilizar tubos de 15ml, suele dar tiempo a 4 lavados.*
- d) Una vez transcurridos los 15 minutos, lavar 3 veces seguidas con tampón de unión (*mínimo 5x vol/gel*). Asimismo, disolver la solución proteica a ligar en tampón de unión y ponerla en contacto con el gel a razón de 5 ml de solución por gramo de polvo seco.
- e) Poner a rotar durante 2 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C. Utilizar sistemas de rotación suave, pero nunca de agitación magnética que podrían dañar las bolas de *sepharosa*.
- f) Centrifugar el tubo y recoger el sobrenadante para monitorizar su densidad óptica y calcular el rendimiento de unión de los anticuerpos a las bolas de *sepharosa*. Si no ha habido ningún problema la eficiencia de unión ha de ser aproximadamente de un 95%.
- g) Lavar el exceso de ligando con tampón unión (X2).
- h) Bloquear los grupos reactivos remanentes mediante su incubación durante 2 h a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C) con tampón Tris-HCl 0.1M pH 8 o con etanolamina 1M pH 9.
- i) Para eliminar posibles uniones electrostáticas realizar 3 ciclos de lavados con 0.1M Tris +0.5M NaCl pH 8 alternando con 0.1M Acetato sódico +0.5M NaCl pH 4.
- j) Lavar una vez con PBS y “maltratar la columna” realizando dos lavados con MgCl<sub>2</sub> 2M para eliminar la solución proteica que no se ha unido covalentemente.
- k) Hacer varios lavados con PBS y, finalmente, guardar las bolas de *Sepharosa* a 4°C resuspendidas en tampón PBS conteniendo Na<sub>3</sub>N 0.01% hasta el momento de su utilización.

*Nota: hay que tener en cuenta la cantidad necesaria que se necesitaran de los diferentes anticuerpos. Habrá que unir también anticuerpos irrelevantes que utilizaremos tanto para los pre-lavados de la inmunoprecipitación como de controles negativos. Si no se dispone de demasiado anticuerpo control, se puede sustituir por bolas de sepharosa unidas a BSA.*

### **3.8.2. Inmunoprecipitación**

Seguimos el protocolo descrito en el apartado **3.4.1** con algunas variaciones:

- Utilizaremos anticuerpos unidos covalentemente a bolas de sepharosa (ver preparación apartado **3.8.1**) en vez de anticuerpo unido a través de la proteína A. De esta manera minimizamos el riesgo de contaminación de la muestra con anticuerpo.
- En las soluciones de lavado evitaremos utilizar BSA.
- Después del lavado final con la solución de TNE realizaremos 2 lavados más con PBS y miraremos la O.D, si vemos que aun queda proteína seguiremos lavando hasta obtener una O.D aproximada de 0.008.

Todas estas variaciones se realizan con el fin de evitar cualquier posible contaminación en el momento de identificar la proteína por espectrometría de masas.

*Nota: Según inmunoprecipitaciones previas se ha de adecuar la cantidad de bolas necesarias. En nuestro caso utilizamos 200µl de bolas unidas al anticuerpo 14.27 a una concentración de 8mg Ac/ml de gel para aproximadamente  $40 \times 10^6$  células disueltas en 20 ml de tampón de lisis.*

### **3.8.3. Elución con TFA**

El TFA (ácido trifluoroacético) es un ácido volátil, lo que permite concentrar la proteína de un modo fácil después de la elución.

#### **Reactivos:**

- TFA (ácido trifluoroacético) (Merk ref.1.08262.0025)
- Minicolumnas de cromatografía: (Bio-Rad ref. 732-6204)

**Protocolo:**

- a) Poner 100µl de bolas procedentes de la inmunoprecipitación en una minicolumna y colocar debajo un eppendorf
- b) Añadir 200µl de TFA al 0.1% en agua, realizar un vórtex, esperar 3 minutos y realizar un pulso a 12.000 rpm.
- c) Repetir el paso anterior 3 veces más
- d) Al final habremos obtenido 800 µl de eluido (donde se encuentra nuestra proteína).
- e) Evaporar el TFA utilizando una centrifuga en la que se pueda hacer el vacío.
- f) Resuspender la proteína en 12 µl de tampón no reductor y añadir 1 µl de NaOH 1 N para neutralizar.

**3.8.4. Gel SDS-PAGE**

Ver apartado 3.4.2.1.

**3.8.5. Tinción de plata****Reactivos:**

- Etanol
- Acido acético glacial 100%. (Merck ref. 1.00066.0250)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : Tiosulfato sódico pentahidratado. (Merck ref. 1.06516.0500)
- $\text{Na}_2\text{H}_3\text{C}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : Acetato sódico. (Sigma ref. S-8625)
- $\text{AgNO}_3$ : Nitrato de plata. (Merck ref. 1.01512.0025)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : Carbonato sódico. (Sigma ref. S-7795)
- HCOH: Formaldehído en solución mínimo 37%. (Merck ref. 1.04003.100)
- $\text{EDTA-N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Ethylendiamine-tetracetic acid. (Sigma ref. E-5134)

**Preparación de los reactivos:**

1.Solución de fijación (40% Etanol, 10% Acido acético): Para preparar 2 litros: 800 ml de etanol, 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q y 200 ml de ácido acético glacial.

2.Solución de sensibilización (30% Etanol, 0.2 % w/v  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y 6.8% w/v Acetato sódico): Para preparar 2 litros: 600 ml de etanol, 4g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 136g de acetato sódico, disolver y añadir q.s.p 2 litros.

3.Solución de tinción (2.5g/l Nitrato de plata): Para preparar 500 ml: 1.25 g de  $\text{AgNO}_3$ , disolver y añadir q.s.p 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

4.Solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.5% w/v: Para 2 litros: 50g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  disolver y añadir q.s.p 2 litros.

5.Solución de revelado (2.5% Carbonato sódico y formaldehido 37%w/v): Para 500ml: 500 ml de la solución preparada en el apartado 4 y 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCOH}$  37%

6.Solución "stop" (1.46%  $\text{EDTA-N}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ): Para preparar 2 litros: 29.2 g  $\text{EDTA-N}_2.2\text{H}_2\text{O}$ , disolver y añadir q.s.p 2 litros de  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Nota: las soluciones 1, 2,3 y 5 se han de preparar el mismo día. Las soluciones 4 y 6 las podemos tener en stock. Todas las soluciones se preparan con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q.*

### **Protocolo:**

Después de la electroforesis:

- a) **Fijación:** Sumergir el gel en una solución del 40% etanol y 10% ácido acético durante 30 minutos y en agitación orbital.
- b) **Sensibilización:** Sumergir el gel en una solución del 30% etanol, 0.2%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y 6.8% acetato sódico durante 30 minutos y en agitación.
- c) Lavado: Lavar 3 veces el gel con agua milli-Q, cada lavado de 5 minutos mínimo de duración.
- d) **Tinción:** Sumergir el gel en una solución del 2.5% de nitrato de plata durante 20 minutos y en agitación.
- e) Lavado: Lavar 3 veces el gel con agua milli-Q, cada lavado de 5 minutos de duración.
- f) **Revelado:** Sumergir el gel en una solución del 2.5% Carbonato sódico y formaldehido 37%. Agitar y esperar a que se evidencien las bandas proteicas (entre 5-20 minutos)
- g) **Stop:** Sumergir el gel en una solución del 1.46%  $\text{EDTA-N}_2.2\text{H}_2\text{O}$  durante 10 minutos.
- h) Lavado: Lavar 3 veces el gel con agua milli-Q

*Todos los recipientes que se utilizan hay que lavarlos previamente con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q y metanol. Conviene manipular el gel lo mínimo posible para evitar posibles*



contaminaciones con queratinas. Precauciones como manipular el gel bajo campana y utilizar guantes, batas y gorro son aconsejables.

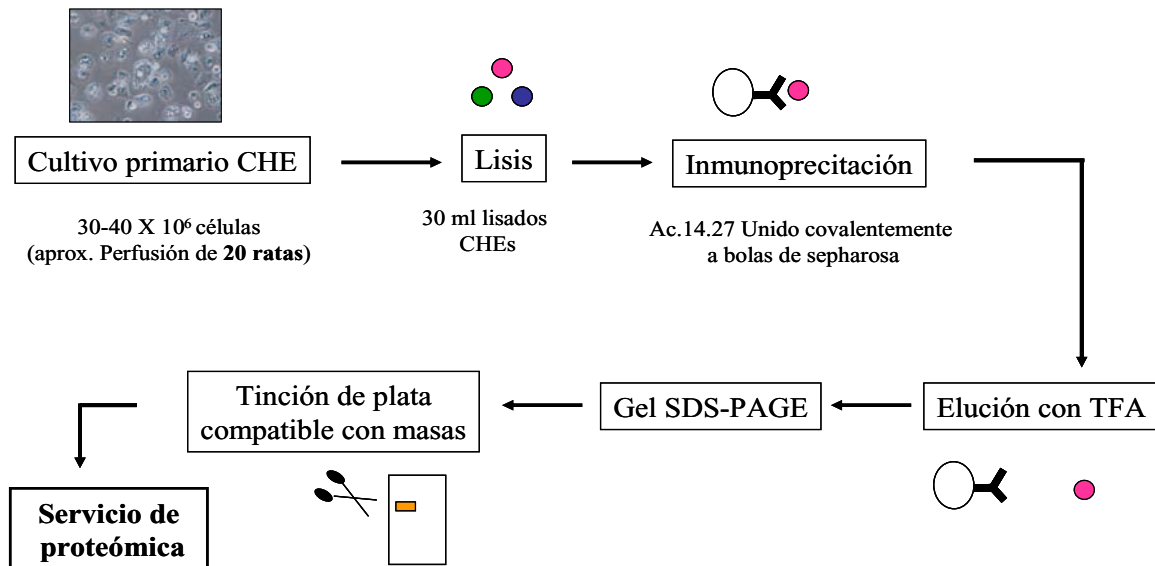


Figura 3-5 Representación esquemática del proceso de purificación de proteínas reconocidas por anticuerpos.

### 3.9. Inmunoensayos enzimáticos

#### 3.9.1. Elisa para la determinación de citocinas

##### Reactivos

- Placas para inmunoensayos de 96 pocillos
- Kit para la determinación de IL-6 de rata (BD Biosciences ref 550319)
- Solución de sensibilización: 0.1M de carbonato sódico pH 9 (8.40 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 3.56 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , q.s.p 1 litro)
- Diluyente: PBS + 10% suero fetal

- Solución de lavado: PBS + 0.05% de Tween-20
- Substrato de revelado TMB (Tetramethylbenzidine)(Becton-Dickinson)
- Solución STOP – 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Protocolo**

- a) Sensibilizar las placas con 100 µl del anticuerpo de captura (dilución 1/250 en solución de sensibilización). Incubar durante toda la noche a 4°C.
- b) Lavar 5 veces con la solución de lavado (200µl/pozo).
- c) Bloquear con 200 µl de la solución diluyente durante 2 horas a temperatura ambiente.
- d) Lavar 5 veces con la solución de lavado (200µl/pozo).
- e) Incubar con 100 µl del estándar o de los sobrenadantes (dilución 1/250).
- f) Lavar 5 veces con la solución de lavado (200µl/pozo).
- g) Incubar con 100 µl del anticuerpo de detección (dilución 1/250).
- h) Lavar 5 veces con la solución de lavado (200µl/pozo).
- i) Lavar 5 veces con la solución de lavado (200µl/pozo).
- j) Incubar con 100 µl de avidina peroxidasa (dilución 1/250).
- k) Añadir 100 µl de la solución de revelado y incubar a oscuras la placa durante 30 minutos.
- l) Para la reacción adicionando 50 µl de la solución STOP y leer la absorbancia a 450 nm realizando una corrección con una lectura a 570 nm.

**3.9.2. Elisa sobre células****Reactivos:**

- Placas de cultivo de 96 pozos (Costar)
- medio RPMI (Invitrogen)
- Suero fetal (Invitrogen)
- Suero de conejo (Invitrogen)
- BSA (Sigma)
- Anticuerpos primarios: Anti N-CAM (ascitis)(Sigma C-9672), anti V-CAM (Pharmingen) y anti I-CAM (Pharmingen). Los 3 funcionan a una dilución 1/100

- Anticuerpo secundario: Antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón (IgG kappa) biotinilado (Pharmingen ref 559750) (dilución 1/2000)
- Avidina peroxidasa (Roche)(dilución 1/5000)
- Substrato de revelado TMB (Tetramethylbenzidine)(Becton-Dickinson)
- Solución STOP – 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Protocolo:**

- a) Cultivar las células en una placa de cultivo de 96 pozos hasta que obtengamos una monocapa.
- b) Lavar la placa 3 veces con una solución de RPMI + 5% de suero fetal.
- c) Bloquear durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de RPMI + 5% de suero fetal + 10 % de suero de conejo.
- d) Lavar 2 veces con RPMI + 5% de suero fetal.
- e) Incubar con los anticuerpos primarios correspondientes durante 45 minutos a temperatura ambiente. *Nota: mientras que adicionamos los anticuerpos conviene que las células estén en medio, por tanto después del lavado las dejaremos en 50 µl de medio y después le adicionaremos 50 µl de los anticuerpos correspondientes el doble de concentrados.*
- f) Lavar 3 veces con RPMI + 5% de suero fetal.
- g) Lavar 2 veces con PBS + 1% BSA.
  - Incubar con el antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón (IgG kappa) biotinilado disuelto en PBS + 1% BSA + 5 % de suero de conejo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
  - Lavar 5 veces con PBS + 1% BSA.
  - Incubar con avidina peroxidasa diluida en PBS + 5% fetal durante 20 minutos a temperatura ambiente.
  - Lavar 2 veces con PBS + 1% BSA.
  - Lavar 3 veces con PBS.
  - Adicionar la solución de sustrato TMB, incubar aproximadamente 15 minutos y para la reacción adicionando unos 50 µl de 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. leer la absorbancia de la placa a 450 nm realizando una corrección con una lectura a 570 nm en un lector de placas de ELISA.

### 3.10. Clonaje del CD38 de rata

#### 3.10.1. Extracción de RNA

##### Materiales:

- TRIZOL (Sigma ref T-9424)
- Cloroformo (Sigma ref T-2432)
- Isopropanol (Sigma ref I-9516)
- Etanol 75%

##### Protocolo:

- a) Cultivar las células hepáticas estrelladas en placas de 24 pozos, utilizar 3 pozos por cada condición.
- b) Quitar el medio y adicionar 400  $\mu$ l de **TRIZOL** por cada pozo de 24 (subir y bajar con una micropipeta y ayudarnos de un “*scrape*” para acabar de disgregar las células) *Nota: si es tejido, utilizar 1ml TRIZOL por cada 50-100mg de tejido y disgregar. Se recomienda utilizar 3 pozos por condición.*
- c) Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 2-8°C.
- d) Recoger el sobrenadante y descartar el sedimento.
- e) Incubar las muestras 5 minutos a temperatura ambiente.
- f) Añadir 200  $\mu$ l de **cloroformo** por cada 1 ml de TRIZOL (*240  $\mu$ l cloroformo/1200 $\mu$ l TRIZOL*) (*Ajuntamos 3 pozos de 24 por tanto inicialmente tenemos 1200  $\mu$ l de TRIZOL*).
- g) Agitar manualmente durante 15 segundos.
- h) Dejar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
- i) Centrifugar a 12000 g 15 minutos a 2-8°C.
- j) Recoger la fase superior del gradiente y transferirlo a un tubo fresco.
- k) Añadir 500 $\mu$ l de **isopropanol** por cada 1ml de TRIZOL (*600  $\mu$ l isopropanol /1200 $\mu$ l TRIZOL*).
- l) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- m) Centrifugar a 12000g durante 15 minutos a 2-8°C (se observa el *pellet*).

- n) Lavar el *pellet* con **etanol 75%**, 1ml/1ml TRIZOL (1200  $\mu$ l Etanol 75% / 1200 $\mu$ l TRIZOL)
- o) Realizar un “vórtex” y centrifugar a 7500g durante 5 minutos a 2-8°C
- p) Dejar secar.
- q) Disolver en Agua RNAasa “free”.
- r) Cuantificar en el espectro: preparar un dilución 1/50 (Vf=100 $\mu$ l). Mirar ratio Abs 260/280, lo ideal es que se encuentre entre 1.5-2).

*Nota: Todo el material utilizado ha de estar autoclavado con guantes, para evitar RNAasas. Se recomienda utilizar puntas con filtro. La concentración aproximada que se obtiene de RNA es de 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l.*

### 3.10.2. RT-PCR

Obtención del cDNA mediante transcripción inversa a partir del RNA previamente aislado.

#### Material:

- Kit SuperScript™ First strand (Invitrogen ref 11904-018)

#### Protocolo:

- a) Adicionar a un tubo de 0.2 ó 0.5 ml los siguientes reactivos:

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>
5 $\mu$ g de RNA aprox.	<i>n</i> $\mu$ l
10mM dNTP mix	1 $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Agua estéril	q.s.p 10 $\mu$ l

*Nota: Hay que mezclar bien cada reactivo antes de usar.*

- b) Incubar las muestras a 65°C durante 5 minutos, seguidamente colocar la muestra durante 1 minuto en hielo.
- c) Adicionar en un segundo tubo los siguientes reactivos:

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen (q.s.p 1racción)</u>
10X RT buffer	2 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
0.1 M DTT	2 $\mu$ l
RNaseOUT™(Recombinant RNase Inhibitor)	1 $\mu$ l

*Nota: Hay que calcular el número de reacciones que se quieren llevar a cabo, conviene añadir un control negativo donde no adicionaremos el enzima RT y un control positivo (opcional)*

- d) Añadir 9  $\mu$ l de la segunda mezcla (**c**) a los tubos preparados inicialmente (**a**) con la mezcla RNA/cebadores. Mezclar bien y hacer un pulso en la centrífuga.
- e) Incubar a 42°C durante 2 minutos
- f) Añadir 1  $\mu$ l (50 unidades) del enzima SuperScript™ II RT a cada tubo excepto en el control negativo, mezclar e incubar a 42°C durante 50 minutos.
- g) Terminar la reacción a 70°C durante 15 minutos, y colocar los tubos en hielo.
- h) Hacer un pulso y añadir 1  $\mu$ l de RNAase H a cada tubo e incubar a 37 °C durante 20 minutos.

*Nota: El volumen final obtenido es de 20 $\mu$ .l*

### 3.10.3. PCR

Para obtener el gen completo de la molécula del CD38 se realizó una PCR utilizando como muestra el cDNA previamente obtenido y los siguientes cebadores **F** y **R** que correspondían a la región inicial y final del gen.

- 1) **F** 5'- ATG GCC AAC TAT GAA TTT TCC CA -3'
- 2) **R** 5'- TGA GAT CCA AGT CCT TCA CAC ATT AAG -3'

#### Reactivos:

- Expand™ High Fidelity PCR System (Roche ref. 1733818)

#### Protocolo:

- a) *Preparación "cocktail"* 1X

- Buffers (Expand high fidelity) 5 $\mu$ l
- 10mM dNTP mix 1  $\mu$ l
- Primers F (10pmol) 2.5  $\mu$ l
- R (10pmol) 2.5  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O 33.6  $\mu$ l
- Enzima 0.4  $\mu$ l
- *TOTAL* 45  $\mu$ l

b) **Preparación de la reacción**

- cDNA 2.5-5  $\mu$ l o 0  $\mu$ l (Ctl neg.)
- Cocktail 45  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O q.s.p 50 $\mu$ l

c) Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización: 1 min a 95°C; hibridación: 1 min a 50°C; elongación: 1 min a 72°C y 35 ciclos.

d) Al final de la reacción corremos un gel para comprobar si hemos podido amplificar nuestro gen.

### 3.10.3.1. Geles de agarosa

**Reactivos:**

- Agarosa: (Ecogen ref AG-100)
- Solución TAE 1X: Para la preparar 1 litro de TAE 50X: 242 Tris-base, 54.1ml ácido acético glacial, 100ml EDTA 0.5M pH 8 y enrasar hasta 1 litro con agua. Se trabaja con TAE 1X (200ml de TAE 50X más 800ml de agua).
- Bromuro de etidio

**Protocolo:**

Para preparar un gel al 0.8%:

- a) 50 ml de TAE 1X + 0.4 g de agarosa, calentar al microondas sin que llegue a hervir.
- b) Añadir aprox. 3  $\mu$ l de bromuro de etidio. (tapar para evitar los gases)
- c) Dejar que se enfríe un poco y verter en la cubeta previamente montada.
- d) Esperar que solidifique (aprox.15 min.)
- e) Condiciones de voltaje (aprox. 80V constante). *Nota: del negro al rojo (- → +)*

*Nota: el porcentaje depende del tamaño de la banda. Hay que tener mucho cuidado con la manipulación del bromuro de etidio.*

### **3.10.4. Subclonaje en vector de expresión**

El producto de PCR fresco fue clonado utilizando el Kit de subclonaje TOPO eucariotas 3.1/V5-His (Invitrogen ref. K4800-01) y las colonias fueron seleccionadas en placas de L.B. + 50 mg ampicilina. Posteriormente, las colonias fueron analizadas mediante secuenciación.

#### **Protocolo:**

a) Mezclar en un tubo pequeño: 1  $\mu$ l SALT, 1  $\mu$ l Vector TOPO y 3-4  $\mu$ l del producto de PCR obtenido.

*Nota: para evitar coger aceite, coger 6  $\mu$ l e ir pasando la gota por un parafilm.*

b) Agitar suavemente, realizar un pulso e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

c) Transferir la mezcla a un vial de bacterias (DH5 $\alpha$ ) (tapa lila).

d) Incubar 30 minutos en hielo.

e) Realizar un choque térmico (30 segundos a 42°C, se puede utilizar el baño).

f) Dejar 2 minutos en hielo.

g) Añadir medio SOC o LB (200-250  $\mu$ l).

h) Agitar a 200 rpm durante 45 minutos-1 hora.

i) Realizar un pulso y sacar un poco del sobrenadante.

j) Plaquear en placas de ampicilina durante toda la noche.

k) Al día siguiente, picamos aproximadamente 6 colonias, las ponemos en tubos de bacterias con 2 ml de LB + ampicilina y las dejamos crecer O.N.

l) A partir de este cultivo bacteriano podemos obtener el DNA plasmídico.



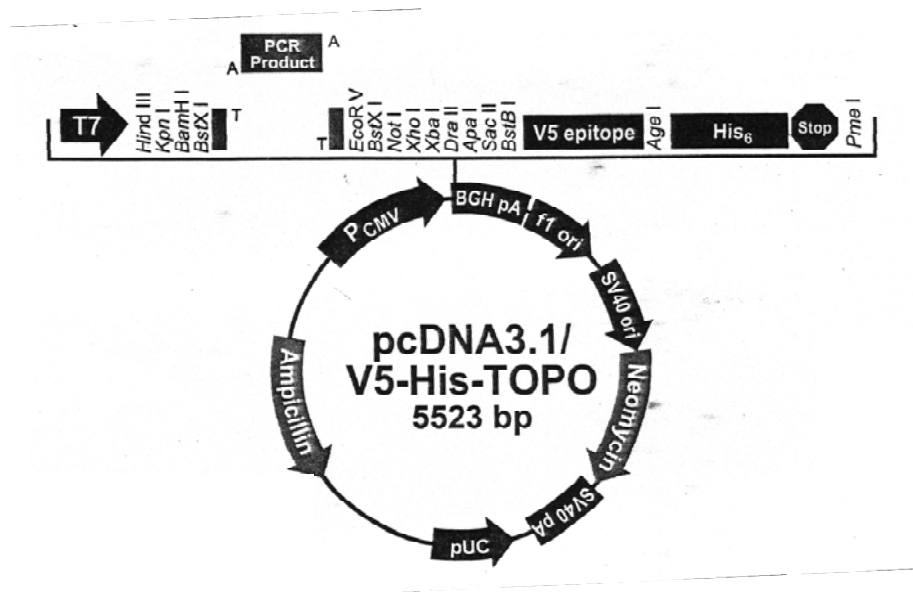


Figura 3-6 Vector Topo (catálogo de invitrogen)

#### 3.10.4.1. Obtención del DNA plasmídico

##### Materiales:

- Kit de mini-prep (Qiagen)
- 1.5ml del cultivo bacteriano

##### Protocolo:

- a) Centrifugar 1.5 ml del cultivo bacteriano a 14 000 rpm durante 2 minutos.
- b) Resuspender el *pellet* bacterial en 250  $\mu$ l del tampón P1.
- c) Adicionar 250  $\mu$ l tampón P2 e invertir el tubo suavemente seis veces.
- d) Adicionar 350  $\mu$ l del tampón N3 e invertir el tubo suavemente seis veces.
- e) Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 minutos.
- f) Transferir el sobrenadante a la columna comercial (qiaprep).
- g) Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto.
- h) Es importante lavar la columna con 0.5 ml del tampón PB y centrifugar a 14 000 rpm durante 30 segundos.
- i) Lavar la columna con 0.75 ml del tampón PE, centrifugar a 14 000 rpm durante 30 segundos. Repetir este paso 2 veces.

- j) Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga y centrifugar durante 1 minuto con el fin de eliminar los restos del tampón PE.
- k) Transferir la columna a un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml. Eluir el DNA adicionando 50  $\mu$ l del tampón EB (10mM Tris-HCL, PH 8.5) o agua estéril al centro de la columna dejar reposar 1 min y centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min. El DNA obtenido fue secuenciado siguiendo el método de Sanger.

#### 3.10.4.2. Secuenciación de DNA (método de Sanger)

El objetivo fue determinar la secuencia y orientación del inserto.

##### Materiales:

- Producto de DNA
- Kit de secuenciación (Dye Terminator Chemistry) (Biosystems)
- Etanol de 95°
- Etanol de 70°
- Primer *sense* T7 (1 picomol)

##### Protocolo:

- a) En un tubo de 250  $\mu$ l adicionar :
  - 4  $\mu$ l DNA (200-500 ng)
  - 4  $\mu$ l de terminador ready reaction mix
  - 3 picomoles del primer *sense* T7
- b) Mezclar bien y centrifugar a 14 000 rpm durante 30 segundos
- c) Incubar en el “thermal cycler 480” con las siguientes condiciones
 

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 96° durante 30 seg</li> <li>- 50° durante 15 seg</li> <li>- 60° durante 4 min.</li> <li>- Mantener a 4°C</li> </ul>	}	25 ciclos
--	---	-----------
- d) El DNA se precipita con etanol absoluto:
  - En un tubo de microcentrífuga adicionar el producto del paso c + 26  $\mu$ l agua estéril + 64  $\mu$ l etanol absoluto.
  - Precipitar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 14 000 rpm durante 20 min. y eliminar la solución de etanol.
- Adicionar 200  $\mu$ l de etanol al 70 % y centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min.
- Eliminar la solución de etanol al máximo, si es necesario volver a centrifugar para recuperar mejor las trazas de etanol.
- Secar el precipitado a temperatura ambiente. La muestra se puede almacenar a -20°C máximo 1 año.

### 3.11. Transfección

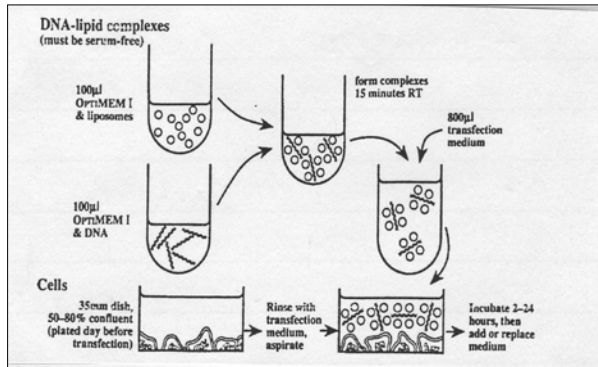
#### **Materiales:**

- Kit de transfección: “Lipofectamine Plus” (Invitrogen ref 11668-027) ( 0,5 ml de Lipofectamina y 0.85 ml de Plus).
- PBS 1X.
- Medio DMEM sin suplementos.
- Medio DMEM suplementado 2X (20% suero fetal, glutamina y penicilina).

#### **Protocolo:**

- a) Sembrar células COS-7 ( $1 \times 10^6$ ) en placas de 100 mm de diámetro. La transfección se realiza 24 horas después, asegurándose de que la placa tenga una confluencia celular entre 50-70%.
- b) Preparar el complejo de DNA-Plus: en un tubo de microcentrífuga estéril mezclar 4  $\mu$ g DNA + 20  $\mu$ l Plus. Incubar durante 15 min. a temperatura ambiente.
- c) En otro tubo de microcentrífuga diluir la lipofectamina con medio DMEM libre de suplementos: 750  $\mu$ l de medio + 20  $\mu$ l de Lipofectamina.
- d) Transcurridos los 15 min. mezclar las muestras del paso **b** y **c**. Incubar durante 15 min. a temperatura ambiente.
- e) Lavar las células del paso **a** con PBS 1X estéril y adicionar a cada placa 5 ml de medio DMEM sin suplementos.

- f) Transcurridos los 15 min. adicionar la mezcla DNA-Plus-Lipofectamina a la placa que contiene los 5 ml de medio, agitar suavemente e incubar durante 3 horas en el incubador a 37°C.
- g) Pasada las tres horas adicionar a cada placa 6.5 ml del medio DMEM 2X.
- h) Dejar las células en el incubador durante 24-48 horas y realizar los ensayos pertinentes.



**Figura 3-7 Representación esquemática del protocolo de transfección (catálogo invitrogen)**

### 3.12. RT-PCR semicuantitativa

Los cebadores utilizados para cuantificar los niveles de colágeno tipo I, MMP-2 y TIMP-1 mediante RT-PCR fueron los siguientes:

*Colágeno I:* F 5'-GCC ACC TCA AGA GAA GTC-3''

R 5'-ATA GCG ACA TCG GCA GGA TCG-3'

*MMP-2* F 5'-GCT GAT ACT GAC ACT GGT ACT G-3'

R 5'-CAA TCT TTT CTG GGA GCT C-3'

*TIMP-1* F 5'-ACA GCT TTC TGT AAC TCG-3'

R 5'-CTA TAG GTC TTT ACG AAG GCC-3'

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización: 1 min a 95°C; hibridación: 2 minutos a 55°C; elongación: 2 min a 72°C y 35 ciclos. Al acabar la reacción corremos un gel de agarosa (ver apartado 3.10.3.1) y con el transiluminador visualizamos las bandas.

## 4. RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de la membrana de las células hepáticas estrelladas

Después de inmunizar ratones con células hepáticas estrelladas recién aisladas mediante perfusión hepática, se realizaron 14 fusiones y se analizaron más de 3000 hibridomas obteniéndose un panel de 16 hibridomas secretores de anticuerpos reactivos con las células hepáticas estrelladas. Los 16 hibridomas fueron subclonados y el isotipo de los anticuerpos secretados fue determinado (ver **tabla 4-1**).

Hibridoma	isotipo
ITO 5.392	IgG1, K
ITO 5.520	IgG2a, K
ITO 8.405	IgG1, K
ITO 8.9	IgG2b, K
ITO 9.85	IgG1, K
ITO 9.71	IgG2a, K
ITO 9.7	IgG2b, K
ITO 8.482	IgG1, K
ITO 13.534	IgG2a, K
ITO 13.540	IgG1, K
ITO 13.496	IgG1, K
ITO 13.153	IgG1, K
ITO 13.177	IgG2b, K
ITO 14.27	IgG2b, K
ITO 14.10	IgG1, K
ITO 14.141	IgG2b, K

Tabla 4-1 Panel de hibridomas obtenidos con los isotipos de los anticuerpos secretados correspondientes.

## 4.2. Pre-caracterización:

Al tratarse de un número considerable de anticuerpos se optó por realizar una primera pre-caracterización, mediante un estudio inmunohistoquímico y de citometría de flujo. El objetivo era seleccionar aquellos anticuerpos con mayor especificidad de linaje celular por las células hepáticas estrelladas.

### 4.2.1. Estudio inmunohistoquímico

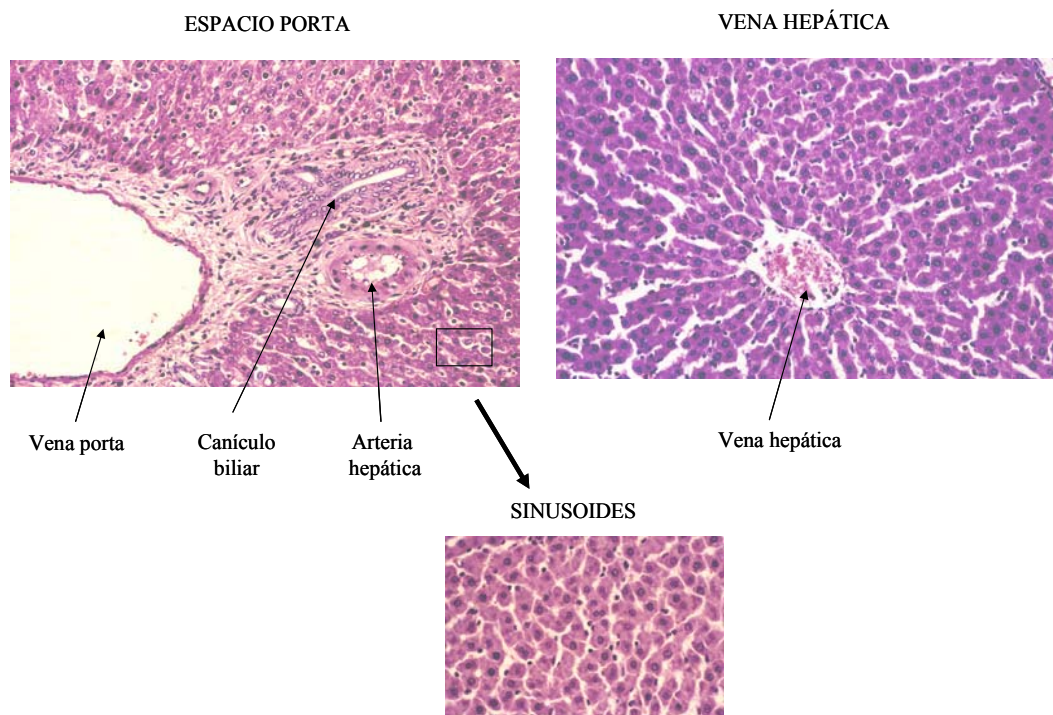
Este estudio se realizó mediante marcaje de secciones de hígado procedente de ratas control y ratas pre-tratadas 4 horas antes con LPS. Como control positivo de activación utilizamos el anticuerpo anti-P-selectina. En condiciones basales no se detectó expresión de P-selectina, pero tras la activación con LPS se detectó la expresión de P-selectina en el endotelio de los vasos y en las plaquetas.

Se determinó si los anticuerpos tenían reactividad frente:

- **Territorio sinusoidal:** Es en esta zona, concretamente en el espacio de Disse, donde se encuentran las células hepáticas estrelladas, sinusoidales y las células de Kupffer, un marcaje en esta zona era indicativo que posiblemente los anticuerpos estuvieran marcando potencialmente las células hepáticas estrelladas.
- **Endotelio de vasos grandes y pequeños:** pudimos discernir entre un marcaje del endotelio de vasos grandes, refiriéndonos al endotelio de vasos de la vena porta o vena centrolobulillar, y al endotelio de vasos pequeños, refiriéndonos al endotelio de la arteria hepática o bien canículos biliares. Un marcaje en esta zona nos era indicativo de falta de especificidad, al estar marcando células endoteliales, musculares o epiteliales.
- **Hepatocitos**
- **Leucocitos**



En la **figura 4-1**, se muestra una tinción de eosina-hematoxilina, donde se pueden observar las diferentes zona que se analizaron (el espacio porta, la vena hepática y los sinusoides) no obstante, nuestro estudio inmunohistoquímico lo realizamos mediante inmunofluorescencia. Los resultados se muestran en la **Tabla 4-2**.



**Figura 4-1.-** Tinción eosina-hematoxilina procedente de secciones parafinadas de hígados de ratas control.

CLONES	Tratamiento	Sinusoides	Endothelium		Hepatocitos	Leucocitos
			Grandes	Pequenos		
<b>P-sel</b>	CTL	-	-	-	-	-
	LPS	-	(+)	-	-	- (plaq.)
<b>ICAM-1</b>	CTL	+	(+)	-	+	-
	LPS	++	++	-	++	++
<b>HSC 5.392</b>	CTL	(+)	-	-	-	++
	LPS	(+)	-	-	-	++
<b>HSC 5.520</b>	CTL	+	-	(+)	-	-
	LPS	(+)	-	-	-	-
<b>HSC 8.405</b>	CTL	+	+	+	+	+
	LPS	++	++	++	++	++
<b>HSC 8.9</b>	CTL	+	+	-	-	-
	LPS	+	++	-	-	(+)
<b>HSC 9.85</b>	CTL	-	-	-	-	++
	LPS	-	-	-	-	+++
<b>HSC 9.71</b>	CTL	-	-	-	++	++
	LPS	-	-	-	++	+
<b>HSC 9.7</b>	CTL	-	-	-	+	++
	LPS	-	-	-	+	+
<b>HSC 8.482</b>	CTL	+	+	+	-	-
	LPS	+	+	+	-	(+)
<b>HSC 13.534</b>	CTL	-	-	-	-	-
	LPS	-	-	-	-	-
<b>HSC 13.540</b>	CTL	-	-	-	-	++
	LPS	-	-	-	-	+++
<b>HSC 13.496</b>	CTL	+	-	-	-	-
	LPS	+	-	+	-	-
<b>HSC 13.153</b>	CTL	-	-	-	-	++
	LPS	-	-	-	-	+++
<b>HSC 13.177</b>	CTL	-	+	+	+	(+)
	LPS	-	+	-	(+)	+
<b>HSC 14.27</b>	CTL	+	(+)	-	-	-
	LPS	++	(+)	-	-	(+)
<b>HSC 14.10</b>	CTL	+	-	+	+	-
	LPS	++	-	+	(+)	+
<b>HSC 14.141</b>	CTL	-	-	-	-	+
	LPS	-	-	-	-	++

**Tabla 4-2 Resumen de los datos obtenidos mediante el estudio inmunohistoquímico.** Las regiones y los tipos celulares analizados fueron los siguientes: los sinusoides, el endotelio de los vasos grandes y pequeños, los hepatocitos y los leucocitos. El estudio se realizó tanto en condiciones basales como de activación previo tratamiento de las ratas con LPS.

Como se muestra en la **tabla 4-2**, la mayoría de los anticuerpos monoclonales dieron positivo con los leucocitos, algunos de ellos marcaron el endotelio de los vasos y muy pocos presentaron reactividad frente a los hepatocitos.

Analizando los resultados los anticuerpos que parecían tener un patrón más restringido frente a las células hepáticas estrelladas fueron los anticuerpos: **5.520**, **8.9**, **13.496** y el **14.27**.

#### 4.2.2. Análisis mediante citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se testó la reactividad del panel de anticuerpos producidos frente a monocitos y linfocitos aislados de sangre periférica, hepatocitos aislados mediante perfusión hepática y células procedentes de una línea inmortalizada de células hepáticas estrelladas mediante el AgT del virus SV40. Los resultados se muestran en la **tabla 4-3**. Mostraron un patrón interesante los anticuerpos **8.9**, **5.520** y **14.27** por su especificidad celular frente a células hepáticas estrelladas.

Clones	PBL					SV40 Cell line
	CHE	Monocitos	Linfocitos	hepatocitos		
ITO 5.392	+	+	(+)	-	-	
ITO 5.520	++	-	-	-	-	
ITO 8.405	+	+	+	-	+	
ITO 8.9	++	-	-	-	-	
ITO 9.85	++	+	+	-	-	
ITO 9.71	+	+	+	+	-	
ITO 9.7	-	-	-	+	-	
ITO 8.482	+	++	+	-	+	
ITO 13.534	(+)	-	(+)	-	-	
ITO 13.540	(+)	+	+	-	-	
ITO 13.496	++	+	+	-	+	
ITO 13.153	(+)	++	+	-	-	
ITO 13.177	+	(+)	-	+	+	
ITO 14.27	+	-	(+)	-	-	
ITO 14.10	++	+	+	(+)	+	
ITO 14.141	+	+	+	-	-	

**Tabla 4-3 Resumen de la reactividad de los anticuerpos producidos.** Mediante citometría de flujo, se testó la reactividad de los anticuerpos frente a monocitos, linfocitos, hepatocitos y células procedentes de la línea inmortalizada de células hepáticas estrelladas. CHE, células hepáticas estrelladas; PBL, leucocitos de sangre periférica; SV40 cell line, línea inmortalizada de células hepáticas estrelladas.

Según los datos obtenidos con el estudio inmunohistoquímico y de citometría de flujo se escogieron los anticuerpo **8.9**, **5.520** y **14.27**, para un caracterización más detallada.

### 4.3. Identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos seleccionados.

#### 4.3.1. Inmunoprecipitación de los anticuerpos 5.520, 8.9 y 14.27

El primer objetivo que nos propusimos fue identificar las proteínas reconocidas por los anticuerpos seleccionados según la pre-caracterización. Lo primero que se hizo fue comprobar si los anticuerpos se podían inmunoprecipitar. Esto era necesario ya que las proteínas reconocidas por los anticuerpos debían ser purificadas mediante inmunoprecipitación. En la **figura 4-2** se muestra como los 3 anticuerpos inmunoprecipitan. Tanto en condiciones reductoras como no reductoras en los 3 anticuerpos solo se observó una banda mayoritaria. Los pesos moleculares aproximados de cada uno de ellos fueron los siguientes: **5.520** (~35 kDa) **8.9** (~50 kDa) y **14.27** (~50 kDa).

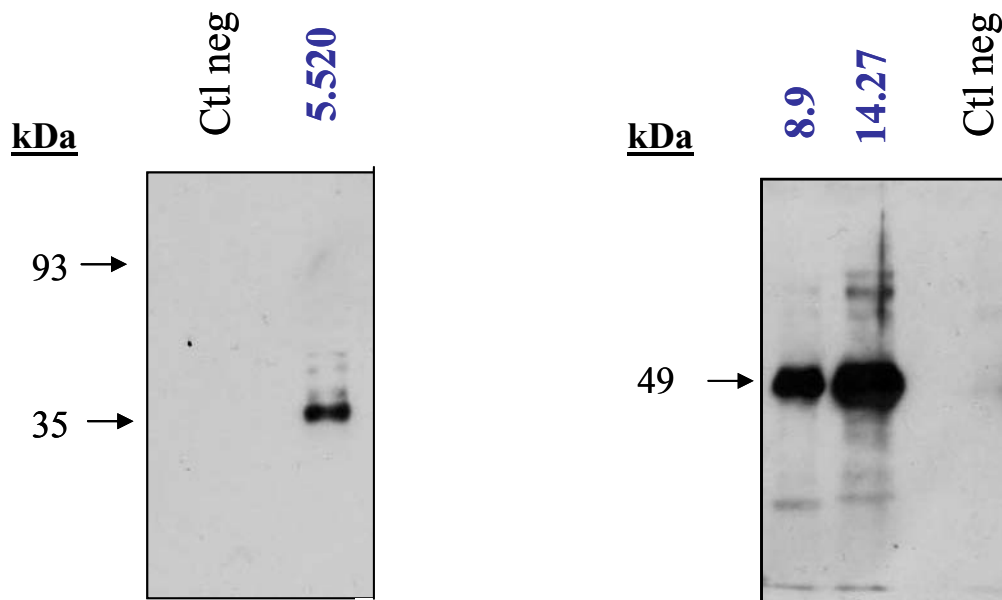


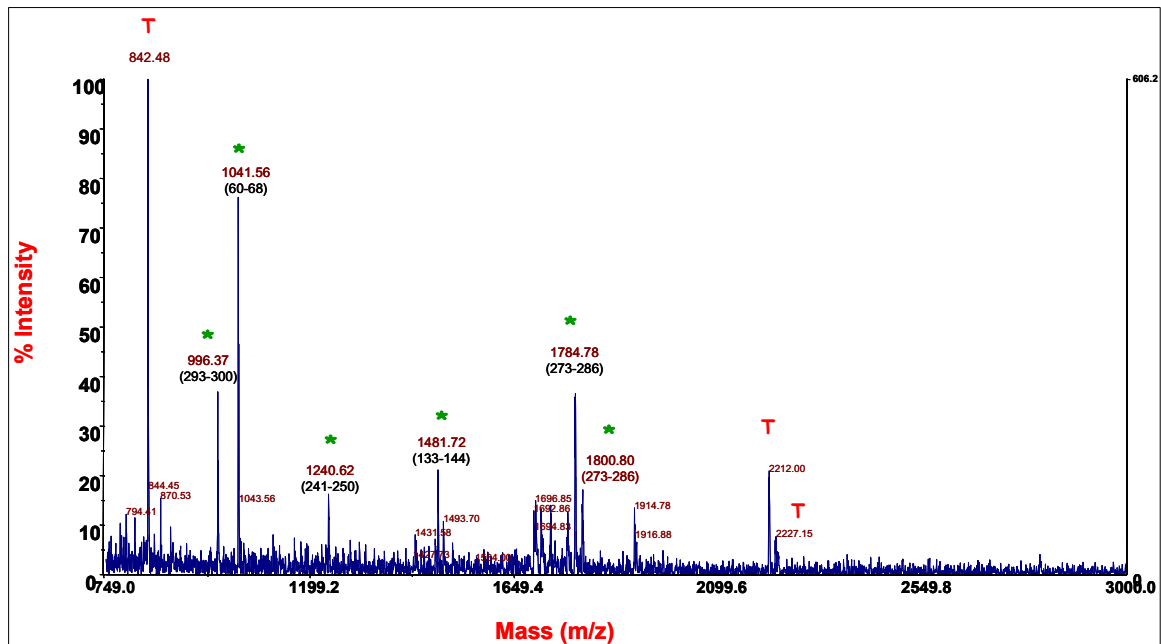
Figura 4-2 Inmunoprecipitación de los 3 anticuerpos que mostraron un patrón más interesante en el estudio de pre-caracterización.

### 4.3.2. Identificación de la proteína reconocida por el anticuerpo 14.27

El anticuerpo monoclonal 14.27 fue seleccionado para ser caracterizado. Se pudo purificar mediante inmunoprecipitación, partiendo de un lisado de células hepáticas estrelladas, el antígeno reconocido por el anticuerpo. Tras analizar la proteína purificada en un gel de poliacrilamida-SDS y realizar una tinción de plata compatible con masas, el resultado fue la obtención de una banda de unos 50 kDa.

La banda proteica obtenida se recortó del gel y se digirió con tripsina. Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se realizó el análisis para la identificación de la proteína. El espectro de masas obtenido se representa habitualmente como una gráfica de barras donde el eje **X** corresponde a las unidades de masa (valores  $m/z$ ) y el eje **Y** corresponde a la intensidad (el número de iones de una relación  $m/z$  que llegan al detector). Cada pico del espectro corresponde a un péptido con un determinado peso molecular. Los péptidos con mayor intensidad fueron analizados (en el espectro de la **figura 4.3A** se encuentran marcados con una asterisco verde). Se compararon con una base de datos y resultó que todos ellos correspondían a la misma proteína. La homología era de un 100%. Se trataba de la proteína de rata CD38 (peptid accesión number Q64244) y los péptidos encontrados cubrían el 33% de la secuencia peptídica de la proteína (ver **figura 4-3 B**)

A



B

```

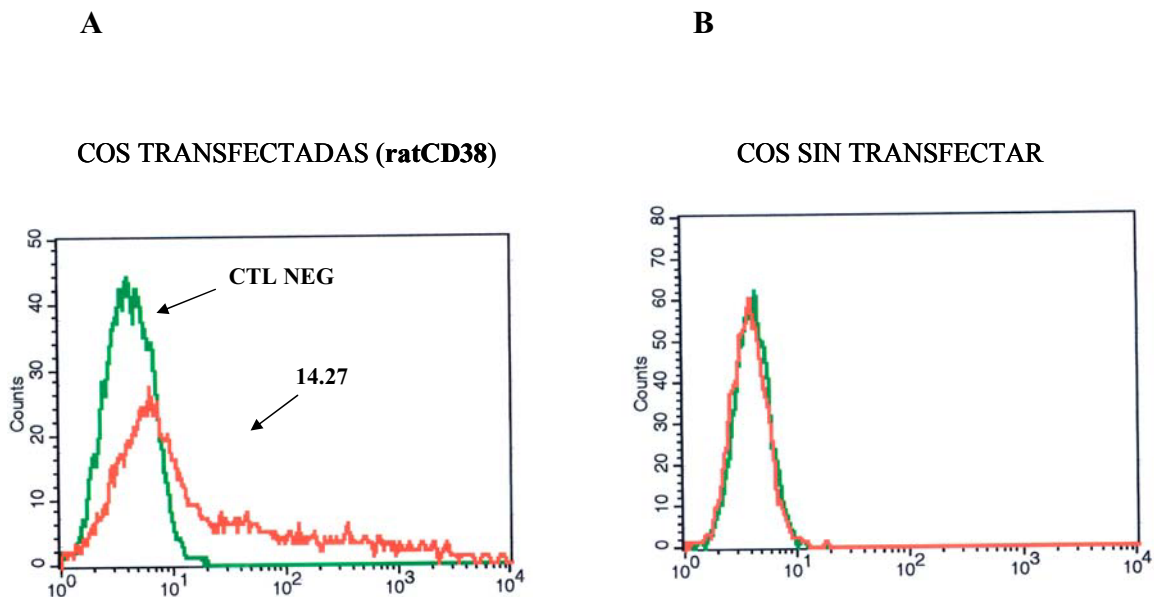
MANYEFSQVSEDRPGCRLTRKAQIGLVGLLLLVALVVVVVIVLW
PRSPVLVWKGKPTTKHFADIILGRCLYTQILRPEMRDQDCKILST
FKRGFISKNPCNITNEDYAPLVKLVQTIPCNKTLFWSKSKHLAHQ
YTWIQGKMFTLEDTLGYIADDLRWCGDPSTSDMNYDSCPHWSE
NCPNPNVAVFWNVISQKFAEDACGVVQVMLNGSLSEPFYRNSTFG
SVEVFNLDPNKVHKLQAVVMHDIKGTSSNACSSPSINELKSIVN
KRNMIFACQDNYPVRFLQCVKNNPEHPSCRLNV

```

**Figura 4-3.- (A) Espectro obtenido mediante MALDI-TOFF:** El CD38 fue identificado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFMS). Con el asterisco verde se muestran los péptidos obtenidos de la banda de 45 kDa purificada, y con el asterisco rojo se muestran los péptidos correspondientes a la tripsina, que sirvieron de control positivo interno. **(B) Secuencia aminoacídica correspondiente al CD38 de rata.** En azul se muestran los péptidos identificados, que cubrían el 33% de la secuencia peptídica.

### 4.3.3. Clonaje del CD38 de rata y transfección en células COS

Para acabar de confirmar que el anticuerpo 14.27 estaba reconociendo la molécula CD38, el CD38 de rata fue clonado a partir del mRNA procedente de un cultivo primario de células hepáticas estrelladas. Posteriormente se subclonó en un vector de expresión y se transfectaron células COS. En la **figura 4-4** se muestra claramente como el anticuerpo reconoce el CD38 expresado en células COS.



**Figura 4-4.- Expresión de CD38 en células COS:** Las células COS se transfectaron con el cDNA CD38 y posteriormente se realizó un marcaje con el anticuerpo monoclonal CD38.14.27. En la figura se muestra el histograma generado mediante el análisis por citometría de flujo usando células COS transfectadas (A) y COS sin transfectar (B). El marcaje con el anticuerpo CD38.14.27 se muestra en naranja y el marcaje con el anticuerpo de igual isotipo (IgG2b) pero irrelevante se muestra en verde. La intensidad de fluorescencia se muestra en escala logarítmica.

## 4.4. Caracterización de CD38

### 4.4.1. Estudio de la expresión del CD38

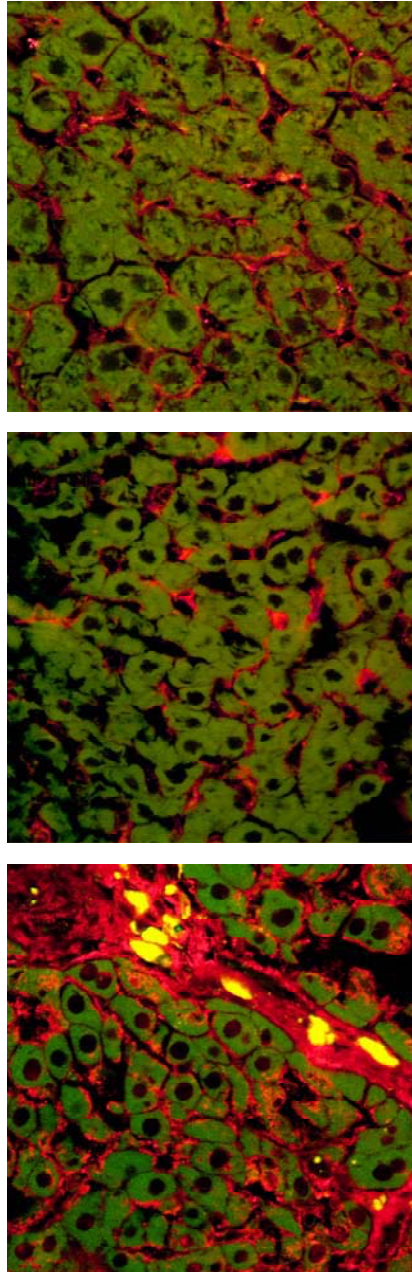
#### 4.4.1.1. Expresión y distribución de CD38 en el hígado

Las células hepáticas estrelladas están situadas en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células sinusoidales endoteliales. En el territorio sinusoidal podemos encontrar básicamente 3 tipos celulares. Las células sinuoidales, las células de Kupffer y las células hepáticas estrelladas.

El patrón de expresión de las células hepáticas estrelladas difiere del de las células endoteliales y de Kupffer. Se trata de un marcaje sinusoidal pero discontinuo a diferencia del de las células sinusoidales, sus largas prolongaciones se extienden a lo largo del espacio de Disse y algunas de ellas se adentran entre los hepatocitos remarcando parcialmente su membrana.

El marcaje con el anticuerpo CD38.14.27 de secciones de hígado procedentes de ratas control, mostró un marcaje claramente sinusoidal y discontinuo (**figura 4-5 A**). Los hepatocitos se muestran en verde, no se trata de marcaje sino de autofluorescencia, algunos de ellos presentaron un marcaje parcial de su membrana correspondiente a las largas prolongaciones de las células hepáticas estrelladas que se adentran entre los hepatocitos. En secciones de hígado procedente de ratas tratadas con LPS, y corroborada la activación por la expresión de P-selectina en el endotelio de los vasos grandes, la expresión de CD38 no se vió incrementada (**figura 4-5 B**). Finalmente, en secciones de hígado procedente de ratas cirróticas, se observó un claro aumento de la expresión del CD38, tanto en el territorio sinusoidal como en la zona del septa (**figura 4-5 C**).



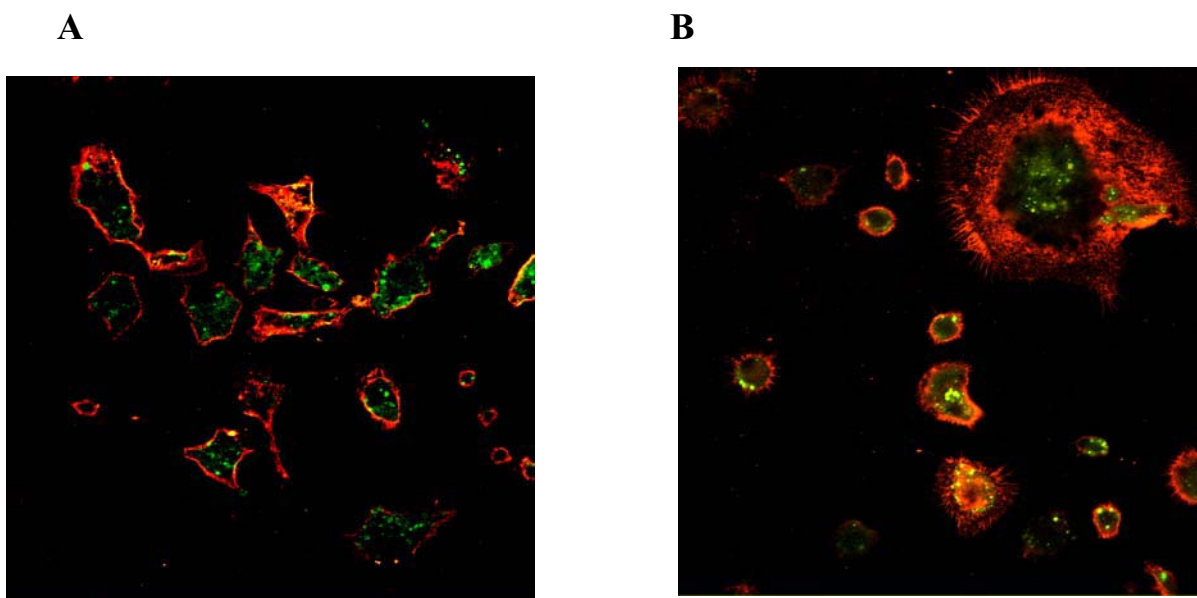


**Figura 4-5.- Localización de CD38 en el hígado:** Secciones de hígados de rata control (A), rata pre-tratadas con LPS (B) y secciones de hígado de rata cirróticas (C), fueron incubadas con el anticuerpo CD38.14.27, y seguidamente marcadas con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón Cy3. En rojo se muestra el marcaje y en verde la autofluorescencia.



#### 4.4.1.2. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas de cultivos primarios

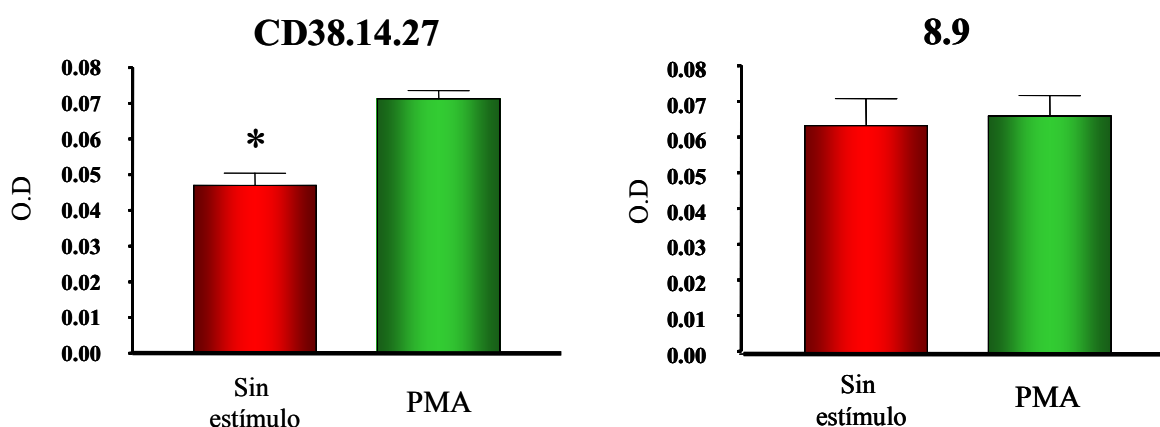
Se realizó el marcaje de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27, a los 3 y 8 días después de haber sido aisladas y cultivadas. En la **figura 4-6 A**, claramente se muestra en rojo la expresión del CD38 en la membrana, en verde lo se observa la autofluorescencia de los gránulos de vitamina A. A los 8 días tras estar en cultivo, se mantuvo la expresión de CD38, y se observó una disminución de la presencia de gránulos de vitamina A (**figura 4-6 B**).



**Figura 4-6 Expresión del CD38 en células hepáticas estrelladas en cultivo:** Células hepáticas estrelladas tras 3-4 (A) y 8-9 (B) días de estar en cultivo fueron incubadas con el anticuerpo CD38.14.27 y seguidamente marcadas con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón Cy3. En rojo se muestra el marcaje y en verde la autofluorescencia de los gránulos de vitamina A.

#### 4.4.2. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas y activadas “*in vitro*”

Mediante un ELISA sobre células, se cuantificó el aumento de la expresión de CD38, después de activar “*in vitro*” las células hepáticas estrelladas con PMA. El PMA, es un éster de forbol que activa la PKC. El incremento de la expresión fue de un 30%. En el experimento, también se incluyó, el anticuerpo 8.9, y en este caso no hubo cambios en los niveles de expresión tras la activación (ver **figura 4-7**).

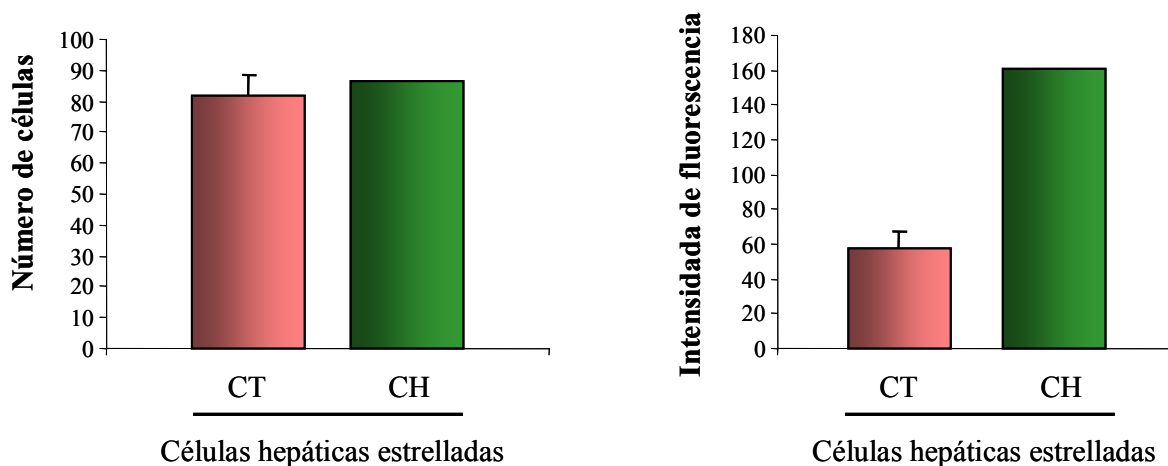


**Figura 4-7 Aumento de la expresión de CD38.** Las células hepáticas estrelladas fueron incubadas en presencia o ausencia de PMA (1.25ng/ml). La expresión de CD38 fue determinada mediante un ELISA con células. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos monoclonales irrelevantes con el mismo isotipo.

#### 4.4.3. Expresión de CD38 en células hepáticas estrelladas y activadas “*in vivo*”

Se aislaron células hepáticas estrelladas, procedentes de ratas control y ratas cirróticas. Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de CD38, en ambos grupos. En las células hepáticas estrelladas procedentes de ratas cirróticas la expresión de CD38, cuantificada mediante la intensidad de fluorescencia, fue mayor que los

niveles de expresión de CD38 presentes en células hepáticas estrelladas procedentes de ratas sanas.



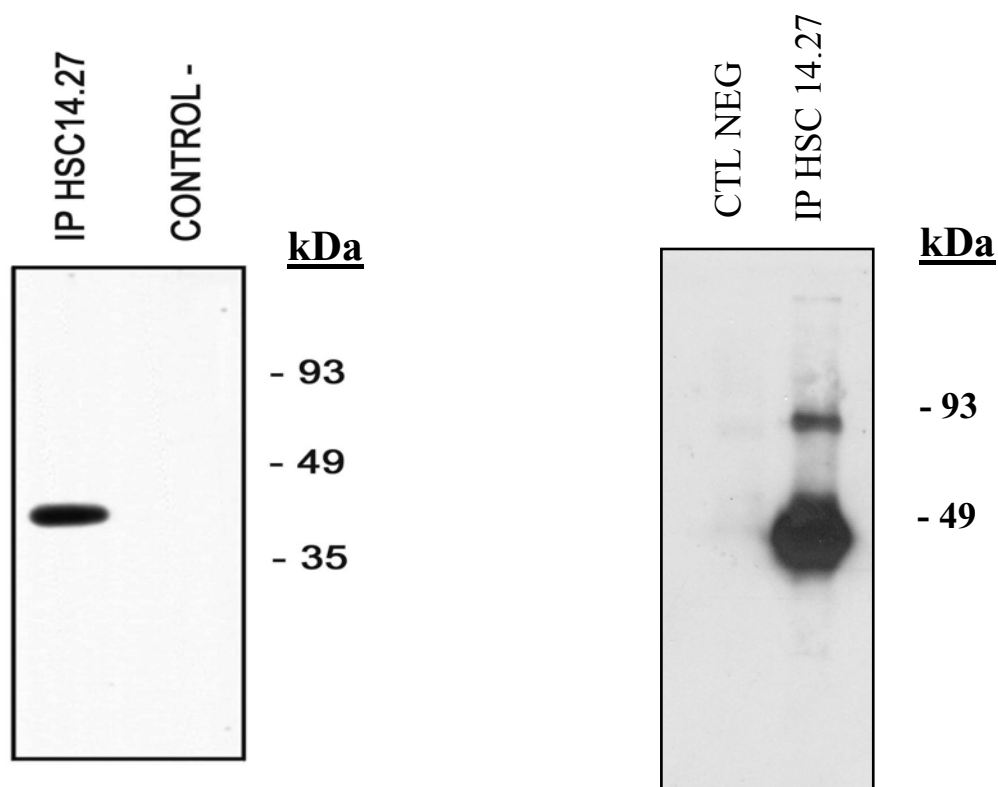
**Figura 4.8. Aumento de la expresión del CD38:** células hepáticas estrelladas fueron aisladas de ratas control y cirróticas. El aumento de la expresión de CD38 fue analizada mediante citometría de flujo. (A) porcentaje de células positivas que expresan CD38. (B) intensidad de fluorescencia de las células CD38 positivas. (CT, rata control; CH, rata cirrótica).

## 4.5. Caracterización bioquímica del CD38 de rata mediante el anticuerpo CD38.14.27.

### 4.5.1. Inmunoprecipitación

Células hepáticas estrelladas fueron biotiniladas y lisadas como esta descrito en materiales y métodos, posteriormente fueron inmunoprecipitadas usando el anticuerpo CD38.14.27 y un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo como control negativo.

Los resultados muestran que al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-CD38 se evidencia claramente una banda que corresponde al CD38 (50 kDa) (**Figura 4-9 A**). En unos de los Blott obtenidos se evidenciaron 2 bandas (50 kDa y 90 kDa) (**Figura 4-9 B**), la banda observada en 90 kDa podría tratarse de una forma dimérica descrita previamente por el grupo de Santos-Argumedo [123].



**Figura 4-9. Inmunoprecipitación de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD34.14.27.**  
Condiciones no reductoras

#### 4.5.2. Western-Blott

Después de ver que el anticuerpo CD38.14.27 podía inmunoprecipitar, se determinó si el anticuerpo funcionaba también utilizando la técnica de Western-Blott. Para la realización del Western-Blott se utilizaron extractos procedentes de un cultivo primario de células hepáticas estrelladas y un extracto procedente de una biopsia de hígado. Respectivamente, en cada pozo se cargaron 12.5 y 100  $\mu$ g de proteína. Como se puede observar en la **figura 4-10**, en ambos casos se pudo detectar el CD38, aunque en el extracto procedente del cultivo de células hepáticas estrelladas la señal fue mayor que en el extracto de hígado total donde las células hepáticas estrelladas solo representan entre un 5-8% del total de las células hepáticas.

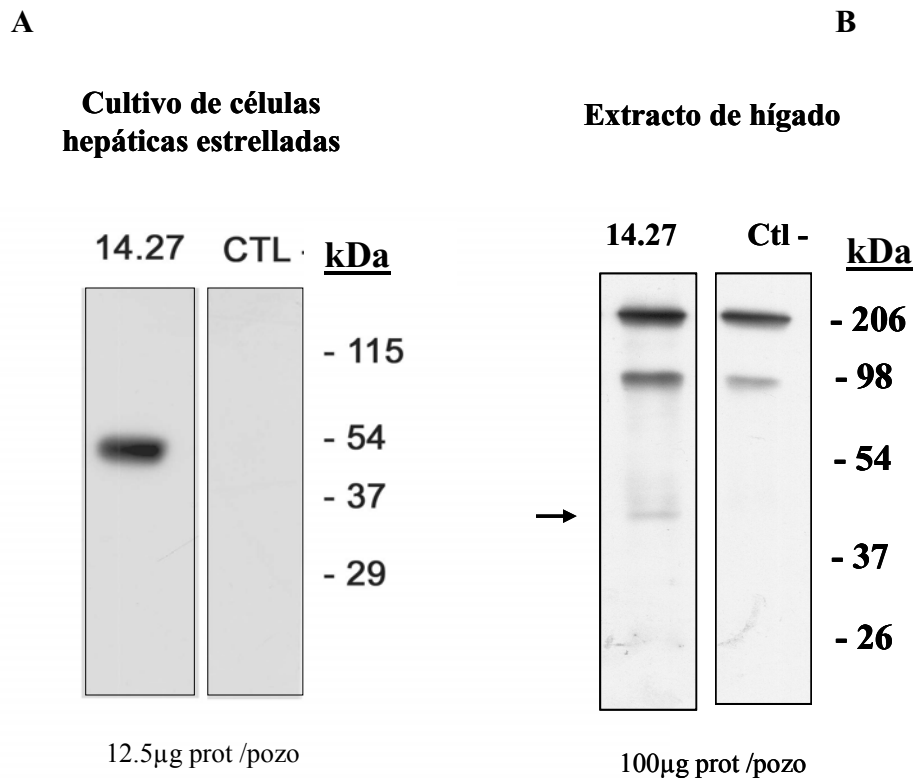


Figura 4-10. Western Blott procedente de extractos de células hepáticas estrelladas (A) y de biopsias de hígado (B).

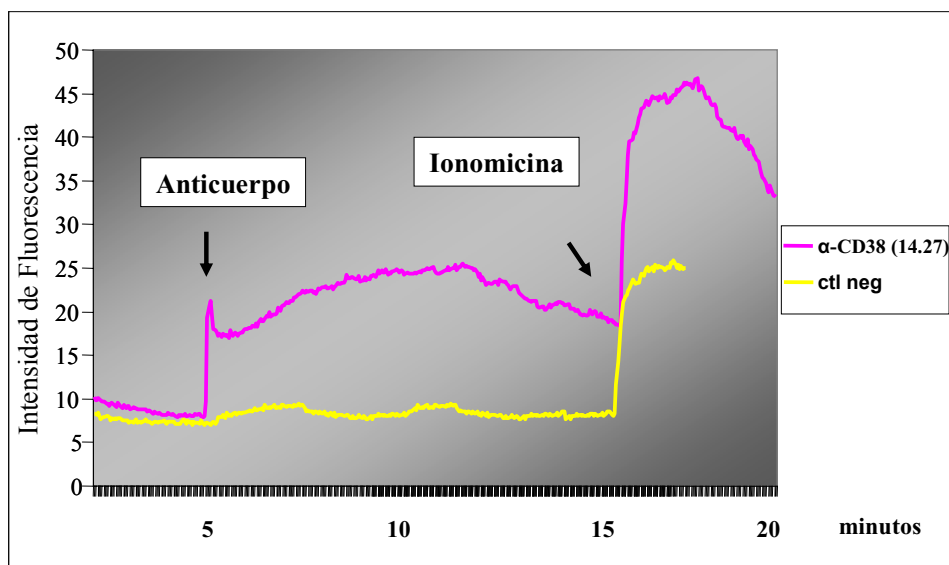
## 4.6. Estudios Funcionales del CD38

### 4.6.1. El anticuerpo monoclonal CD38.14.27 funciona como un anticuerpo agonista.

En diferentes trabajos realizados en linfocitos sobre el CD38 se demuestra que la unión de la molécula CD38 con sus ligandos (mimetizados por anticuerpos anti-CD38 agonistas) inducen la movilización de calcio intracelular en células hematopoyéticas. En un estudio sobre la expresión de CD38 en astrocitos también se observó el mismo efecto [116].

Antes de diseñar diferentes estudios funcionales y estudiar el posible papel funcional de la molécula CD38 en las células hepáticas estrelladas, quisimos saber si nuestro anticuerpo tenía un efecto agonista sobre la molécula CD38.

Como se muestra en la **figura 4-11**, la unión del anticuerpo CD38.14.27 a la superficie de las células hepáticas estrelladas a una concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  indujo la movilización de calcio intracelular. Como control negativo utilizamos un anticuerpo irrelevante con el mismo isotipo a la misma concentración. En ambos casos, al final del experimento se adicionó ionomicina. La ionomicina es un ionóforo de calcio capaz de abrir los canales de calcio de la membrana celular, entrando de este modo calcio del medio extracelular. De esta manera se comprobó que todas las medidas de movilización de calcio que se analizaron se realizaron con células respondedoras.



**Figura 4.11.- El anticuerpo anti-CD38 (14.27) induce movilización de calcio en células hepáticas estrelladas.** Células hepáticas estrelladas aisladas y cultivadas durante 6 días, fueron incubadas con el indicador fluorescente Fluo4/AM. La activación se realizó con el anticuerpo CD38.14.27 (6  $\mu\text{g/ml}$ ) y inmediatamente se analizó la intensidad de fluorescencia emitida con un microscopio invertido. El mismo experimento se realizó con un anticuerpo irrelevante con el mismo isotipo y a la misma concentración.



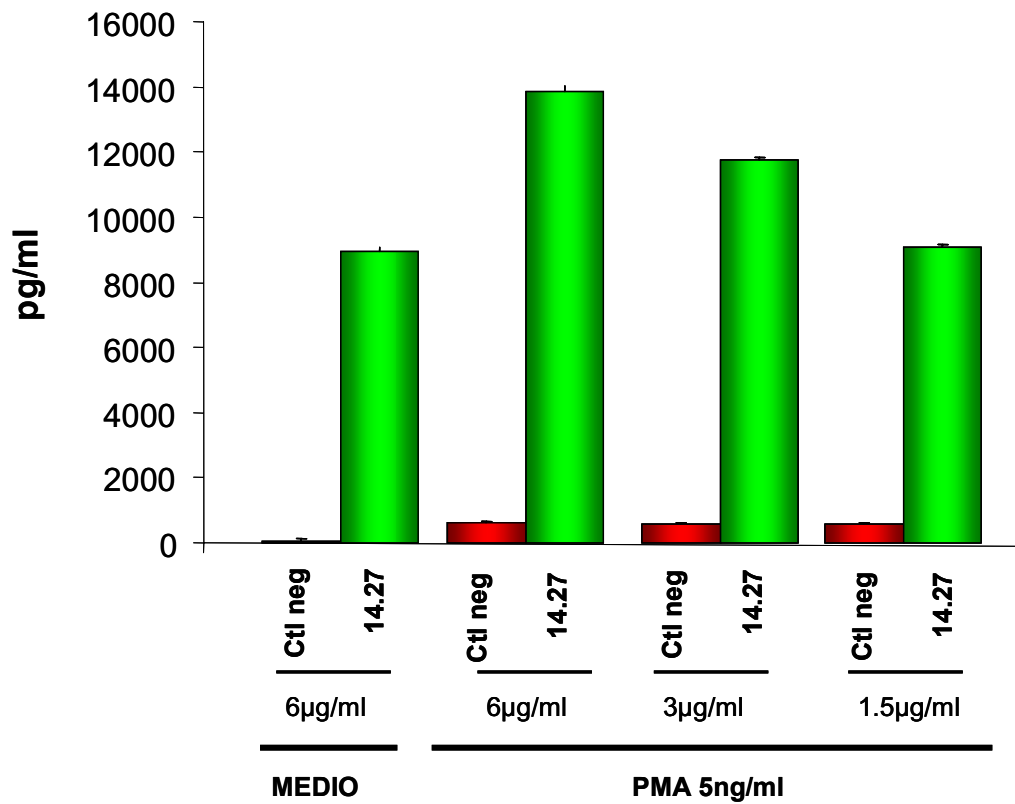
#### **4.6.2. El anticuerpo CD38.14.27 induce la secreción de IL-6 independientemente del estado de activación/diferenciación.**

Las células hepáticas estrelladas tienen capacidad de regular la respuesta inmune mediante la producción de mediadores solubles. La IL-6 es una de las citocinas secretadas por las células hepáticas estrelladas con un importante efecto en el proceso inflamatorio [124]. En células del sistema hematopoyético se ha visto que la activación del CD38 con anticuerpos anti-CD38 agonistas, induce la liberación de IL-6 [85].

Nosotros nos propusimos ver si la activación del CD38 presente en células hepáticas estrelladas era capaz de inducir la secreción de IL-6.

Cuando incubamos células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27, observamos un aumento de la liberación de IL-6. La respuesta fue decreciendo al disminuir la concentración del anticuerpo (6, 3 y 1.5 µg/ml respectivamente) indicándonos que se trataba de una respuesta dosis-dependiente. También se observó un efecto sinérgico con el activador PMA ya que la co-incubación del anticuerpo con una dosis sub-inductora de PMA potenciaba el efecto de los anticuerpos (la secreción de IL-6 era mayor) (ver **figura 4-12**).

Los experimentos se realizaron a los 4 y 7 días después del aislamiento y en ambos casos se observó el mismo efecto, indicándonos que la liberación de IL-6 tras la activación del CD38 era independiente del estado de activación/diferenciación de las células. Como control negativo se utilizó un anticuerpo irrelevante con el mismo isotipo (IgG<sub>2b</sub>) a la misma concentración.



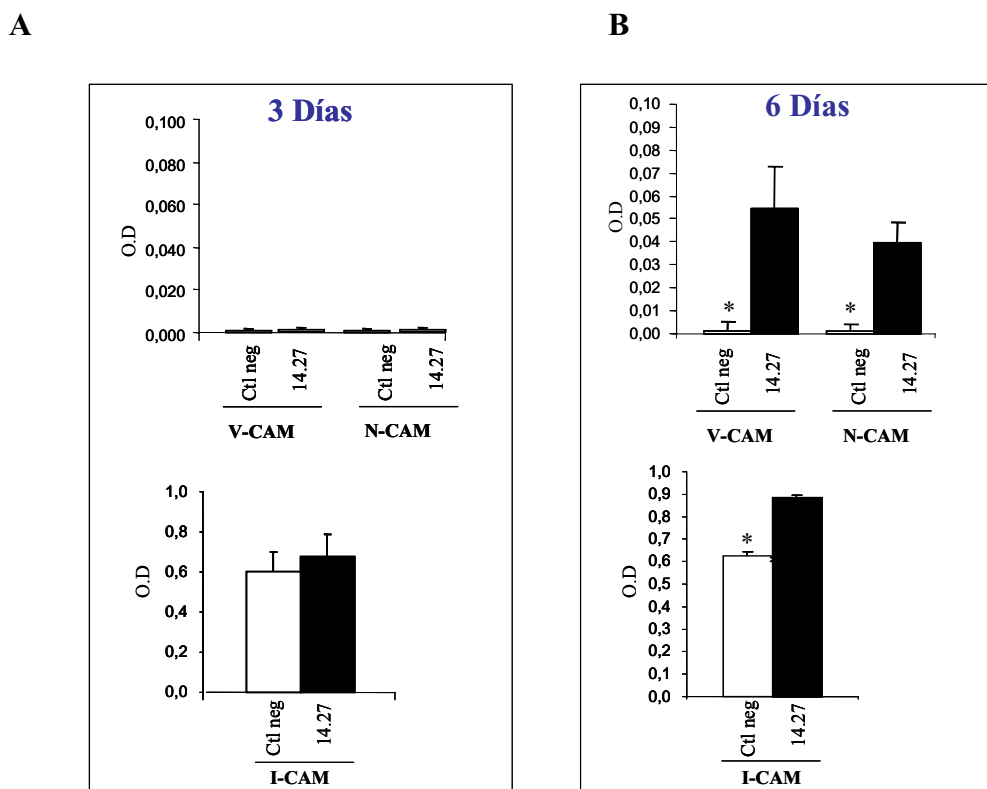
**Figura 4-12 CD38 induce la secreción de IL-6 en células hepáticas estrelladas:** Las células hepáticas estrelladas fueron incubadas con dosis decrecientes de anticuerpo CD38.14.27 (6 µg/ml, 3 µg/ml y 1.5 µg/ml) en presencia o ausencia de una dosis sub-inductora de PMA (5ng/ml). Las células fueron incubadas con los estímulos toda la noche, los sobrenadantes fueron recogidos para realizar la determinación de IL-6.

#### **4.6.3. El anticuerpo CD38.14.27 induce la expresión de moléculas de adhesión, dependientemente del estado de activación/ diferenciación.**

Esta descrito que las células hepáticas estrelladas son capaces de expresar en su superficie las moléculas de adhesión I-CAM, V-CAM y N-CAM, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas [47]. Las expresión de estas moléculas en la

superficie celular es inducible en respuesta a determinados estímulos (ej. citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento etc.).

Se determinó si el CD38 presente en las células hepáticas estrelladas podría regular la expresión de dichas moléculas de adhesión. Para este estudio se utilizaron células hepáticas estrelladas en diferentes tiempos de cultivo. Como se muestra en la **figura 4-13 A**, en células hepáticas estrelladas, a los 3 días de haber sido aisladas, no se detectaron niveles de expresión ni de V-CAM ni de N-CAM pero si de I-CAM. La activación “*in vitro*” de las células hepáticas estrelladas con el anticuerpo anti-CD38 no indujo cambios en los niveles de expresión. En cambio, en células hepáticas estrelladas, a los 6 días de haber sido aisladas, la activación con el anticuerpo CD38.14.27 indujo un aumento de la expresión de las 3 moléculas de adhesión en estudio, I-CAM, V-CAM y N-CAM (ver **figura 4-13 B**).



**Figura 4-13.- El CD38 regula la expresión de I-CAM, V-CAM y N-CAM en células hepáticas estrelladas en cultivo:** células hepáticas estrelladas a los 3 y 6 días de haber sido aisladas fueron incubadas con el anticuerpo CD38.14.27 (4 µg/ml) o con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. La expresión de I-CAM, V-CAM y N-CAM fue determinada mediante un ELISA. En la figura se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

#### **4.6.4. El anticuerpo CD38.14.27 induce la contracción de las células hepáticas estrelladas**

Las células hepáticas estrelladas tienen capacidad de contraerse o relajarse en respuesta a diferentes sustancias vasoactivas. Por otro lado, se ha visto que el metabolito producido por el CD38, el cADPR, está implicado en la contracción de células musculares lisas de:

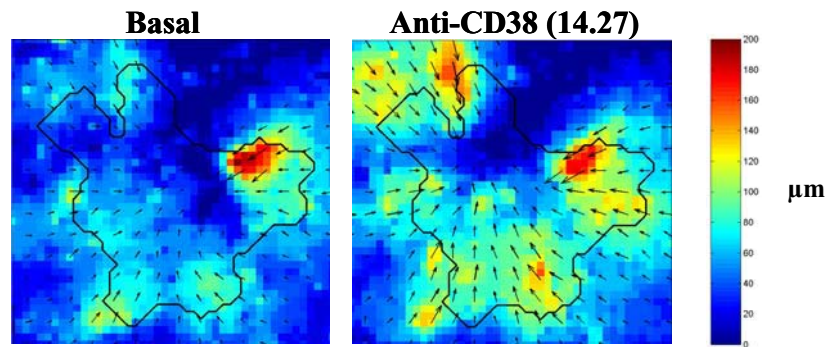
- vías aéreas (hiperrespuesta, asma)
- vasos sanguíneos
- conductos seminíferos
- intestino

Mediante microscopia de tracción se cuantificó la tracción celular que la célula hepática estrellada era capaz de generar en respuesta al entrecruzamiento de CD38 con el anticuerpo CD38.14.27.

##### **4.6.4.1. Campo de desplazamiento generado por la célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27.**

La tracción ejercida en respuesta a un estímulo se traduce en una deformación del gel (sustrato), que nosotros podemos observar como un desplazamiento de las microesferas. Mediante correlaciones bidimensionales se cuantifica el desplazamiento de las microesferas y se obtiene el campo de desplazamiento en toda la superficie de contacto.

En la **figura 4-14**, se muestra un ejemplo representativo del campo de desplazamiento generado por una célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27. Las flechas (vectores) indican la dirección del campo de desplazamiento y los colores la magnitud absoluta del desplazamiento ( $\mu\text{m}$ ).

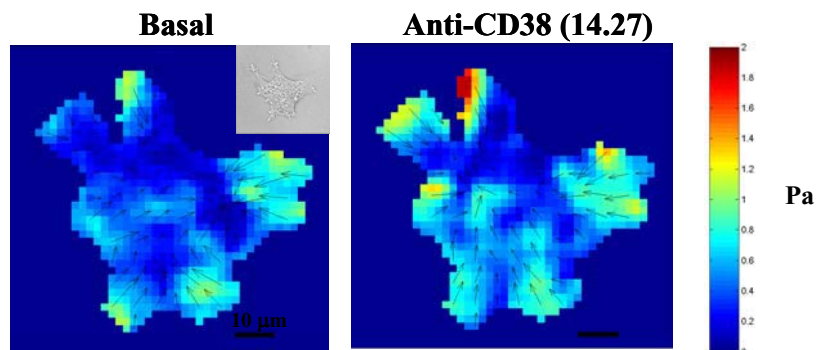


**Figura 4-14 Campo de desplazamiento:** Esquema representativo del campo de desplazamiento generado por la célula hepática estrellada. A la derecha campo generado en condiciones basales (4 minutos después del inicio del experimento) y a la izquierda tras el entrecruzamiento con el anticuerpo anti-CD38 ( $8\mu\text{g/ml}$ ) (6 minutos después de adicionar el anticuerpo). La barra de colores nos proporciona información sobre la magnitud del desplazamiento.

#### 4.6.4.2. Campo de tracción generado por la célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27.

Tras el procesamiento de los datos obtenidos del campo de desplazamiento, se obtiene el campo de tracción, es decir, la tracción que la célula adherida genera sobre su sustrato. En este procesamiento se impone que la tracción fuera de la célula sea cero.

En la **figura 4-15**, se muestra un ejemplo representativo del campo de tracción generado por una célula hepática estrellada tras el entrecruzamiento con el anticuerpo anti-CD38. Las flechas (vectores) indican la dirección del campo de tracción y los colores la magnitud absoluta de la tracción ejercida (Pa).



**Figura 4.15.- Campo de tracción:** esquema representativo del campo de tracción generado por la célula hepática estrellada. A la derecha campo generado en condiciones basales (4 minutos después del inicio

del experimento) y a la izquierda tras el entrecruzamiento con el anticuerpo CD38.14.27 (8 $\mu$ g/ml) (6 minutos después de adicionar el anticuerpo). En la esquina superior izquierda se muestra la imagen de la célula en estudio. La barra de colores nos proporciona información sobre la magnitud de la tracción.

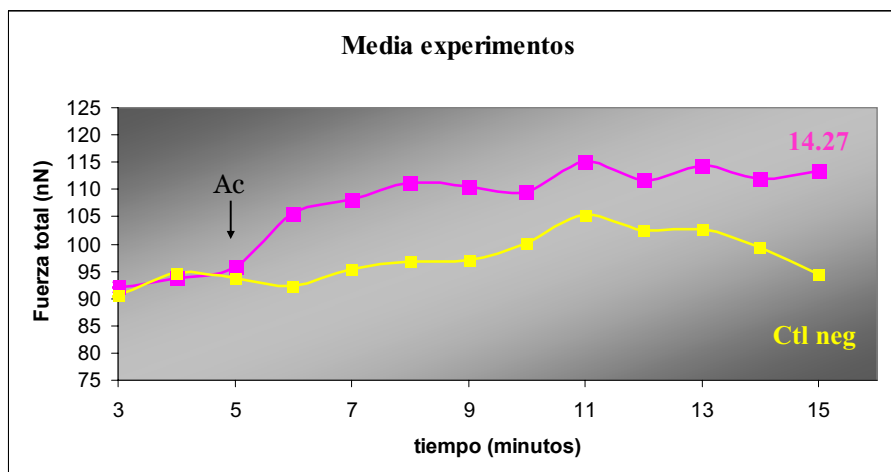
#### 4.6.4.3. Evolución temporal del campo de fuerzas generado

La fuerza total ejercida por la célula en cada momento, se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula.

$$\text{Total fuerza generada (nN)} = \sum \text{tracción en cada punto} \times \text{área de la superficie de la célula}$$

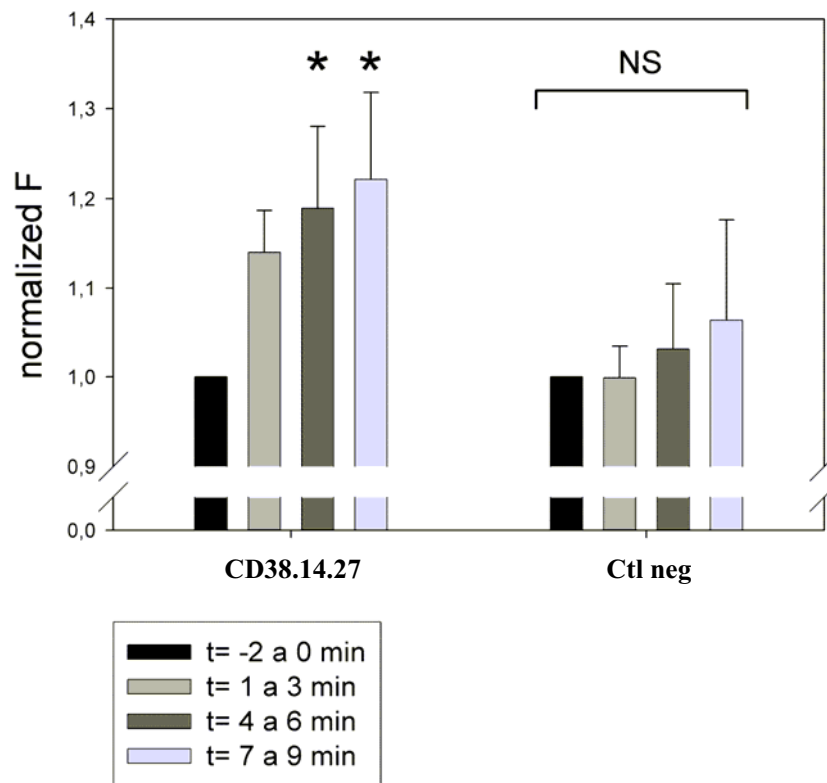
En la **figura 4-16 A** se muestra un ejemplo representativo, mostrando la evolución temporal de la fuerza generada. Tras la adición del anticuerpo CD38.14.27 a los 5 minutos después del inicio del experimento, se observó un aumento de la fuerza ejercida. El control negativo, sin embargo, no mostró variaciones significativas. En la **figura 4-16 B** se muestra la media de los experimentos realizados. Después de normalizar los datos y realizar un análisis estadístico tipo ANOVA, los resultados indicaron que el anticuerpo tenía efecto sobre la contracción de las células hepáticas estrelladas y el control negativo no.

A



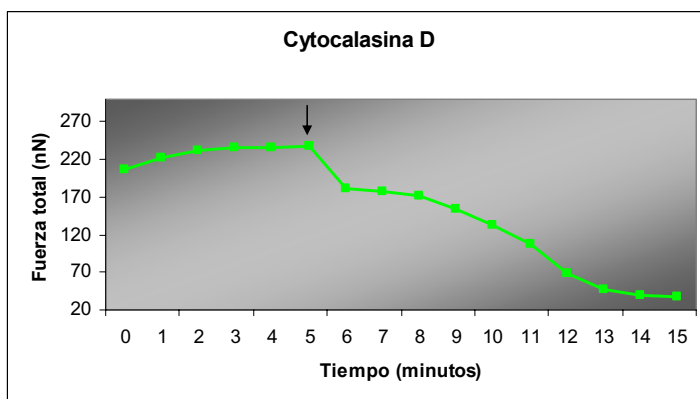
**Figura 4.16 A Evolución temporal de la fuerza total ejercida:** La duración del experimento fue de 15 minutos, las imágenes se tomaron cada minuto. A los 5 minutos se adicionó el anticuerpo CD38.14.27 (8 $\mu$ g/ml) o bien un anticuerpo irrelevante a la misma concentración y con el mismo isotipo (ctl. neg

**B**



**Figura 4.16 B Evolución temporal de la fuerza total ejercida:** Media y análisis estadístico de los experimentos realizados ( CD38.14.27 n=16, ctl neg n=12).

Mediante microscopia de tracción quisimos demostrar que la tracción celular ejercida por las células hepáticas estrelladas era dependiente de la formación del citoesqueleto. Tal como se muestra en la figura 4-17, tras la adición de cytochalasina, a los 5 minutos después del inicio del experimento, las células hepáticas estrelladas disminuyeron de forma drástica la fuerza ejercida.



**Figura 4-17 Evolución temporal de la fuerza ejercida por las células hepáticas estrelladas en respuesta a la cytochalasina** La duración del experimento fue de 15 minutos, las imágenes se tomaron cada minuto. A los 5 minutos se adicionó la cytochalasina (n=3).

#### 4.6.5. El anticuerpo CD38.14.27 induce un aumento de la resistencia intrahepática.

Mediante la técnica de perfusión hepática nos propusimos evaluar el efecto del anticuerpo CD38.14.27 sobre la resistencia intrahepática. La perfusión hepática es un modelo de estudio que permite aislar el hígado del resto del animal y estudiar los factores que modulan la resistencia hepática en circunstancias controladas. Es una técnica intermedia entre un modelo animal vivo y un cultivo celular. La información que nos proporciona es el resultado de la interrelación de todos los tipos celulares presentes en el hígado.

Los experimentos lo realizamos pre incubando el hígado con el anticuerpo CD38.14.27 o con un anticuerpo irrelevante (control) y determinando la respuesta producida sobre los cambios de presión portal (PP) en hígados pre-contraídos a dosis crecientes con metoxamina. Como se muestra en la **figura 4-18** la pre-incubación de los hígados con el anticuerpo CD38.14.27 produce un aumento significativo de la presión portal.

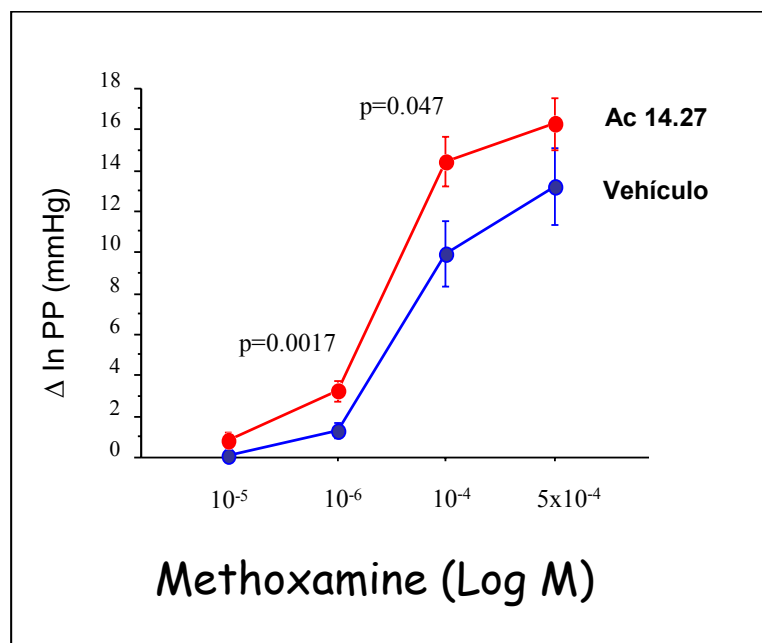


Figura 4-18 El anticuerpo CD38.14.27 induce un aumento de la presión portal.



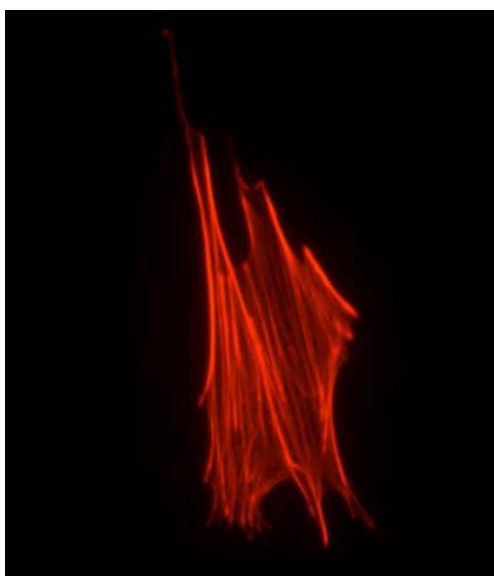
#### 4.6.6. Mecanismos implicados en la contracción celular mediados por la molécula CD38

##### 4.6.6.1. La activación del CD38 induce la formación de fibras de Stress

La formación de las fibras de stress implica una reorganización del citoesqueleto. Uno de los requisitos en este proceso es la polimerización de la actina (paso de G-actina a F-actina). La phalloidina, extraída de la seta *Amanita phalloides*, se une de manera específica a la F-actina. La utilización de phalloidina conjugada con diferentes fluorocromos nos permite tanto la visualización de las fibras de actina como su cuantificación.

##### 4.6.6.1.1. Visualización de la fibras de actina

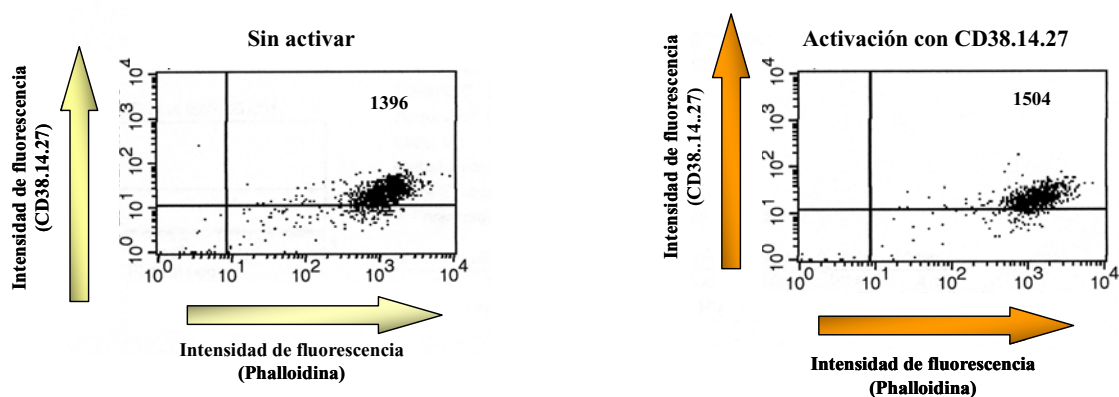
Células hepáticas estrelladas a los 8-10 de estar en cultivo y tras un pase, fueron activadas durante 8 minutos con el anticuerpo CD38.14.27 y con un anticuerpo irrelevante. Después de la activación se realizó una tinción con phalloidina marcada con TRICT. En la **figura 4-19** se muestra un ejemplo representativo donde se visualizan de forma clara las fibras de actina tras el marcaje. En ambas preparaciones (activadas y no) se observó el mismo tipo de marcaje.



**Figura 4-19** Marcaje de las fibras de actina de una célula hepática estrellada. Tinción con phalloidina marcada con TRICT de una célula hepática estrellada a los 8-10 días de estar en cultivo tras la activación con el anticuerpo CD38.14.27.

#### 4.6.6.1.2. Cuantificación de la F-actina

Mediante citometría de flujo nos propusimos cuantificar los niveles de F-actina. Como en el experimento anterior, células hepáticas estrelladas tras 8-10 de estar en cultivo, fueron activadas con el anticuerpo CD38.14.27 o con un anticuerpo irrelevante. Mediante un doble marcaje se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia de la población phalloidina + tras la activación con el anticuerpo CD38.14.27 (ver **figura 4-20**).



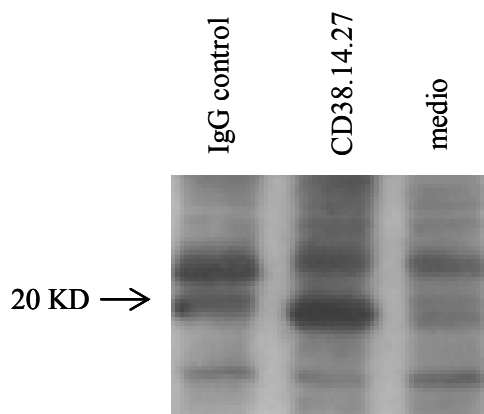
**Figura 4-20** Activación y cuantificación de los niveles de F-actina en células hepáticas estrelladas. Ejemplo representativo (n=3).

#### 4.6.6.2. La activación del CD38 induce la fosforilación de la cadena ligera de la miosina

La fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) es uno de los acontecimientos claves en el proceso de contracción. El aumento de la actividad cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la disminución de la actividad fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) contribuyen de manera positiva a aumentar los niveles de fosforilación de la MLC [125].

Nosotros nos propusimos ver si la activación del CD38 presente en células hepáticas estrelladas era capaz de aumentar los niveles de fosforilación de la MLC.

Como se muestra en la **figura 4-21**, cuando activamos las células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27 durante 3 minutos, observamos un aumento de los niveles fosforilación de la MLC (18KD).

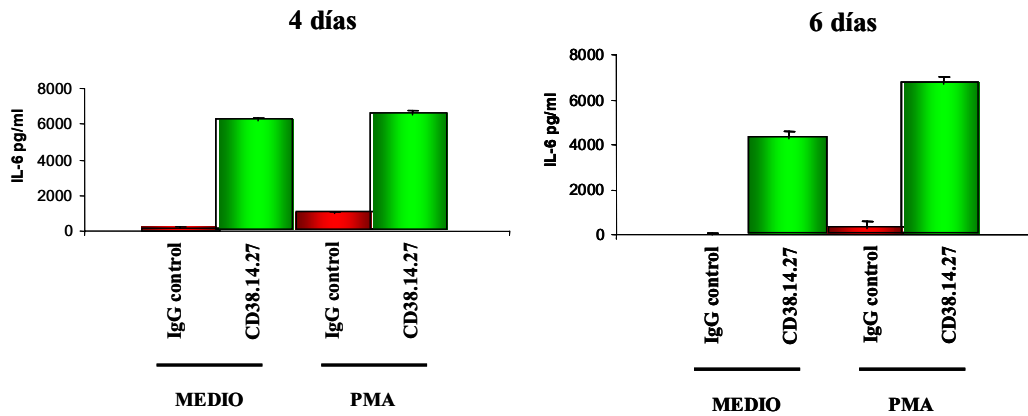


**Figura 4-21 Fosforilación de la cadena ligera de la miosina de células hepáticas estrelladas.** Mediante un análisis por Western-Blott se determinó los niveles de fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) tras la activación con el anticuerpo CD38.14.27. Tiempo de activación 3 minutos.

#### 4.6.7. Papel del CD38 en la regulación del recambio de la matriz extracelular.

En el proceso de fibrogénesis hay un aumento de la producción de proteínas de la matriz extracelular (ECM), se considera a las células hepáticas estrelladas las principales productoras. También existe un cambio cualitativo favorecido por el patrón de metaloproteinasas (MMP) e inhibidores de metaloproteinasas (TIMP) expresados durante el proceso de fibrogénesis, el resultado es la formación de una matriz de alta densidad [126].

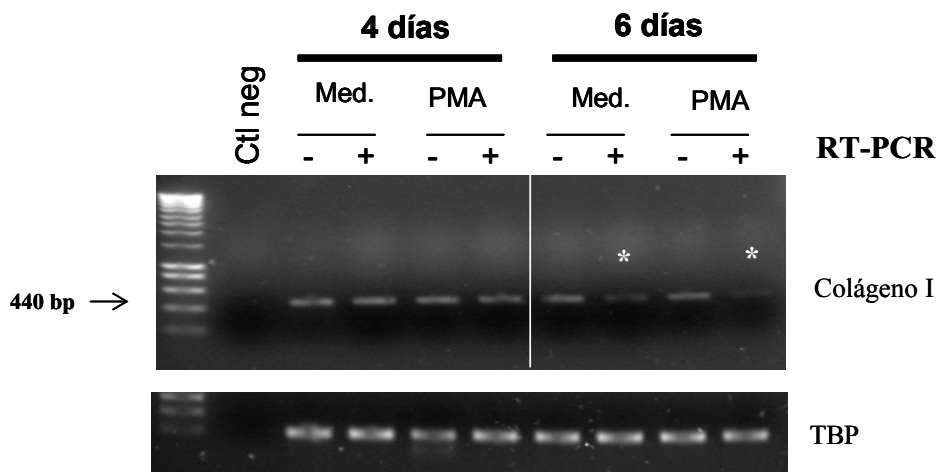
Nuestro objetivo fue determinar si la activación del CD38 influenciaba en los niveles de transcripción de colágeno I, MMP-2 y TIMP-1. El experimento lo realizamos activando las células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27 solo o en combinación con una dosis sub-inductora de PMA. Los experimentos se realizaron a los 4 y 6 días después del aislamiento. Como control de activación de cada una de las muestras se determinó los niveles de IL-6 secretados en el sobrenadante (ver **figura 4-22**).



**Figura 4-22 Control de activación.** Mediante los niveles de secreción de IL-6 se comprobó los niveles de activación de las muestras que fueron utilizadas para la determinación de colágeno I, MMP-2 y TIMP-1 mediante RT-PCR.

**4.6.7.1. La activación con el CD38.14.27 induce una disminución de los niveles del mRNA del colágeno I.**

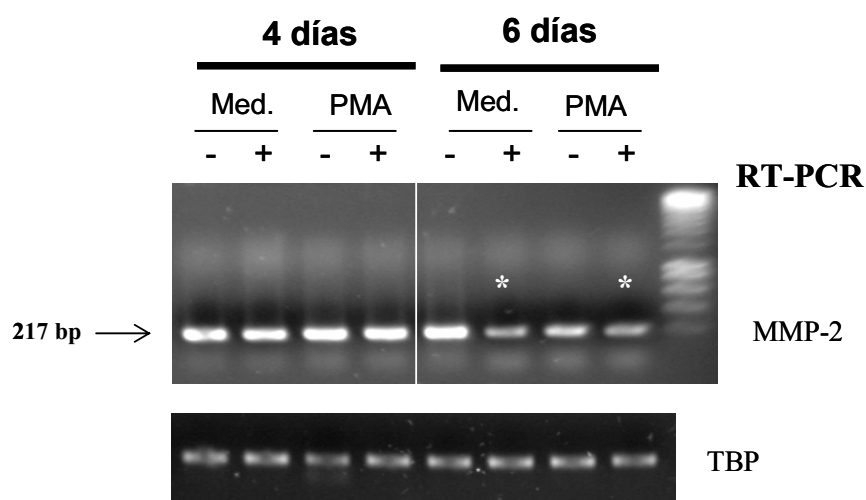
La activación de las células hepáticas estrellada con el anticuerpo CD38.14.27 solo o en combinación con PMA indujo una disminución de los niveles de mRNA de colágeno tipo I. Este efecto se observó en células hepáticas estrelladas a los 6 pero no a los 4 días de haber sido aisladas y cultivadas (ver **figura 4-23**).



**Figura 4-23 Regulación de los niveles del mRNA de colágeno-I tras la activación de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27.** El análisis de los niveles de mRNA fue realizado mediante RT-PCR. El asterisco muestra los cambios observados.

#### 4.6.7.2. La activación con el CD38.14.27 induce una disminución de los niveles de mRNA de MMP-2.

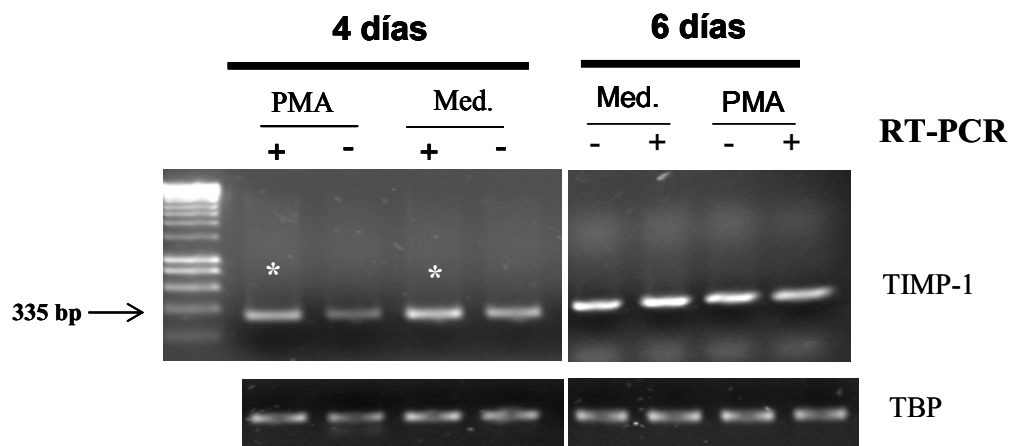
La activación de las células hepáticas estrellada con el anticuerpo CD38.14.27 solo o en combinación con PMA indujo una disminución de los niveles de mRNA de MMP-2. Este efecto se observó en células hepáticas estrelladas a los 6 pero no a los 4 días de haber sido aisladas y cultivadas (ver **figura 4-24**).



**Figura 4-24 Regulación de los niveles del mRNA de MMP-2 tras la activación de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27.** El análisis de los niveles de mRNA fue realizado mediante RT-PCR. El asterisco muestra los cambios observados.

#### 4.6.7.3. La activación con el CD38.14.27 induce un aumento de los niveles de mRNA de TIMP-1.

La activación de las células hepáticas estrellada con el anticuerpo CD38.14.27 solo o en combinación con PMA indujo un aumento en los niveles de mRNA de TIMP-1. Este efecto se observó en células hepáticas estrelladas a los 4 pero no a los 6 días de haber sido aisladas y cultivadas (ver **figura 4-24**).



**Figura 4-24 Regulación de los niveles del mRNA de MMP-2 tras la activación de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27.** El análisis de los niveles de mRNA fue realizado mediante RT-PCR. En asterisco se muestran los cambios observables.

## 5. DISCUSIÓN





## 5. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis identifican por primera vez la presencia de la molécula CD38 en la membrana de las células hepáticas estrelladas y ponen de manifiesto la relevancia de la función de la molécula CD38 en diferentes procesos fisiopatológicos.

La molécula del CD38 ha sido muy bien caracterizada en células del sistema hematopoyético, existen múltiples trabajos realizados donde se describe su peculiar patrón de expresión y función. Sin embargo, hay poco descrito sobre la función, regulación y expresión en otros tipos celulares de origen no hematopoyético [127].

La obtención del anticuerpo monoclonal anti CD38 de un panel de anticuerpos producidos en el laboratorio que reconocían proteínas de la membrana de las células hepáticas estrelladas y su posterior caracterización, nos permitió identificar por la expresión de la molécula CD38 en unas células residentes del hígado, las células hepáticas estrelladas.

### **Expresión y distribución de CD38 en el hígado**

La obtención del anticuerpo monoclonal anti CD38.14.27, permitió realizar un análisis detallado de la expresión del CD38 en el hígado. En secciones de hígado se observó un claro marcaje generalizado sinusoidal discontinuo e irregular, con zonas más intensamente marcadas que otras.

En el territorio sinusoidal podemos encontrar básicamente 3 tipos celulares. Las células sinusoidales, las células de Kupffer y las células hepáticas estrelladas. El patrón de expresión de las células hepáticas estrelladas difiere del de las células endoteliales y de Kupffer. Se trata de un marcaje sinusoidal pero discontinuo a diferencia del de las células sinusoidales, sus largas prolongaciones se extienden a lo largo del espacio de Disse y algunas de ellas se adentran entre los hepatocitos remarcando parcialmente su membrana. Mediante citometría de flujo no detectamos niveles de CD38 ni en las células endoteliales ni en las células de Kupffer.

Aunque las células hepáticas estrelladas representan entre 5-8% del total de las células hepáticas debido a su distribución y a la presencia de largas extensiones citoplasmáticas hacen que sea suficiente para cubrir prácticamente todo el territorio sinusoidal [128].

### **Aumento de la expresión del CD38 con la activación**

El patrón de expresión del CD38 en células hepáticas estrelladas presenta similitudes y diferencias si lo comparamos con el descrito en células del sistema hematopoyético. En estas células el CD38 se expresa en estadios tempranos de maduración (ej. timocitos, células Pre-B localizadas en la médula ósea), se pierde su expresión durante la maduración (ej. el 80% de los linfocitos circulantes son CD38 negativo) y se vuelve a expresar durante la activación (LT activados, células plasmáticas) [99].

En nuestro trabajo la gran diferencia encontrada respecto a este patrón de expresión es que de forma basal las células hepáticas estrelladas ya expresan niveles relativamente elevados de CD38 y la similitud es que durante la activación de estas células tanto *in vivo* como *in vitro* pudimos demostrar un aumento de su expresión.

En situaciones de lesión celular o en cultivos prolongados las células hepáticas estrelladas se activan, adquiriendo una elevada capacidad proliferativa y de síntesis de proteínas (ej. secreción de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas) [129]. La expresión de CD38 incremento tras la activación *in vitro* con éster de forbol, vía activación de la PKC. También *in vivo* mediante un estudio inmunohistoquímico y de citometría de flujo, se observó un aumento de la expresión del CD38 en hígados cirróticos de rata. Este resultado fue significativo, ya que la activación *in vitro* no refleja necesariamente la activación *in vivo* de las células hepáticas estrelladas en situaciones de lesión tisular hepática [130]. Otros genes también se ha visto que aumentan su expresión tras la activación de las células hepáticas estrelladas. Por ejemplo. ICAM-1,  $\alpha$ B-crystallin y otros genes relacionados con el citoesqueleto [48, 131, 132].

Células de origen no hematopoyético como los astrocitos también se ha visto que expresan de forma basal CD38 [133]. Curiosamente ambas los astrocitos y las células hepáticas estrelladas expresan GFAP y N-CAM. Dos proteínas relacionadas con el sistema nervioso. El GFAP es una proteína del citoesqueleto muy característica de este tipo celular, el N-CAM es una molécula de adhesión. Estas observaciones junto a las similitudes morfológicas que presentan ambas, hacen pensar que las células hepáticas estrelladas y los astrocitos podrían estar realizando funciones similares en sus respectivos órganos. Al igual que las células hepáticas estrelladas en respuesta a una lesión cerebral, los astrocitos sufren un proceso de activación adquiriendo una mayor capacidad proliferativa y de secreción de factores de crecimiento, acompañados de cambios morfológicos (por ejemplo formación de largas extensiones citoplasmáticas) [134]. Se sabe que los astrocitos juegan un papel importante en los mecanismos de reparación tisular en el sistema nervioso [135], al igual que las células hepáticas estrelladas en el hígado.

### **Caracterización bioquímica**

El anticuerpo generado CD38.14.27, fue capaz tanto de reconocer la proteína nativa (inmunoprecipitación) como desnaturalizada (Western-Blott), evidenciando en ambos casos una banda mayoritaria de 50 kDa.

Análisis cristalográficos y de difracción de rayos X demuestran que la proteína CD38 forma un homodímero a través de uniones no covalentes [136, 137]. No está claro, sin embargo, si siempre el CD38 está presente en forma de dímero en las membranas celulares, ya que muchos grupos solo han encontrado la forma monomérica [75, 138].

En nuestro trabajo encontramos que una pequeña parte del CD38 expresado en la membrana de las células hepáticas estrelladas estaba presente en forma de homodímero (aprox. 90 kDa). La relación fue de aproximadamente 1:10 respecto a la forma monomérica. En un trabajo publicado por el grupo de Santos-Argumedo demuestran que la estabilidad del dímero de CD38 depende principalmente del tipo de detergente utilizado y en menor grado de la presencia o ausencia de agentes reductores. Los

detergentes utilizados para solubilizar las células tipo polioxietilíneos (ej. NP-40 y Triton X-100) estabilizan mucho mejor el homodímero que no detergentes tipo digitonina, Chaps o BigChap. Los resultados obtenidos solubilizando linfocitos B con NP-40 en condiciones no reductoras e inmunoprecipitando, son muy parecidos a los que se obtuvieron en nuestro laboratorio [75, 123].

### **Movilización de calcio**

El CD38 cataliza la síntesis y degradación del metabolito cADPR, este metabolito induce la salida de calcio del retículo endoplasmático a través de los receptores Ryanodín [62]. Moléculas como el IP3 y el cADPR, controlan los niveles de calcio intracelular en diferentes tipos celulares. Diferentes grupos han demostrado la implicación del CD38 en enfermedades como el asma, diabetes, vasoconstrucción pulmonar y leucemia [139].

Nosotros quisimos ver si las señales intracelulares generadas a través del CD38 podrían mediar la activación de las células hepáticas estrelladas. Mediante la utilización del anticuerpo generado, se pudo observar como tras el entrecruzamiento de la molécula CD38 aumentaban los niveles de calcio intracelular. Previamente ya se había visto que anticuerpos agonistas eran capaces de incrementar los niveles de calcio intracelular en linfocitos [127]. El hecho que nuestro anticuerpo fuese agonista nos permitía utilizarlo para estudiar la función de CD38, estrategias similares han sido previamente utilizadas para el estudio de moléculas de membrana [85].

Otros efectos generados por anticuerpos agonistas previamente descritos, incluyen: producción de citocinas pro-inflamatorias en monocitos, NK, linfocitos y T activados [85, 140-142], proliferación de linfocitos T [79], protección frente a la apoptosis de los linfocitos B [143], fosforilación de tirosinas y activación de factores nucleares [144]. Se sabe que estos efectos están mediados por el CD38, aunque no se sabe con certeza de que manera se inician estas señales. El CD38 posee una corta cola citoplasmática sin sitios posibles de fosforilación, haciendo necesario la unión a una o más moléculas tanto física como funcionalmente para transducir señales al interior de las células. En linfocitos T se ha visto que el CD38 se asocia al complejo (TCR)-CD3, en linfocitos B al BCR y en las células NK al CD16 [88]. De esta manera el CD38 utiliza la maquinaria de otras moléculas para transducir sus propias señales. En las células hepáticas estrelladas hipotetizamos que algo similar podría estar pasando.

### **Papel inmunoregulador**

Las células hepáticas estrelladas no son tan solo las principales productoras de matriz extracelular durante el procesos de fibrogénesis, sino que también contribuyen a la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de mediadores solubles (citocinas, factores de crecimiento hematopoyético etc.) y la expresión en su superficie de moléculas de adhesión (ICAM-1, V-CAM y N-CAM) [47].

Por lo tanto, determinamos si el CD38 podría mediar señales que indujesen la secreción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión. Se determinó la IL-6 ya que esta citocina puede ser secretada por las células hepáticas estrelladas y por que el CD38 puede inducir su secreción en linfocitos T. En células hepáticas estrelladas tras el entrecruzamiento de la molécula CD38 con el anticuerpo CD38.14.27 inducimos la secreción de IL-6 de manera dosis-repuesta dependiente.

Una respuesta parecida ya se había visto tras la estimulación de células hepáticas estrelladas humanas con LPS o citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF) [145].

La IL-6 juega un importante papel en la respuesta inmune innata induciendo a los hepatocitos a producir proteínas de fase aguda. Demostrando el importante papel inmunoregulador de las células hepáticas estrelladas.

La IL-6 también favorece la proliferación y regeneración de los hepatocitos. Ratones IL-6 deficientes después de una hepatectomía parcial mostraron deficiencias en la regeneración hepática y un mayor daño tisular que fue parcialmente corregido con el tratamiento exógeno de IL-6 [146]. Corroborando los resultados obtenidos en el modelo de hepatectomía, hepatocitos de animales IL-6 deficientes tras un daño hepático causado por la administración de CCl<sub>4</sub>, presentaban mayor niveles de apoptosis, en este estudio el tratamiento exógeno con IL-6 hizo aumentar la tasa de proliferación de los hepatocitos, la entrada en la fase S del ciclo celular se acortaba [45]. Los experimentos en este trabajo demostraban que la IL-6 disminuía la apoptosis en los hepatocitos. Una de la explicaciones podría ser el hecho que los niveles de los factores de transcripción NF- $\kappa$  $\beta$  y STAT-3 estaban disminuidos el los animales IL-6 deficientes. NF- $\kappa$  $\beta$  tiene un efecto antiapoptótico en el hígado [147, 148], y STAT-3 también se ha visto que tiene un efecto antiapoptótico en líneas celulares no hepáticas [149].

La IL-6 también está involucrada en el desarrollo del proceso fibrogénico, aunque existe una gran controversia sobre el papel que juega. Animales transgénicos en IL-6 demostraron no desarrollar fibrosis [150]. La controversia se centra en el análisis de la fibrosis hepática en animales IL-6 deficientes. El grupo de Natsume después de la administración de CCl<sub>4</sub> a animales IL-6 deficientes, encontraron que la deficiencia de IL-6 atenuaba la fibrosis hepática [46] estos resultados no concuerdan con los datos obtenidos en el trabajo realizado con animales IL-6 transgénicos. Por el contrario, el grupo de Kovalovich, realizando experimentos similares pero en ratones con un “background” diferente (C57/BL6/SV129), mostraron que la deficiencia en IL-6 aumenta la fibrosis hepática [45]. No se sabe si la diferencia de los datos obtenidos está en relación a las cepas de ratón utilizada.

El mecanismo para la inducción de IL-6 en las células hepáticas estrelladas hasta el momento es desconocido. Así pues, la inducción de IL-6 a través de la activación del CD38 podría ser un posible mecanismo por el cual las células hepáticas estrelladas participarían en la regulación de la respuesta inmune y en la fibrogénesis. Uno de los datos obtenidos en este trabajo demuestra que la expresión de CD38 está altamente aumentada en células hepáticas estrelladas procedentes de hígados cirróticos, esta podría ser una posible razón del aumento de estos niveles de producción.

Se sabe que en una fase inicial la estimulación paracrina por parte de las células de Kupffer y las células endoteliales es la responsable de la activación de las células hepáticas estrelladas. El PDGF, producido en estadios tempranos mayoritariamente por las células de Kupffer, es el principal estímulo mitogénico que activa a las células hepáticas estrelladas. No obstante, el factor más importante para la perpetuación de este estado de activación es la estimulación autocrina [151]. Así pues, la secreción autocrina de IL-6 favorecería la perpetuación en este estado de activación.

Las células hepáticas estrelladas también participan en el proceso inflamatorio mediante la expresión en su superficie de moléculas de adhesión (I-CAM, V-CAM y N-CAM). Las moléculas de adhesión están implicadas en el proceso inflamatorio mediando el trasvase de leucocitos circulando por el torrente sanguíneo a los sitios de daño tisular, y la migración por el parénquima hepático mediante la interacción de los

leucocitos infiltrantes con las células residentes. Los mecanismos por los cuales las células migran a través de las células endoteliales está muy bien caracterizado. Sin embargo, la migración de las células inflamatorias a través del parénquima hepático y su posterior acumulación en las áreas de daño tisular, ha estado menos caracterizado. Debido a la estratégica localización de las células hepáticas estrelladas en el espacio de Disse, en contacto inmediato con las células inflamatorias acabadas de migrar por un lado y con los hepatocitos por el otro lado las células hepáticas estrelladas podrían estar jugando un papel importante.

Analizamos la expresión y la regulación de las moléculas de adhesión I-CAM, V-CAM y N-CAM en las células hepáticas estrelladas en respuesta a la estimulación con el CD38. La expresión de estas 3 moléculas de adhesión en células hepáticas estrelladas ya ha sido previamente descrita. Se ha detectado la expresión de I-CAM y V-CAM en células “resting” (frescas o a los 2-3 de estar en cultivo) y activadas (entre los 7-10 de estar en cultivo), y de N-CAM solo en células activadas [7, 47].

En nuestro trabajo utilizamos dos tiempos de cultivo 3 y 6 días, en ambos tiempos pudimos detectar niveles elevados de expresión de I-CAM, pero en cambio en ninguno de los dos tiempos pudimos detectar expresión ni de V-CAM ni de N-CAM. Una de las explicaciones podría ser que en el trabajo anterior se determinaron transcritos mediante RT-PCR y nosotros determinamos niveles de proteína, mediante la utilización de un ELISA. Las diferencias podrían deberse a que no todos los transcritos se traducen a proteína o que la técnica de ELISA es menos sensible que la RT-PCR.

Determinamos la regulación de la expresión de las 3 moléculas de adhesión tras el entrecruzamiento de la molécula CD38 con el anticuerpo CD38.14.27 a diferentes tiempos de cultivo. A diferencia de lo que ocurría con la inducción de la secreción de IL-6, solo pudimos detectar un aumento de la expresión del CD38 en células hepáticas estrelladas tras 6 días de cultivo y no en células cultivadas durante menos días, indicándonos que las señales vía CD38 solo afectaban a la expresión de estas moléculas en el fenotipo activado/diferenciado.

El incremento de la expresión de estas 3 moléculas podría tener un papel importante en la transmigración de los leucocitos desde los sinusoides hepáticos hasta los sitios de lesión tisular que tiene lugar durante la respuesta inflamatoria. La infiltración de leucocitos y monocitos/macrófagos durante el proceso inflamatorio es un componente

claro la lesión celular. Se ha visto que el bloqueo de la infiltración de macrófagos inhibe la activación de las células hepáticas estrelladas y la supresión, en parte, del desarrollo del proceso de fibrogenesis [152].

En este trabajo por primera vez demostramos la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión I-CAM, V-CAM y N-CAM vía CD38. Citocinas pro-inflamatorias se sabe que hacen aumentar los niveles de expresión de I-CAM y V-CAM y factores de crecimiento de N-CAM. Demostrando una diferencia en la regulación.

La expresión tanto de IL-6 como de las moléculas de adhesión ICAM-1 y V-CAM se ha visto que esta regulada por el factor de transcripción NFκB. NFκB esta altamente activado en células hepáticas activadas/diferenciadas y media la producción de IL-6 y la expresión de ICAM-1 en estas células [153]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la activación vía CD38 activa a NFκB, y que esta activación es necesaria para mediar la inducción de PLCγ vía CD38 [154].

### **Contracción de las células hepáticas estrelladas**

Las células hepáticas estrelladas tiene la capacidad de contraerse o relajares en repuesta a diferentes agentes vasoactivos. En diferentes trabajos se ha demostrado la contracción a estímulos como: endotelina-1, trombina, angiotensina, vasopresina etc. y relajación en respuesta a estímulos como: NO, ANP (atrial natriuretic peptide) [2, 155].

Los sinusoides hepáticos son el principal sitio de regulación de flujo sanguíneo en el hígado. Dentro del territorio hepático es la estructura vascular más estrecha; la mayor resistencia vascular ocurre en los sinusoides [156]. Las células hepáticas estrelladas debido a sus largas extensiones citoplasmáticas que rodean los sinusoides, permiten regular el flujo que pasa a través de los sinusoides por contracción [2].

Las primeras evidencias directas fueron reportadas mediante un estudio de microscopia *in vivo* realizado en hígados de ratas normales [157]. Mediante la infusión de ET-1 a través de la vena porta se observó una marcada disminución del diámetro de los sinusoides y un aumento de la resistencia intrahepática. Se observó que la ET-1 inducía vasoconstricción en los sitios donde estaban localizadas las células hepáticas estrelladas, y no donde se localizaban las células de Kupffer o las células endoteliales



sinusoidales. No obstante, un estudio posterior contradecía estos resultados, demostrando que la ET-1 causaba una contracción a nivel pre-sinusoidal siendo el resultado una disminución del diámetro de los sinusoides pero sin la participación de las células hepáticas estrelladas [56]. Existe también controversia en algunos experimentos realizados *in vitro*. Algunos grupos han podido demostrar la contracción de las células hepáticas estrelladas en respuesta a la ET-1 y la sustancia P, tanto en células hepáticas estrelladas tras 24 horas de cultivo como en su fenotipo diferenciado/activado de una manera más clara y con dosis más bajas de ET-1 [158]. Sin embargo, algunas de estas observaciones no han podido ser confirmadas por otros grupos [159, 160]. Una posible explicación, podría ser que dependiendo del aislamiento pueden resultar dañados los receptores o la sensibilidad de las diferentes técnicas utilizadas para la cuantificación de la contracción. Los experimentos realizados hasta el momento, básicamente, han utilizado una de las siguientes técnicas: a) contracción de matrices de latex b) observación mediante un microscopio de contraste de fases.

Después de la identificación de la molécula CD38 en la membrana de las células hepáticas estrelladas quisimos valorar su posible implicación en la contracción celular. Trabajos previos demuestran que el metabolito producido por el CD38, el cADPR, está implicado en la contracción de células musculares lisas de vías aéreas, vasos sanguíneos, conductos seminíferos e intestino.

Mediante la utilización de la microscopia de tracción, técnica utilizada por primera vez para la cuantificación de la tracción celular en células hepáticas estrelladas, pudimos demostrar como el entrecruzamiento de la molécula CD38 con el anticuerpo CD38.14.27 inducía un aumento de la contracción de las células hepáticas estrelladas.

El mecanismo más importante de la contracción celular es la movilización de calcio, en este trabajo demostramos que la estimulación del CD38 induce la movilización de calcio en las células hepáticas estrelladas.

En un estudio realizado con células musculares lisas de las vías aéreas, demostraron que citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  hacían aumentar los niveles de expresión de CD38 y su actividad catalítica. También en este estudio demostraban que este aumento de expresión tras el tratamiento con citocinas pro-inflamatorias iba acompañado de una mayor movilización de calcio en respuesta a estímulos como la

acetilcolina, bradikinina y trombina, y que esta respuesta disminuía considerablemente previo tratamiento de las células con un antagonista del metabolito cADPR (8-bromo-cADPR) [104]. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos de células musculares lisas procedentes de ratones CD38 deficientes, donde la movilización de calcio intracelular en respuesta a la ET-1 y agonistas muscarínicos era mucho menor comparada con la respuesta de los ratones *wild-type* [105]. Resultados similares se han obtenido en células musculares lisas de arterias coronarias y conductos seminíferos [106, 107].

Una vez visto que el anticuerpo CD38.14.27 inducía un incremento en la contracción de las células hepáticas estrelladas, valoramos si este efecto se podía traducir en un aumento de la resistencia intrahepática. Mediante la técnica de perfusión hepática pudimos observar un aumento significativo de la presión portal, poniendo de relevancia la posible implicación de la molécula CD38 en un marco más fisiológico. Resultados muy similares y recientes se han observado en ratones CD38 deficientes. Mediante un sistema que permitía valorar la resistencia intrapulmonar, se observó una disminución significativa de la resistencia pulmonar en respuesta a dosis decreciente de metacolina, en animales CD38 deficientes [105].

Después de haber valorado el efecto del CD38 en la contracción, tanto a nivel celular como en el hígado. Quisimos determinar el mecanismo de acción. Dos acontecimientos claves e importantes en la contracción celular son: *a)* la polimerización de las fibras de actina, es decir el paso de actina glomerular (G) a actina fibrilar (F) y *b)* la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, favoreciendo de esta manera un cambio conformacional que permite finalmente el deslizamiento de la miosina sobre la actina [161-163]. La miosina juega un papel clave tanto en procesos de citokenesis como de “*cell spreading*” [125]. En estudios realizados *in vivo* la fosforilación de la Ser19 de la cadena ligera de la miosina se correlaciona con procesos contráctiles tanto en células musculares lisas como en células no musculares [69].

Tras la activación de células hepáticas estrelladas con el anticuerpo CD38.14.27, pudimos observar un aumento de los niveles de fosforilación de la cadena ligera de la miosina y un aumento de la formación de las fibras de F-actina.

No obstante la tracción celular también tiene relevancia en otros procesos como: adhesión, migración, invasión etc. Los datos obtenidos ponen de relevancia la importancia del CD38 en procesos contráctiles y su posible implicación en el establecimiento de la hipertensión portal. El aumento de la tracción celular podría significar también una mayor capacidad de migración de las células hepáticas estrelladas hacia áreas de lesión tisular.

### **CD38 y fibrogénesis**

Las células hepáticas estrelladas juegan un proceso clave en el desarrollo de la fibrogénesis. En respuesta a una lesión tisular, las células hepáticas estrelladas se activan y adquieren propiedades fibrogénicas. Las células hepáticas activadas migran y se acumulan en el foco de daño tisular, secretando grandes cantidades de ECM y regulando el recambio de la matriz extracelular. Los niveles de colágeno sintetizados por las células hepáticas estrelladas están tanto regulados a nivel transcripcional como post-transcripcional [164]. El colágeno tipo I es la proteína de la matriz extracelular que se deposita mayoritariamente durante el proceso de fibrogénesis, siendo las células hepáticas estrelladas activadas su principal fuente [165]. En el proceso de fibrogénesis también existe un cambio cualitativo de la matriz extracelular, se pasa de tener una matriz de baja densidad a una matriz de alta densidad este cambio viene favorecido por la actividad de las metaloproteinasas y sus inhibidores, Durante el proceso de fibrogénesis se sabe que hay un aumento de la MMP-2 (degradación colágeno IV) y del TIMP-1,-2 (Inhibidor de la MMP-1).

Nos propusimos ver si el CD38 podría estar regulando recambios de matriz extracelular. A los 6 días de estar en cultivo la activación del CD38 hizo disminuir los niveles mRNA de colágeno I y MMP-2 indicándonos que las señales transducidas por el CD38 tendrían un efecto no fibrogénico. El resultado nos sorprendió, ya que previamente habíamos visto que las señales transducidas a través del CD38 tenían un efecto pro-inflamatorio y pro-contráctil. Una explicación podría ser que la activación de la célula hepática estrellada vía CD38 hace que esta derive hacia un fenotipo pro-inflamatorio y pro-contráctil pero no pro-fibrogénico. Previamente se ha demostrado la heterogeneidad dentro de esta población. En un estudio comparativo realizado con clones de células hepáticas estrelladas obtenidos de un mismo hígado cirrótico de rata,

se pudieron observar grandes diferencias respecto a la producción de colágeno, metaloproteinasas, citocinas y supervivencia [24, 166]. Por otro lado, se ha podido observar que células hepáticas estrelladas en cultivo pueden derivar de un fenotipo fibrogénico a otro pro-inflamatorio [167]. Curiosamente a los 4 días la activación del CD38 indujo solo un aumento del TIMP-1 sin variar la expresión ni de colágeno I ni de MMP-2. Indicándonos de nuevo la importancia del estado de activación/diferenciación para mediar funciones efectoras vía CD38.

### **Modelo propuesto para la activación de las células hepáticas estrelladas vía CD38**

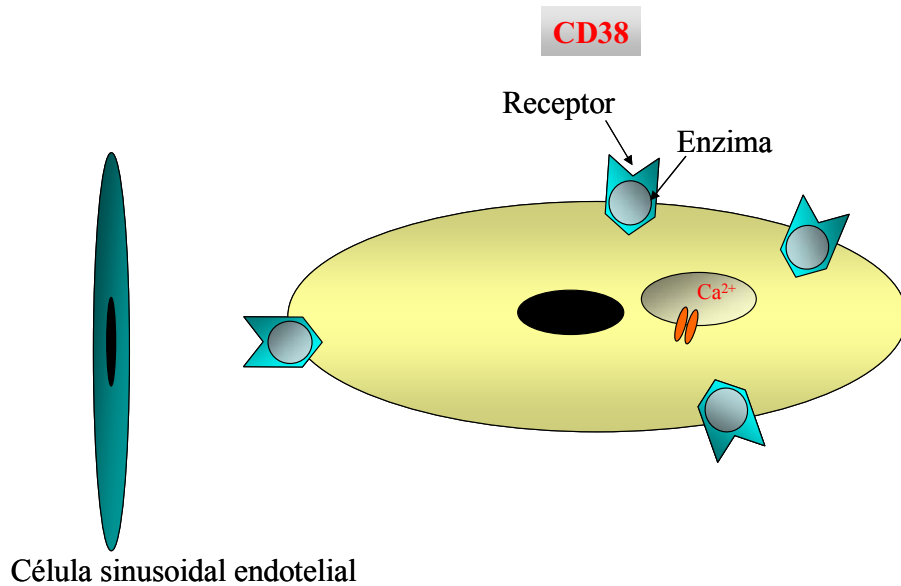
Los datos aportados en este trabajo sugieren que la interacción del CD38 con su ligando natural CD31 o con algún otro ligando por ahora desconocido inducirían la transducción de señales favoreciendo la activación de las células hepáticas estrelladas, amplificando de este modo la respuesta inflamatoria observada tras una lesión tisular. En los hígados normales no se ha podido detectar la presencia de CD31 en los sinusoides hepáticos solo en el endotelio de los vasos grandes, pero en el proceso de capilarización de los sinusoides que tiene lugar durante la cirrosis, se ha detectado la expresión de CD31 en los sinusoides hepáticos [168]. Por tanto, la interacción del CD38 con el CD31 sobreexpresado en los sinusoides, podría mediar tanto la activación como diversas funciones efectoras de las células hepáticas estrelladas (ver **figura 5.1**).

Por otro lado, el CD38 es también un enzima y algunas de sus funciones requieren esta actividad enzimática [169]. Algunas de estas funciones también podrían ser importantes en las células hepáticas estrelladas. El sustrato del CD38 es el NAD(P)<sup>+</sup>, un metabolito que normalmente se localiza en el interior de la célula y en muy bajas concentraciones en el medio extracelular, pero en sitios de necrosis celular y lesión tisular aumenta la concentración extracelular de NAD [93, 94]. Así pues, en condiciones homeostáticas normales, una mínima cantidad de sustrato sería alcanzable para el CD38, limitando su actividad catalítica. Sin embargo, cerca de un foco infeccioso o inflamatorio, aumentarían las concentraciones de NAD a niveles suficientes para ser utilizado por el CD38 (ver **figura 5.1**).

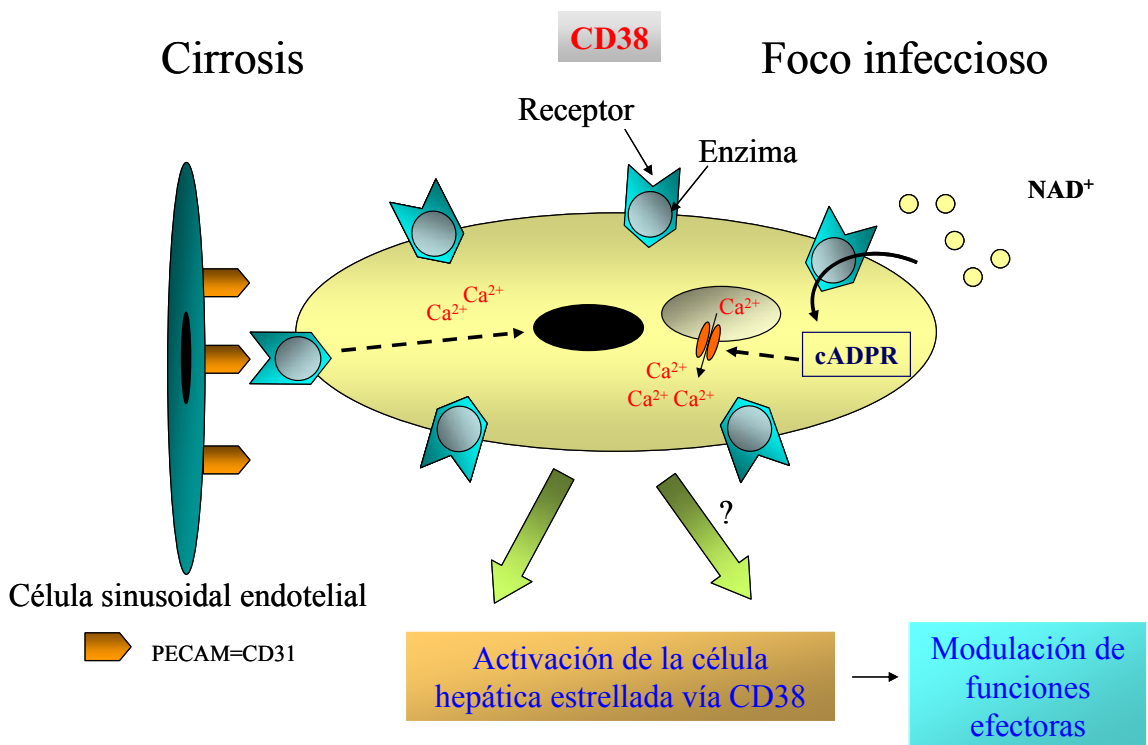
Este trabajo, en definitiva, contribuye significativamente al conocimiento del papel que juega el CD38 en las células hepáticas estrelladas. El mejor entendimiento de como

el CD38 media la activación de las células hepáticas estrelladas podría aportar información para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la cirrosis y la hipertensión portal.

A



B



**Figura 5.1 Modelo propuesto para la activación de las células hepáticas estrelladas vía CD38.** En condiciones normales, las células sinusoidales no expresan P-CAM y en el medio extracelular la concentración de  $NAD^+$  es mínima (A), durante la cirrosis se induce la expresión de P-CAM (ligando natural del CD38) en la membrana de las células sinusoidales y por otro lado en los focos infecciosos podemos encontrar altas concentraciones de  $NAD^+$  (sustrato de la parte enzimática del CD38), también en

estas dos circunstancias hay un aumento de la expresión de CD38 en la membrana de las células hepáticas estrelladas. El resultado de la interacción del CD31 con el CD38 y por el otro lado el aumento de la actividad enzimática del CD38 sería la activación de las células hepáticas estrelladas.

## 6. CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

### 1. Se ha identificado la molécula CD38 en la membrana de las células hepáticas estrelladas.

- 1.1. El CD38 se expresa de forma basal en las células hepáticas estrelladas y su expresión aumenta tras la activación tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”.
- 1.2. El CD38 presente en la membrana de las células hepáticas estrelladas tiene un peso aproximado de 50KD y un décima parte se encuentra en forma de dímero.

### 2. El CD38 esta implicado en la activación de las células hepáticas estrelladas afectando distintas funciones.

- 2.1. El entrecruzamiento de CD38 induce la movilización de calcio intracelular de las células hepáticas estrelladas.
- 2.2. CD38 induce la secreción de IL-6 independientemente del estado de activación de las células hepáticas estrelladas.
- 2.3. CD38 induce la expresión de las moléculas de adhesión I-CAM, V-CAM y N-CAM en células hepáticas estrelladas activadas pero no en quiescente (dependiente estado de activación).
- 2.4. CD38 *in vitro* induce la contracción de las células hepáticas estrelladas en cultivo, la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y la reorganización de citoesqueleto e *in vivo* induce un aumento de la presión portal en ratas
- 2.5. CD38 inhibe la síntesis de colágeno I y metaloproteinasa II (MMP-2) los efectos son diferentes según el estado de activación de la célula.

Estos resultados indican que CD38 esta implicado en procesos de inflamación, contracción y fibrogénesis mediados por las células hepáticas estrelladas.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Pinzani and P. Gentilini, *Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis*. Semin Liver Dis 19, 397-410 (1999).
- [2] M. Pinzani, P. Failli, C. Ruocco, A. Casini, S. Milani, E. Baldi, A. Giotti and P. Gentilini, *Fat-Storing Cells As Liver-Specific Pericytes - Spatial Dynamics of Agonist-Stimulated Intracellular Calcium Transients*. Journal of Clinical Investigation 90, 642-646 (1992).
- [3] A. Geerts, *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. Semin Liver Dis 21, 311-335 (2001).
- [4] H. Reynaert, M. G. Thompson, T. Thomas and A. Geerts, *Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension*. Gut 50, 571-581 (2002).
- [5] L. F. Eng and R. S. Ghirnikar, *GFAP and astrogliosis*. Brain Pathol 4, 229-237 (1994).
- [6] T. Niki, M. Pekny, K. Hellemans, P. D. Bleser, K. V. Berg, F. Vaeyens, E. Quartier, F. Schuit and A. Geerts, *Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells*. Hepatology 29, 520-527 (1999).
- [7] T. Knittel, S. Aurisch, K. Neubauer, S. Eichhorst and G. Ramadori, *Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair*. Am J Pathol 149, 449-462 (1996).

- [8] D. Cassiman, J. van Pelt, R. De Vos, F. Van Lommel, V. Desmet, S. H. Yap and T. Roskams, *Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells*. *Am J Pathol* 155, 1831-1839 (1999).
- [9] D. Cassiman, C. Denef, V. J. Desmet and T. Roskams, *Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors*. *Hepatology* 33, 148-158 (2001).
- [10] E. Olaso and S. L. Friedman, *Molecular regulation of hepatic fibrogenesis*. *J Hepatol* 29, 836-847 (1998).
- [11] E. Albanis and S. L. Friedman, *Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy*. *Clin Liver Dis* 5, 315-3vi (2001).
- [12] S. L. Friedman, *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies*. *N Engl J Med* 328, 1828-1835 (1993).
- [13] R. Alcolado, M. J. Arthur and J. P. Iredale, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Clin Sci (Lond)* 92, 103-112 (1997).
- [14] S. K. Vyas, H. Leyland, J. Gentry and M. J. P. Arthur, *Rat Hepatic Lipocytes Synthesize and Secrete Transin (Stromelysin) in Early Primary Culture*. *Gastroenterology* 109, 889-898 (1995).
- [15] S. Milani, H. Herbst, D. Schuppan, S. C. Grappone, G. Pellegrini, M. Pinzani, A. Casini, A. Calabro, G. Ciancio, F. Stefanini, A. K. Burroughs and C. Surrenti, *Differential Expression of Matrix-Metalloproteinase-1 and Matrix-Metalloproteinase-2 Genes in Normal and Fibrotic Human Liver*. *American Journal of Pathology* 144, 528-537 (1994).
- [16] M. J. P. Arthur, A. Stanley, J. P. Iredale, J. A. Rafferty, R. M. Hembry and S. L. Friedman, *Secretion of 72 Kda Type-Iv Collagenase Gelatinase by Cultured Human Lipocytes - Analysis of Gene-Expression, Protein-Synthesis and Proteinase Activity*. *Biochemical Journal* 287, 701-707 (1992).

- [17] P. J. Winwood, D. Schuppan, J. P. Iredale, C. A. Kawser, A. J. P. Docherty and M. J. P. Arthur, *Kupffer Cell-Derived 95-Kd Type-Iv Collagenase/Gelatinase-B - Characterization and Expression in Cultured-Cells*. *Hepatology* 22, 304-315 (1995).
- [18] N. Theret, K. Lehti, O. Musso and B. Clement, *MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells*. *Hepatology* 30, 462-468 (1999).
- [19] R. C. Benyon, C. J. Hovell, M. Da Gaca, E. H. Jones, J. P. Iredale and M. J. P. Arthur, *Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation*. *Hepatology* 30, 977-986 (1999).
- [20] C. Hellerbrand, B. Stefanovic, F. Giordano, E. R. Burchardt and D. A. Brenner, *The role of TGF beta 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo*. *Journal of Hepatology* 30, 77-87 (1999).
- [21] N. Sanderson, V. Factor, P. Nagy, J. Kopp, P. Kondaiah, L. Wakefield, A. B. Roberts, M. B. Sporn and S. S. Thorgeirsson, *Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2572-2576 (1995).
- [22] A. M. Gressner, *Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells*. *J Hepatol* 22, 28-36 (1995).
- [23] A. D. Luster, *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med* 338, 436-445 (1998).
- [24] P. Greenwel, J. Rubin, M. Schwartz, E. L. Hertzberg and M. Rojkind, *Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl4-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43*. *Lab Invest* 69, 210-216 (1993).

- [25] M. Pinzani, H. E. Abboud, L. Gesualdo and S. L. Abboud, *Regulation of macrophage colony-stimulating factor in liver fat-storing cells by peptide growth factors*. Am J Physiol 262, C876-C881 (1992).
- [26] F. Marra, A. J. Valente, M. Pinzani and H. E. Abboud, *Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines*. J Clin Invest 92, 1674-1680 (1993).
- [27] M. Pinzani, V. Carloni, F. Marra, D. Riccardi, G. Laffi and P. Gentilini, *Biosynthesis of platelet-activating factor and its 1O-acyl analogue by liver fat-storing cells*. Gastroenterology 106, 1301-1311 (1994).
- [28] M. Salmi and S. Jalkanen, *Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking*. Nat Rev Immunol 5, 760-771 (2005).
- [29] M. J. Czaja, A. Geerts, J. Xu, P. Schmiedeberg and Y. Ju, *Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease*. J Leukoc Biol 55, 120-126 (1994).
- [30] F. Marra, R. DeFranco, C. Grappone, S. Milani, S. Pastacaldi, M. Pinzani, R. G. Romanelli, G. Laffi and P. Gentilini, *Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration*. Am J Pathol 152, 423-430 (1998).
- [31] F. Marra, R. DeFranco, C. Grappone, M. Parola, S. Milani, G. Leonarduzzi, S. Pastacaldi, U. O. Wenzel, M. Pinzani, M. U. Dianzani, G. Laffi and P. Gentilini, *Expression of monocyte chemotactic protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E*. J Investig Med 47, 66-75 (1999).
- [32] J. Bosch, M. P. Pizcueta, M. Fernandez, F. Feu, I. Cirera, A. Luca and J. C. Garcia-Pagan, *Hepatic, splanchnic and systemic haemodynamic abnormalities in portal hypertension*. Baillieres Clin Gastroenterol 6, 425-436 (1992).



- [33] H. Sprenger, A. Kaufmann, H. Garn, B. Lahme, D. Gemsa and A. M. Gressner, *Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells*. *J Hepatol* 30, 88-94 (1999).
- [34] N. Sheron, G. Bird, J. Koskinas, B. Portmann, M. Ceska, I. Lindley and R. Williams, *Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration*. *Hepatology* 18, 41-46 (1993).
- [35] J. Maltby, S. Wright, G. Bird and N. Sheron, *Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis*. *Hepatology* 24, 1156-1160 (1996).
- [36] J. J. Maher, M. K. Scott, J. M. Saito and M. C. Burton, *Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis*. *Hepatology* 25, 624-630 (1997).
- [37] H. Sprenger, A. Kaufmann, H. Garn, B. Lahme, D. Gemsa and A. M. Gressner, *Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells*. *Gastroenterology* 113, 277-285 (1997).
- [38] J. J. Maher, *Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol*. *Am J Physiol* 269, G518-G523 (1995).
- [39] K. J. Busam, T. M. Bauer, J. Bauer, W. Gerok and K. Decker, *Interleukin-6 release by rat liver macrophages*. *J Hepatol* 11, 367-373 (1990).
- [40] P. Greenwel, M. Schwartz, M. Rosas, S. Peyrol, J. A. Grimaud and M. Rojkind, *Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6*. *Lab Invest* 65, 644-653 (1991).
- [41] S. Black, I. Kushner and D. Samols, *C-reactive Protein*. *J Biol Chem* 279, 48487-48490 (2004).

- [42] M. K. Chang, C. J. Binder, M. Torzewski and J. L. Witztum, *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13043-13048 (2002).
- [43] M. W. Turner, *The role of mannose-binding lectin in health and disease*. Mol Immunol 40, 423-429 (2003).
- [44] D. M. Steel and A. S. Whitehead, *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein*. Immunol Today 15, 81-88 (1994).
- [45] K. Kovalovich, R. A. DeAngelis, W. Li, E. E. Furth, G. Ciliberto and R. Taub, *Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice*. Hepatology 31, 149-159 (2000).
- [46] M. Natsume, H. Tsuji, A. Harada, M. Akiyama, T. Yano, H. Ishikura, I. Nakanishi, K. Matsushima, S. Kaneko and N. Mukaida, *Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice*. Journal of Leukocyte Biology 66, 601-608 (1999).
- [47] T. Knittel, C. Dinter, D. Kobold, K. Neubauer, M. Mehde, S. Eichhorst and G. Ramadori, *Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair*. Am J Pathol 154, 153-167 (1999).
- [48] Hellerbrand, S. C. Wang, H. Tsukamoto, D. A. Brenner and R. A. Rippe, *Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells*. Hepatology 24, 670-676 (1996).
- [49] S. G. Kallapur and R. A. Akeson, *The neural cell adhesion molecule (NCAM) heparin binding domain binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Neurosci Res 33, 538-548 (1992).

- [50] D. R. Friedlander, P. Milev, L. Karthikeyan, R. K. Margolis, R. U. Margolis and M. Grumet, *The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth.* J Cell Biol 125, 669-680 (1994).
- [51] P. Milev, D. R. Friedlander, T. Sakurai, L. Karthikeyan, M. Flad, R. K. Margolis, M. Grumet and R. U. Margolis, *Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules.* J Cell Biol 127, 1703-1715 (1994).
- [52] J. Bosch and J. C. Garcia-Pagan, *Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension.* J Hepatol 32, 141-156 (2000).
- [53] J. Vorobioff, J. E. Bredfeldt and R. J. Groszmann, *Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension.* Am J Physiol 244, G52-G57 (1983).
- [54] J. Vorobioff, J. E. Bredfeldt and R. J. Groszmann, *Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats.* Gastroenterology 87, 1120-1126 (1984).
- [55] P. S. Bhathal and H. J. Grossman, *Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators.* J Hepatol 1, 325-337 (1985).
- [56] K. Kaneda, W. Ekataksin, M. Sogawa, A. Matsumura, A. Cho and N. Kawada, *Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction.* Hepatology 27, 735-747 (1998).
- [57] J. Reichen and M. Le, *Verapamil favorably influences hepatic microvascular exchange and function in rats with cirrhosis of the liver.* J Clin Invest 78, 448-455 (1986).

- [58] T. L. Pallone, Z. Zhang and K. Rhinehart, *Physiology of the renal medullary microcirculation*. Am J Physiol Renal Physiol 284, F253-F266 (2003).
- [59] H. F. Yee, Jr., *Ca<sup>2+</sup> and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction*. Hepatology 33, 1007-1008 (2001).
- [60] M. S. Kannan, Y. S. Prakash, T. Brenner, J. R. Mickelson and G. C. Sieck, *Role of ryanodine receptor channels in Ca<sup>2+</sup> oscillations of porcine tracheal smooth muscle*. Am J Physiol 272, L659-L664 (1997).
- [61] S. Lynn and J. I. Gillespie, *Basic properties of a novel ryanodine-sensitive, caffeine-insensitive calcium-induced calcium release mechanism in permeabilised human vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett 367, 23-27 (1995).
- [62] Y. S. Prakash, M. S. Kannan, T. F. Walseth and G. C. Sieck, *Role of cyclic ADP-ribose in the regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in porcine tracheal smooth muscle*. Am J Physiol 274, C1653-C1660 (1998).
- [63] M. S. Kannan, A. M. Fenton, Y. S. Prakash and G. C. Sieck, *Cyclic ADP-ribose stimulates sarcoplasmic reticulum calcium release in porcine coronary artery smooth muscle*. Am J Physiol 270, H801-H806 (1996).
- [64] J. F. Kuemmerle and G. M. Makhlof, *Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release in intestinal longitudinal muscle*. J Biol Chem 270, 25488-25494 (1995).
- [65] R. Bataller, X. Gasull, P. Gines, K. Hellemans, M. N. Gorbic, J. M. Nicolas, P. Sancho-Bru, H. D. De Las, A. Gual, A. Geerts, V. Arroyo and J. Rodes, *In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels*. Hepatology 33, 956-962 (2001).
- [66] G. M. Herrera, T. J. Heppner and M. T. Nelson, *Voltage dependence of the coupling of Ca(2+) sparks to BK(Ca) channels in urinary bladder smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol 280, C481-C490 (2001).

- [67] G. M. Herrera and M. T. Nelson, *Differential regulation of SK and BK channels by Ca(2+) signals from Ca(2+) channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes*. J Physiol 541, 483-492 (2002).
- [68] X. Gasull, R. Bataller, P. Gines, P. Sancho-Bru, J. M. Nicolas, M. N. Gorbic, E. Ferrer, E. Badia, A. Gual, V. Arroyo and J. Rodes, *Human myofibroblastic hepatic stellate cells express Ca(2+)-activated K(+) channels that modulate the effects of endothelin-1 and nitric oxide*. J Hepatol 35, 739-748 (2001).
- [69] F. Matsumura, S. Ono, Y. Yamakita, G. Totsukawa and S. Yamashiro, *Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells*. J Cell Biol 140, 119-129 (1998).
- [70] K. Burridge and K. Wennerberg, *Rho and Rac take center stage*. Cell 116, 167-179 (2004).
- [71] A. P. Somlyo and A. V. Somlyo, *Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev 83, 1325-1358 (2003).
- [72] T. Kitazawa, M. Eto, T. P. Woodsome and D. L. Brautigan, *Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility*. J Biol Chem 275, 9897-9900 (2000).
- [73] T. P. Woodsome, M. Eto, A. Everett, D. L. Brautigan and T. Kitazawa, *Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle*. J Physiol 535, 553-564 (2001).
- [74] C. Terhorst, A. van Agthoven, K. LeClair, P. Snow, E. Reinherz and S. Schlossman, *Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10*. Cell 23, 771-780 (1981).

- [75] D. G. Jackson and J. I. Bell, *Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation*. *J Immunol* 144, 2811-2815 (1990).
- [76] F. Malavasi, A. Funaro, S. Roggero, A. Horenstein, L. Calosso and K. Mehta, *Human CD38: a glycoprotein in search of a function*. *Immunol Today* 15, 95-97 (1994).
- [77] F. Malavasi, F. Caligaris-Cappio, C. Milanese, P. Dellabona, P. Richiardi and A. O. Carbonara, *Characterization of a murine monoclonal antibody specific for human early lymphohemopoietic cells*. *Hum Immunol* 9, 9-20 (1984).
- [78] M. Alessio, S. Roggero, A. Funaro, L. B. De Monte, L. Peruzzi, M. Geuna and F. Malavasi, *CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells*. *J Immunol* 145, 878-884 (1990).
- [79] A. Funaro, G. C. Spagnoli, C. M. Ausiello, M. Alessio, S. Roggero, D. Delia, M. Zaccolo and F. Malavasi, *Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation*. *J Immunol* 145, 2390-2396 (1990).
- [80] D. J. States, T. F. Walseth and H. C. Lee, *Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38*. *Trends Biochem Sci* 17, 495 (1992).
- [81] M. Howard, J. C. Grimaldi, J. F. Bazan, F. E. Lund, L. Santos-Argumedo, R. M. Parkhouse, T. F. Walseth and H. C. Lee, *Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38*. *Science* 262, 1056-1059 (1993).
- [82] S. Takasawa, A. Tohgo, N. Noguchi, T. Koguma, K. Nata, T. Sugimoto, H. Yonekura and H. Okamoto, *Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP*. *J Biol Chem* 268, 26052-26054 (1993).

- [83] R. J. Summerhill, D. G. Jackson and A. Galione, *Human lymphocyte antigen CD38 catalyzes the production of cyclic ADP-ribose*. FEBS Lett 335, 231-233 (1993).
- [84] L. Gelman, P. Deterre, H. Gouy, L. Boumsell, P. Debre and G. Bismuth, *The lymphocyte surface antigen CD38 acts as a nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in human T lymphocytes*. Eur J Immunol 23, 3361-3364 (1993).
- [85] C. M. Ausiello, A. la Sala, C. Ramoni, F. Urbani, A. Funaro and F. Malavasi, *Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation*. Cell Immunol 173, 192-197 (1996).
- [86] O. Silvennoinen, H. Nishigaki, A. Kitanaka, M. Kumagai, C. Ito, F. Malavasi, Q. Lin, M. E. Conley and D. Campana, *CD38 signal transduction in human B cell precursors. Rapid induction of tyrosine phosphorylation, activation of syk tyrosine kinase, and phosphorylation of phospholipase C-gamma and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Immunol 156, 100-107 (1996).
- [87] M. Kumagai, E. Coustan-Smith, D. J. Murray, O. Silvennoinen, K. G. Murti, W. E. Evans, F. Malavasi and D. Campana, *Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis*. J Exp Med 181, 1101-1110 (1995).
- [88] A. Funaro, L. B. De Monte, U. Dianzani, M. Forni and F. Malavasi, *Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages*. Eur J Immunol 23, 2407-2411 (1993).
- [89] S. Zupo, E. Rugari, M. Dono, G. Taborelli, F. Malavasi and M. Ferrarini, *CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells*. Eur J Immunol 24, 1218-1222 (1994).
- [90] K. Mehta, U. Shahid and F. Malavasi, *Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions*. FASEB J 10, 1408-1417 (1996).

- [91] S. Deaglio, M. Morra, R. Mallone, C. M. Ausiello, E. Prager, G. Garbarino, U. Dianzani, H. Stockinger and F. Malavasi, *Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member*. *J Immunol* 160, 395-402 (1998).
- [92] J. W. Goding and M. C. Howard, *Ecto-enzymes of lymphoid cells*. *Immunol Rev* 161, 5-10 (1998).
- [93] S. Adriouch, W. Ohlrogge, F. Haag, F. Koch-Nolte and M. Seman, *Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector*. *J Immunol* 167, 196-203 (2001).
- [94] Z. X. Liu, O. Azhipa, S. Okamoto, S. Govindarajan and G. Dennert, *Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces t cell apoptosis in vivo and in vitro*. *J Immunol* 167, 4942-4947 (2001).
- [95] R. Aarhus, R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth and H. C. Lee, *ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP*. *J Biol Chem* 270, 30327-30333 (1995).
- [96] E. N. Chini, C. C. Chini, I. Kato, S. Takasawa and H. Okamoto, *CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues*. *Biochem J* 362, 125-130 (2002).
- [97] A. L. Perraud, A. Fleig, C. A. Dunn, L. A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. J. Stokes, Q. Zhu, M. J. Bessman, R. Penner, J. P. Kinet and A. M. Scharenberg, *ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology*. *Nature* 411, 595-599 (2001).
- [98] Y. Sano, K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime and K. Furuichi, *Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2*. *Science* 293, 1327-1330 (2001).



- [99] F. E. Lund, D. A. Cockayne, T. D. Randall, N. Solvason, F. Schuber and M. C. Howard, *CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction*. Immunol Rev 161, 79-93 (1998).
- [100] Y. J. Liu and C. Arpin, *Germinal center development*. Immunol Rev 156, 111-126 (1997).
- [101] M. Pfister, A. Ogilvie, C. P. da Silva, A. Grahner, A. H. Guse and S. Hauschildt, *NAD degradation and regulation of CD38 expression by human monocytes/macrophages*. Eur J Biochem 268, 5601-5608 (2001).
- [102] A. M. Oliver, F. Martin and J. F. Kearney, *Mouse CD38 is down-regulated on germinal center B cells and mature plasma cells*. J Immunol 158, 1108-1115 (1997).
- [103] T. Koguma, S. Takasawa, A. Tohgo, T. Karasawa, Y. Furuya, H. Yonekura and H. Okamoto, *Cloning and characterization of cDNA encoding rat ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase (homologue to human CD38) from islets of Langerhans*. Biochim Biophys Acta 1223, 160-162 (1994).
- [104] D. A. Deshpande, T. F. Walseth, R. A. Panettieri and M. S. Kannan, *CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness*. FASEB J 17, 452-454 (2003).
- [105] D. A. Deshpande, T. A. White, A. G. Guedes, C. Milla, T. F. Walseth, F. E. Lund and M. S. Kannan, *Altered airway responsiveness in CD38-deficient mice*. Am J Respir Cell Mol Biol 32, 149-156 (2005).
- [106] Z. D. Ge, D. X. Zhang, Y. F. Chen, F. X. Yi, A. P. Zou, W. B. Campbell and P. L. Li, *Cyclic ADP-ribose contributes to contraction and Ca<sup>2+</sup> release by M1 muscarinic receptor activation in coronary arterial smooth muscle*. J Vasc Res 40, 28-36 (2003).
- [107] F. Barone, A. A. Genazzani, A. Conti, G. C. Churchill, F. Palombi, E. Ziparo, V. Sorrentino, A. Galione and A. Filippini, *A pivotal role for cADPR-mediated*

- Ca<sup>2+</sup> signaling: regulation of endothelin-induced contraction in peritubular smooth muscle cells.* FASEB J 16, 697-705 (2002).
- [108] T. R. Bai, D. Zhou, T. Weir, B. Walker, R. Hegele, S. Hayashi, K. McKay, G. P. Bondy and T. Fong, *Substance P (NK1)- and neurokinin A (NK2)-receptor gene expression in inflammatory airway diseases.* Am J Physiol 269, L309-L317 (1995).
- [109] F. Schmidlin, D. Scherrer, L. Daeffler, C. Bertrand, Y. Landry and J. P. Gies, *Interleukin-1beta induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells.* Mol Pharmacol 53, 1009-1015 (1998).
- [110] Y. Amrani, P. E. Moore, R. Hoffman, S. A. Shore and R. A. Panettieri, Jr., *Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes.* Am J Respir Crit Care Med 164, 2098-2101 (2001).
- [111] Y. Amrani and R. A. Panettieri, Jr., *Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists.* Thorax 53, 713-716 (1998).
- [112] F. M. Ashcroft, D. E. Harrison and S. J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells.* Nature 312, 446-448 (1984).
- [113] S. Takasawa, K. Nata, H. Yonekura and H. Okamoto, *Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells.* Science 259, 370-373 (1993).
- [114] A. Tohgo, H. Munakata, S. Takasawa, K. Nata, T. Akiyama, N. Hayashi and H. Okamoto, *Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase.* J Biol Chem 272, 3879-3882 (1997).
- [115] K. Yagui, F. Shimada, M. Mimura, N. Hashimoto, Y. Suzuki, Y. Tokuyama, K. Nata, A. Tohgo, F. Ikehata, S. Takasawa, H. Okamoto, H. Makino, Y. Saito and

- A. Kanatsuka, *A missense mutation in the CD38 gene, a novel factor for insulin secretion: association with Type II diabetes mellitus in Japanese subjects and evidence of abnormal function when expressed in vitro*. *Diabetologia* 41, 1024-1028 (1998).
- [116] C. Verderio, S. Bruzzone, E. Zocchi, E. Fedele, U. Schenk, A. De Flora and M. Matteoli, *Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes*. *J Neurochem* 78, 646-657 (2001).
- [117] M. Yamada, M. Mizuguchi, N. Otsuka, K. Ikeda and H. Takahashi, *Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain*. *Brain Res* 756, 52-60 (1997).
- [118] L. Sun, J. Iqbal, S. Dolgilevich, T. Yuen, X. B. Wu, B. S. Moonga, O. A. Adebajo, P. J. Bevis, F. Lund, C. L. Huang, H. C. Blair, E. Abe and M. Zaidi, *Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption*. *FASEB J* 17, 369-375 (2003).
- [119] F. J. Drummond, J. J. Mackrill, K. O'sullivan, M. Daly, F. Shanahan and M. G. Molloy, *CD38 is associated with premenopausal and postmenopausal bone mineral density and postmenopausal bone loss*. *J Bone Miner Metab* 24, 28-35 (2006).
- [120] M. Esguerra and R. F. Miller, *CD38 expression and NAD<sup>+</sup>-induced intracellular Ca<sup>+</sup> mobilization in isolated retinal Muller cells*. *Glia* 39, 314-319 (2002).
- [121] K. M. Khoo and C. F. Chang, *Characterization and localization of CD38 in the vertebrate eye*. *Brain Res* 821, 17-25 (1999).
- [122] G. Kohler and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 256, 495-497 (1975).

- [123] M. E. Moreno-Garcia, S. Partida-Sanchez, J. Primack, A. Sumoza-Toledo, H. Muller-Steffner, F. Schuber, N. Oppenheimer, F. E. Lund and L. Santos-Argumedo, *CD38 is expressed as noncovalently associated homodimers on the surface of murine B lymphocytes*. Eur J Biochem 271, 1025-1034 (2004).
- [124] F. Marra, *Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation*. J Hepatol 31, 1120-1130 (1999).
- [125] L. P. Cramer and T. J. Mitchison, *Myosin is involved in postmitotic cell spreading*. J Cell Biol 131, 179-189 (1995).
- [126] R. C. Benyon and J. P. Iredale, *Is liver fibrosis reversible?* Gut 46, 443-446 (2000).
- [127] S. Deaglio, K. Mehta and F. Malavasi, *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors*. Leuk Res 25, 1-12 (2001).
- [128] F. Marra and M. Pinzani, *Role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of portal hypertension*. Nefrologia 22 Suppl 5, 34-40 (2002).
- [129] S. L. Friedman, J. J. Maher and D. M. Bissell, *Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference*. Hepatology 32, 1403-1408 (2000).
- [130] P. Sancho-Bru, R. Bataller, X. Gasull, J. Colmenero, V. Khurdayan, A. Gual, J. M. Nicolas, V. Arroyo and P. Gines, *Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers*. J Hepatol 43, 272-282 (2005).
- [131] R. A. Rippe and D. A. Brenner, *From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells*. Gastroenterology 127, 1260-1262 (2004).
- [132] A. Lang, L. W. Schrum, R. Schoonhoven, S. Tuvia, J. A. Solis-Herruzo, H. Tsukamoto, D. A. Brenner and R. A. Rippe, *Expression of small heat shock*

- protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G1333-G1342 (2000).
- [133] A. C. Heidemann, C. G. Schipke and H. Kettenmann, *Extracellular application of NAADP+ induces Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes in situ. J Biol Chem* (2005).
- [134] M. K. McMillian, L. Thai, J. S. Hong, J. P. O'Callaghan and K. R. Pennypacker, *Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. Trends Neurosci* 17, 138-142 (1994).
- [135] L. F. Eng and R. S. Ghirnikar, *GFAP and astrogliosis. Brain Pathol* 4, 229-237 (1994).
- [136] G. S. Prasad, D. E. McRee, E. A. Stura, D. G. Levitt, H. C. Lee and C. D. Stout, *Crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectozyme CD38. Nat Struct Biol* 3, 957-964 (1996).
- [137] S. Yamamoto-Katayama, M. Ariyoshi, K. Ishihara, T. Hirano, H. Jingami and K. Morikawa, *Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. J Mol Biol* 316, 711-723 (2002).
- [138] F. E. Lund, N. Yu, K. M. Kim, M. Reth and M. C. Howard, *Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. J Immunol* 157, 1455-1467 (1996).
- [139] S. Deaglio, T. Vaisitti, L. Bergui, L. Bonello, A. L. Horenstein, L. Tamagnone, L. Bounsell and F. Malavasi, *CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. Blood* 105, 3042-3050 (2005).
- [140] A. Funaro, M. Morra, L. Calosso, M. G. Zini, C. M. Ausiello and F. Malavasi, *Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. Tissue Antigens* 49, 7-15 (1997).

- [141] R. Lande, F. Urbani, B. Di Carlo, G. Sconocchia, S. Deaglio, A. Funaro, F. Malavasi and C. M. Ausiello, *CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes*. Cell Immunol 220, 30-38 (2002).
- [142] R. Mallone, A. Funaro, M. Zubiaur, G. Baj, C. M. Ausiello, C. Tacchetti, J. Sancho, C. Grossi and F. Malavasi, *Signaling through CD38 induces NK cell activation*. Int Immunol 13, 397-409 (2001).
- [143] S. Zupo, R. Massara, M. Dono, E. Rossi, F. Malavasi, M. E. Cosulich and M. Ferrarini, *Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD*. Blood 95, 1199-1206 (2000).
- [144] S. Deaglio, R. Mallone, G. Baj, A. Arnulfo, N. Surico, U. Dianzani, K. Mehta and F. Malavasi, *CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes*. Chem Immunol 75, 99-120 (2000).
- [145] A. M. Tiggelman, W. Boers, C. Linthorst, H. S. Brand, M. Sala and R. A. Chamuleau, *Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha*. J Hepatol 23, 295-306 (1995).
- [146] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli and R. Taub, *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science 274, 1379-1383 (1996).
- [147] Y. Iimuro, T. Nishiura, C. Hellerbrand, K. E. Behrns, R. Schoonhoven, J. W. Grisham and D. A. Brenner, *NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration*. J Clin Invest 101, 802-811 (1998).
- [148] A. A. Beg, W. C. Sha, R. T. Bronson, S. Ghosh and D. Baltimore, *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. Nature 376, 167-170 (1995).

- [149] T. Bellido, C. A. O'Brien, P. K. Roberson and S. C. Manolagas, *Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells.* J Biol Chem 273, 21137-21144 (1998).
- [150] E. Fattori, R. C. Della, P. Costa, M. Giorgio, B. Dente, L. Pozzi and G. Ciliberto, *Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin-6 transgenic mice.* Blood 83, 2570-2579 (1994).
- [151] S. L. Friedman, *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury.* J Biol Chem 275, 2247-2250 (2000).
- [152] M. Imamura, T. Ogawa, Y. Sasaguri, K. Chayama and H. Ueno, *Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats.* Gastroenterology 128, 138-146 (2005).
- [153] C. Hellerbrand, C. Jobin, Y. Iimuro, L. Licato, R. B. Sartor and D. A. Brenner, *Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor.* Hepatology 27, 1285-1295 (1998).
- [154] H. Kaku, K. Horikawa, Y. Obata, I. Kato, H. Okamoto, N. Sakaguchi, S. Gerondakis and K. Takatsu, *NF-kappaB is required for CD38-mediated induction of C(gamma)1 germline transcripts in murine B lymphocytes.* Int Immunol 14, 1055-1064 (2002).
- [155] M. Sakamoto, T. Ueno, M. Kin, H. Ohira, T. Torimura, S. Inuzuka, M. Sata and K. Tanikawa, *Ito cell contraction in response to endothelin-1 and substance P.* Hepatology 18, 978-983 (1993).
- [156] K. NAKATA, G. F. LEONG and R. W. BRAUER, *Direct measurement of blood pressures in minute vessels of the liver.* Am J Physiol 199, 1181-1188 (1960).
- [157] S. Okumura, Y. Takei, S. Kawano, K. Nagano, E. Masuda, M. Goto, S. Tsuji, T. Michida, S. S. Chen, T. Kashiwagi and ., *Vasoactive effect of endothelin-1 on rat liver in vivo.* Hepatology 19, 155-161 (1994).

- [158] R. M. Reinehr, R. Kubitz, T. Peters-Regehr, J. G. Bode and D. Haussinger, *Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin 1*. *Hepatology* 28, 1566-1577 (1998).
- [159] D. C. Rockey and R. A. Weisiger, *Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance*. *Hepatology* 24, 233-240 (1996).
- [160] D. C. Rockey, C. N. Housset and S. L. Friedman, *Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo*. *J Clin Invest* 92, 1795-1804 (1993).
- [161] A. P. Somlyo, *Myosin isoforms in smooth muscle: how may they affect function and structure?* *J Muscle Res Cell Motil* 14, 557-563 (1993).
- [162] K. M. Trybus, *Regulation of smooth muscle myosin*. *Cell Motil Cytoskeleton* 18, 81-85 (1991).
- [163] R. S. Moussavi, C. A. Kelley and R. S. Adelstein, *Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains*. *Mol Cell Biochem* 127-128, 219-227 (1993).
- [164] J. N. Lindquist, W. F. Marzluff and B. Stefanovic, *Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G471-G476 (2000).
- [165] D. A. Brenner, T. Waterboer, S. K. Choi, J. N. Lindquist, B. Stefanovic, E. Burchardt, M. Yamauchi, A. Gillan and R. A. Rippe, *New aspects of hepatic fibrosis*. *J Hepatol* 32, 32-38 (2000).
- [166] B. Schaefer, A. M. Rivas-Estilla, N. Meraz-Cruz, M. A. Reyes-Romero, Z. H. Hernandez-Nazara, J. A. Dominguez-Rosales, D. Schuppan, P. Greenwel and M. Rojkind, *Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells*. *Am J Pathol* 162, 1771-1780 (2003).



- [167] B. Schnabl, C. A. Purbeck, Y. H. Choi, C. H. Hagedorn and D. Brenner, *Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype*. *Hepatology* 37, 653-664 (2003).
- [168] A. Couvelard, J. Y. Scoazec and G. Feldmann, *Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver*. *Am J Pathol* 143, 738-752 (1993).
- [169] S. Partida-Sanchez, T. D. Randall and F. E. Lund, *Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity*. *Microbes Infect* 5, 49-58 (2003).



## 8. ARTÍCULOS ORIGINADOS DURANTE LA TESIS



## 8. ARTÍCULOS ORIGINADOS DURANTE LA TESIS

Artículos originales.

1. **Sandra March**, Nuria Gavara, Mariona Graupera, Miguel Morales, Xavier Gasull, Daniel Navajas, Jaume Bosch, Pablo Engel. “CD38 signaling modulates intracellular calcium levels and contraction of Hepatic Stellate Cells” Manuscript in preparation.
2. **March S**, Graupera M, Sarrias MR, Lozano F, Pizcueta P, Bosch J, Engel P. “Identification and Functional Characterization of the Hepatic Stellate Cell CD38/ ADP-ribosyl cyclase Cell Surface Molecule”. American Journal of Pathology (in revision).
3. **March S**, Garcia-Pagan JC, , Massaguer A, Panes J, Pizcueta P, Engel P, Bosch J. “P-Selectin mediates leukocyte rolling in concanavalin-A induced hepatitis.” *Liver international*. 2005; 25: 1053-1060. Portada de la revista.
4. Graupera M, **March S**, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. “Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers.” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Apr;288(4):G763-70.
5. Vidal-Laliena M, Romero X, **March S**, Requena V, Petriz J, Engel P.” Characterization of antibodies submitted to the B cell Section of the 8<sup>th</sup> Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop by flow cytometry and immunohistochemistry”. *Cell Immunol* 2005 July - August;236(1-2):6-16.
6. Romero X, Benitez D, **March S**, Vilella R, Miralpeix M, Engel. “Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4).” *Tissue Antigens*. 2004 Aug;64(2):132-44

7. Massaguer A, Engel P, Tovar V, **March S**, Rigol M, Solanes N, Bosch J, Pizcueta "P. Characterization of platelet and soluble-porcine P-selectin (CD62P)." *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Dec 15;96(3-4):169-81.