

## LOCALITZACIÓ DE RECEPTORS DE NEUROTRANSMISSORS

ROSER CORTÉS I GUADALUPE MENGOD

*Departament de Neuroquímica. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona. CSIC.*

Adreça per a la correspondència: Departament de Neuroquímica. IIBB, CSIC. Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona. Adreça electrònica: rccnqr@cid.csic.es.

### INTRODUCCIÓ

Durant les darreres dècades, el desenvolupament i l'aplicació exhaustiva de tècniques de fixació (*binding*) de radiolligands en preparacions de membranes o homogeneïtzats de cervell i altres teixits, en combinació amb altres tècniques farmacològiques clàssiques, ha portat a un alt grau de coneixement dels receptors dels diversos neurotransmissors. Així ha estat possible estudiar els receptors com a entitats moleculars, caracteritzar-los i determinar-ne les propietats bioquímiques i farmacològiques. Un factor d'especial importància en l'estudi del perfil farmacològic dels receptors de neurotransmissors ha estat, i ho continua sent, el desenvolupament constant de nous fàrmacs, que ha proporcionat substàncies més selectives i d'alta afinitat per a receptors específics. A més, algunes d'aquestes drogues han estat comercialitzades com a radiolligands i han resultat eines molt útils en el marcatge de receptors per tècniques de fixació.

Cal destacar també el paper decisiu que ha comportat l'aplicació de les tècniques de biologia molecular al camp de les neurociències. Això ha permès d'identificar i clonar un gran nombre de receptors de neurotransmissors, així com altres proteïnes i pèptids implicats en la neurotransmissió, incloent-hi neuropèptids, enzims que participen en el metabolisme de neurotransmissors, canals iònics, transportadors de neurotransmissors i proteïnes involucrades en mecanismes de transducció del senyal nerviós. En seqüenciar els clons de cDNA (DNA complementari) obtinguts s'ha pogut conèixer la seqüència dels mRNA (RNA missatgers) que codifiquen aquestes proteïnes i així deduir la seva seqüència d'aminoàcids. Coneixent la seqüència d'aminoàcids, ha estat possible de proposar models de l'estructura terciària i quaternària d'aquestes proteïnes, i investigar la relació entre estructura i funció, per de-

terminar, per exemple, quins aminoàcids estan implicats en la fixació dels neurotransmissors als seus receptors específics. Tot això ha suposat un notable avenç en la nostra comprensió d'aquestes proteïnes. En el cas particular dels receptors de neurotransmissors, els estudis moleculars mostren que hi ha dues grans superfamílies de receptors: els que constitueixen un canal iònic (Barnard *et al.*, 1987) i els que estan lligats a proteïnes G (Strader *et al.*, 1994). Els primers estan formats per un nombre variable de subunitats que travessant la membrana plasmàtica formen el canal, el qual s'obre en fixar-s'hi el neurotransmissor corresponent o un lligand apropiat. Els receptors lligats a proteïnes G són, en canvi, estructures monomèriques que mantenen entre elles característiques comunes com ara la de posseir set regions transmembranals. El clonatge molecular de receptors ha confirmat estudis farmacològics previs que demostraven l'existència de diferents subtipus de receptors per a un mateix neurotransmissor, però fins i tot ha portat a clonar nous receptors que no havien estat descrits anteriorment. D'altra banda, el fet de conèixer la seqüència dels mRNA que codifiquen els receptors de neurotransmissors així com d'altres proteïnes i pèptids involucrats en la neurotransmissió, obre la possibilitat d'estudiar la localització dels seus mRNA corresponents mitjançant sondes d'àcids nu-cleics complementàries a aquests mRNA.

Un aspecte important de l'estudi dels receptors de neurotransmissors inclou l'anàlisi de la seva distribució als diferents teixits. L'interès a conèixer la localització d'un determinat receptor en un organisme pot proporcionar molta informació sobre el seu paper fisiològic. Així, la presència d'un receptor en diferents òrgans o teixits informa sobre les funcions fisiològiques en què està implicat. Val a dir també que un dels criteris

per considerar un lloc d'unió com a receptor és la distribució diferencial en els diversos teixits. En un òrgan com el cervell, amb una anatomia complexa, és especialment important poder determinar amb la màxima precisió possible en quins nuclis o àrees anatòmiques, i fins i tot en quines cèl·lules i en quins compartiments cel·lulars, estan localitzats els receptors i on se sintetitzen.

Una de les tècniques emprades clàssicament en l'estudi de la localització de receptors és la fixació de radiolligands en preparacions de membranes. Aquest mètode proporciona una idea bastant global de la presència i la densitat de receptors en un teixit però no subministra gaire informació pel que fa a la localització precisa del receptor en estudi. D'altra banda, quan un receptor ha estat clonat i es coneix la seqüència de l'mRNA que el codifica, és possible analitzar on es localitza aquest mRNA. Per determinar *grosso modo* la presència o absència de l'mRNA d'un determinat receptor en un extracte de RNA (o mRNA) de teixit, es pot utilitzar el mètode de *Northern blot*, però la resolució anatòmica d'aquesta tècnica, com en el cas de la fixació de radiolligands en membranes, és molt limitada i depèn fonamentalment de l'habilitat de l'experimentador en la dissecció del cervell.

Actualment, per examinar en detall la distribució anatòmica precisa dels receptors i dels seus mRNA, les tècniques que s'utilitzen de manera més generalitzada són, respectivament, l'autoradiografia de receptors *in vitro* amb films i la hibridació *in situ*. Ambdues tècniques tenen una alta resolució anatòmica, i amb elles es pot aconseguir identificar a nivell microscòpic i fins i tot cel·lular (especialment en el cas de la hibridació *in situ*) la presència d'un determinat receptor o del seu mRNA. El present capítol fa èmfasi en aquestes dues tècniques, ja que són les d'ús més habitual. Hi ha també altres mètodes d'ús més res-

tringit, com ara l'autoradiografia de receptors *in vivo*, la localització immunohistoquímica de receptors utilitzant anticossos específics, i les tècniques de microscòpia electrònica que permeten determinar la localització ultraestructural dels receptors (Wharton i Polak, 1993).

## LOCALITZACIÓ DE RECEPTORS PER MÈTODES AUTORADIOGRÀFICS

L'autoradiografia de receptors *in vitro* és un mètode derivat de les tècniques de fixació de radiol·ligands en el qual s'empren seccions histològiques enloc de preparacions de membranes, i la detecció del lligand es fa mitjançant emulsions fotogràfiques adequades. A l'igual de la fixació en membranes, l'autoradiografia de receptors es basa, doncs, en la interacció d'un lligand marcat amb el seu lloc d'unió o receptor. Per tant, és una tècnica de tipus farmacològic i com a tal ha de complir una sèrie de criteris pel que fa a la saturabilitat de la fixació, la selectivitat i l'afinitat del lligand pel receptor, etc. (Yamamura *et al.*, 1990).

Convé que els radiol·ligands siguin al més selectius possible i que marquin preferentment un sol tipus o subtipus de receptor, que tinguin alta afinitat pel receptor (nanomolar o picomolar) i que donin un baix grau de soroll de fons o fixació no específica. La immensa majoria de lligands que s'utilitzen en autoradiografia s'uneixen als corresponents receptors de manera reversible. Hi ha però alguns lligands irreversibles, i també mètodes que utilitzen vapors de fixadors amb els quals es pot arribar a aconseguir una unió permanent del lligand al teixit. Els isòtops més emprats són el  $[^3\text{H}]$  i el  $[^{125}\text{I}]$ . El triti emet una radiació beta molt feble i per això té l'avantatge de proporcionar una millor resolució anatòmica. Per la mateixa raó també presenta una sèrie d'in-

convenients, com ara que requereix temps d'exposició que poden ser molt prolongats, o que la radiació pot ser en part absorbida pel teixit.

## Metodologia

### *Preparació del teixit*

És essencial que el teixit mantingui la morfologia i les característiques de fixació de lligands al més intactes possible. Per això normalment s'utilitzen teixits frescos congelats. En el cas d'animals d'experimentació es pot practicar una perfusió intracardíaca amb fixador a baixa concentració (paraformaldehid al 0,04-0,1 %) per preservar millor la morfologia dels teixits. Convé que les mostres es processin ben ràpidament després de la mort o biòpsia per evitar la degradació del teixit i dels receptors. Un cop dissecats, els teixits d'interès es congelen, ja sigui sencers o bé tallats en blocs de mides adequades. La congelació es pot fer seguint diferents mètodes, per exemple, sobre neu carbònica, per immersió en nitrogen líquid o isopentà (refredat amb neu carbònica), etc. El procés ha de ser controlat i cal evitar que les peces de teixit es fracturin, s'esquerdin, o bé s'hi formin cristalls de gel.

Els teixits congelats se seccionen posteriorment en un micròtom-criòstat a una temperatura d'uns  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Normalment es fan servir talls histològics d'un gruix de 10 a  $20\text{ }\mu\text{m}$ , que es munten sobre portaobjectes de vidre descongelant-los breument. Aquests portaobjectes s'han de tractar prèviament amb algun producte que adhereixi el teixit (gelatina, poli-L-lisina, o 3-aminopropiltriètoxilà) per evitar que les seccions se'n despreguin en ser immersides després en líquids. Les seccions de teixit muntades sobre portaobjectes es guarden congelades fins al moment de ser incubades.

### *Protocol d'incubació*

El protocol d'un experiment estàndard per a la localització de receptors per autoradiografia en seccions de teixit inclou cinc passos bàsics: 1) preincubació de les seccions en solució tampó; 2) incubació en tampó en presència del radiolligand; 3) rentatge en tampó fred; 4) esbandida en aigua destil·lada freda, i 5) assecatge ràpid amb aire fred. Després d'aquest procés les seccions de teixit ja estan a punt de ser exposades a emulsions per generar autoradiogrames.

El procés de preincubació serveix per eliminar el lligand endogen que pugui haver al teixit, així com fàrmacs que s'hagin administrat prèviament. En l'etapa d'incubació el radiolligand s'uneix als receptors presents a les seccions de teixit. Les condicions experimentals han de ser les adequades per permetre que el lligand s'uneixi al receptor i formi el complex lligand-receptor. El temps d'incubació ha de ser suficient per permetre que aquesta reacció arribi a l'equilibri, i no convé que sigui massa llarg, ja que això podria facilitar la degradació del lligand i del teixit. Després de la incubació, les seccions s'han de rentar submergint-les en banys successius de solució tampó freda (a 4°C) per eliminar l'excés de lligand no unit a receptor present al medi i al teixit i per reduir la fixació no específica. Finalment convé fer una esbandida en aigua destil·lada freda per eliminar les sals dels teixits i facilitar-ne l'assecatge posterior. L'assecatge s'ha de fer amb aire fred i sec i cal que sigui al més ràpid possible per evitar que el lligand es dissociï del receptor al qual s'ha unit i es difongui.

### *Fixació no específica*

Tot radiolligand s'uneix, a part dels seus receptors específics, a llocs no específics del teixit. Aquesta fixació no específica s'ha de

poder quantificar i restar-la de la fixació total del radiolligand per calcular quina és en realitat la fixació específica. Per tant, en tot experiment d'autoradiografia de receptors s'han d'incloure seccions que s'incubaran com les altres però en un medi d'incubació que contingui, a més del radiolligand, un desplaçador específic del receptor en estudi. Aquest desplaçador s'utilitzarà a concentracions suficientment altes per ocupar tots els receptors presents al teixit, de manera que tot el que marqui encara el radiolligand en aquestes condicions correspondrà a fixació no específica.

### *Determinació del protocol d'incubació*

Quan s'utilitza un radiolligand nou per fer autoradiografia de receptors cal establir primer quines són les condicions d'incubació més adients. Així, en experiments preliminars s'ha de determinar la concentració de radiolligand a utilitzar i la temperatura i els temps òptims d'incubació i rentatge. D'altra banda, s'ha de demostrar que la farmacologia dels llocs d'unió que es marquen amb el radiolligand en seccions de teixit correspon a la dels receptors en estudi. Com a punt de partida, es tindran en compte les dades obtingudes amb el radiolligand en experiments de fixació en membranes.

Normalment els experiments preliminars per a un nou radiolligand inclouen:

*Determinació del temps de rentatge.* Interessa trobar un protocol de rentatge que proporcioni una bona relació de fixació total sobre fixació no específica, tot i mantenint la fixació total al més alta possible. Amb aquesta finalitat seccions seriades s'incuben amb el radiolligand en les mateixes condicions, variant però els temps de rentatge (per exemple, 5, 10, 15, 20, 30 minuts).

*Determinació de les condicions d'incubació.* Cal triar la temperatura i el temps d'incubació més adients. Normalment les incubaci-

ons es fan a temperatura ambient, tot i que en alguns casos, quan la dissociació del lligand és molt ràpida, cal incubar a 4 °C. En canvi, quan la velocitat d'associació del lligand és molt lenta es pot recórrer a la incubació a 37 °C, malgrat que això és poc recomanable ja que perjudica la integritat del teixit i afavoreix la degradació del lligand. Com ja s'ha esmentat anteriorment, el temps d'incubació ha de ser suficientment llarg per permetre que s'arribi a l'equilibri en la reacció entre el lligand lliure i l'unit al receptor. Per determinar el temps que triga a assolir-se aquest equilibri cal incubar seccions seriades durant diferents períodes de temps (per exemple, entre 30 minuts i 3 hores) per obtenir la corba d'associació del lligand. Aquesta corba mostrarà com la fixació s'incrementa en allargar el temps d'incubació fins a arribar a un màxim a partir del qual incubacions més prolongades no es traduiran en augments dels nivells de marcatge, és a dir, que s'haurà assolit l'equilibri buscat.

*Determinació de la concentració de radiol·ligand: experiments de saturació.* En general és recomanable treballar amb una concentració de lligand que ocupi la meitat dels receptors presents, és a dir, una concentració al voltant de la seva constant de dissociació ( $K_D$ ). La  $K_D$  es pot trobar en experiments de saturació, en els quals seccions seriades s'incuben amb concentracions creixents de lligand sol (fixació total) o en presència d'un blocador (fixació no específica). La diferència entre fixació total i fixació no específica correspon a la fixació específica que es mostra com una corba que permet calcular el nombre màxim de receptors presents ( $B_{\max}$ ) i la  $K_D$  del lligand. L'anàlisi de la corba de saturació també pot permetre d'esbrinar si la població de receptors marcats és homogènia o bé si hi ha fixació sobre més d'una classe de receptors.

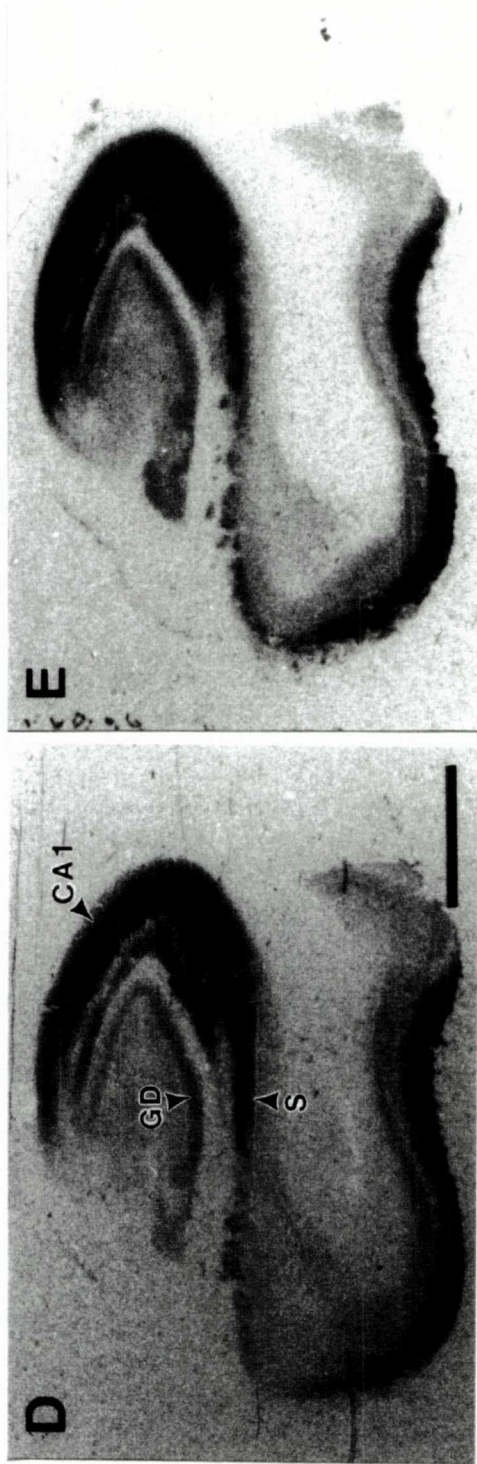
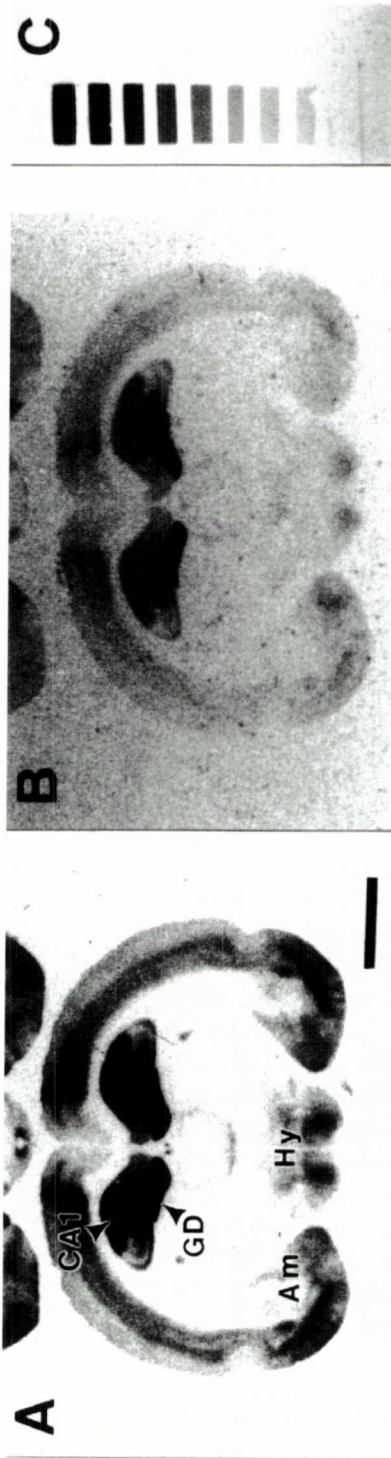
*Determinació del perfil farmacològic.* Per tal de demostrar que el radiol·ligand marca efec-

tivament el receptor esperat és convenient fer estudis de desplaçament amb fàrmacs coneguts com a específics per a aquest receptor. A tal efecte s'incuben seccions amb el radiol·ligand en presència de concentracions creixents d'aquests fàrmacs per obtenir corbes de desplaçament. Aquestes permeten calcular les constants d'inhibició ( $K_i$ ) dels fàrmacs.

#### *Exposició i obtenció d'autoradiogrames*

Un cop incubats i secs, els portaobjectes amb les seccions de teixit es posen en contacte amb emulsions fotogràfiques sensibles a l'isòtop utilitzat per generar els autoradiogrames. Es poden emprar diferents mètodes, però el més habitual és l'ús de films comercials que simplement es col·loquen sobre les seccions. La seva manipulació és molt fàcil i és el mètode més recomanat quan *a posteriori* es pretén quantificar les densitats de receptors marcats. Els altres procediments impliquen l'ús d'emulsions fotogràfiques de sals de plata que primerament s'han de fondre a 40 °C i llavors sucari-hi o bé un cobreobjectes que un cop sec s'enganxa damunt de les seccions (mètode dels *coverslips*), o bé directament els portaobjectes amb les seccions incubades (mètode de *dipping*). Aquests dos darrers mètodes proporcionen una millor resolució anatòmica, però són molt més laboriosos; a més, la tècnica de *dipping* només és practicable quan es treballa amb lligands irreversibles, ja que en sucari les seccions en l'emulsió calenta els lligands reversibles (que són la gran majoria) es dissocien dels seus llocs d'unió.

En tots els casos l'exposició es fa a les fosques. El temps d'exposició pot ser molt variable, des de pocs dies fins a setmanes o mesos, i depèn fonamentalment de tres factors: la densitat dels receptors en estudi, l'activitat específica del radiol·ligand i la concentració de radiol·ligand utilitzada en la



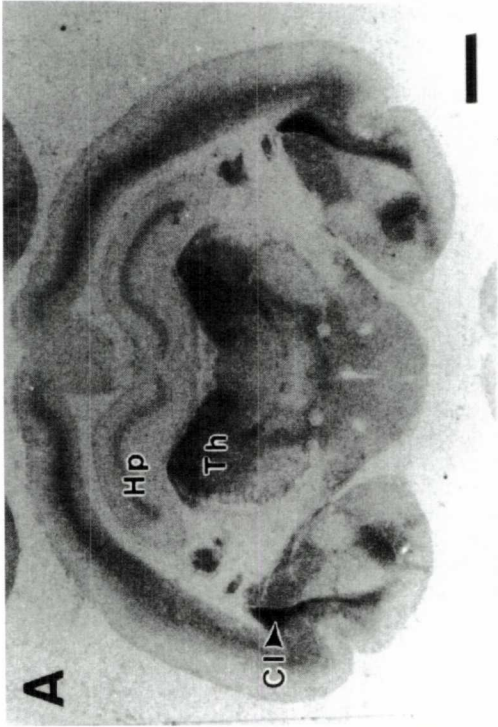
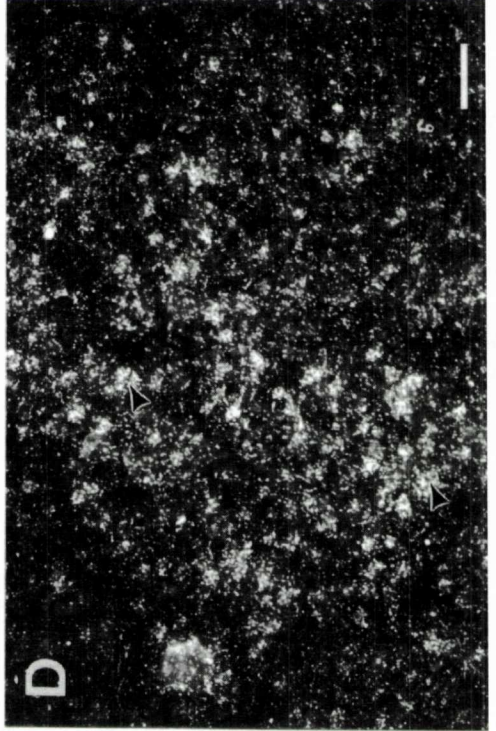
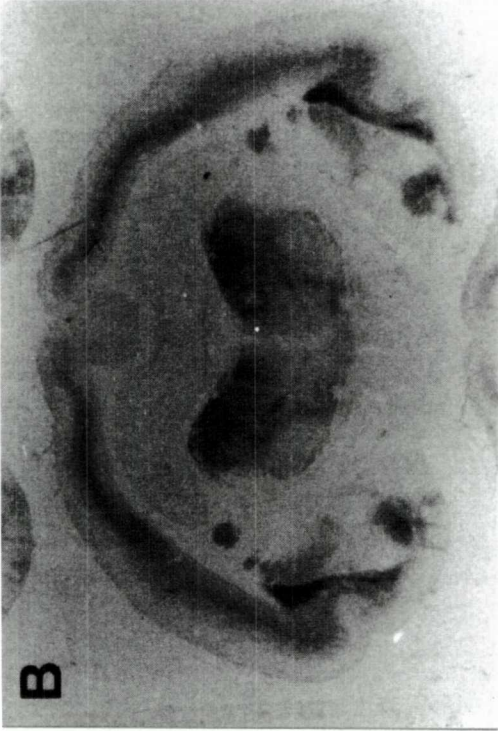
incubació. Passat el temps d'exposició necessari els autoradiogrames es revelen per procediments fotogràfics. En el cas dels autoradiogrames tipus film, els grans de plata originats a l'emulsió per l'emissió de radiació per l'isòtop proporcionen unes imatges en gamma de grisos (Figures 1, 2A-C i 3). La intensitat de gris, és a dir, la densitat òptica, és proporcional a la quantitat de radioactivitat que s'havia fixat al teixit. Els autoradiogrames generats amb emulsió fotogràfica líquida s'han d'observar al microscopi en camp fosc per veure els grans de plata, que apareixen com acumulacions de punts brillants sobre el teixit (Figura 2D). Sovint convé tenyir les seccions amb colorants histològics per facilitar la identificació d'estructures en el teixit.

### Quantificació dels autoradiogrames

Un dels avantatges de la tècnica d'auto-radiografia de receptors és precisament que permet la quantificació dels resultats. Els autoradiogrames es poden quantificar ja sigui per densitometria (mesurant densitats òptiques sobre films) o bé per microscòpia (comptant densitats de grans de plata) (Palacios *et al.*, 1981). Però cal disposar d'escales de patrons radiomètrics (Figura 1C) que s'hagin exposat al film o a l'emulsió conjuntament amb les seccions incubades. A partir d'aquests patrons es pot obtenir una corba de calibratge que relacioni valors de densitat òptica (o bé densitat de grans de plata) amb concentració de radioactivitat. Amb la corba de calibratge es podran mesu-

FIGURA 1 (pàg. 88). Aplicació de l'autoradiografia de receptors quantitativa a la localització de llocs de fixació d'alta i baixa afinitat en diferents espècies animals. Les fotografies mostren autoradiogrames obtinguts per la incubació de seccions coronals de cervell de rata (A i B) i de seccions de l'hipocamp humà (D i E). Les imatges il·lustren la presència de receptors 5-HT<sub>1A</sub> de la serotonina en diferents àrees i nuclis cerebrals, com ara el cos dentat (GD) i la regió CA1 de l'hipocamp i l'escorça cerebral en ambdues espècies, així com en algun nucli de l'amígdala (Am) i de l'hipotàlem (Hy) a la rata i al subicle (S) humà. Les seccions A i D varen ser incubades amb [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT, un lligand agonista 5-HT<sub>1A</sub>, que com a tal només reconeix receptors en estat d'alta afinitat; en canvi les seccions B i E es varen obtenir pel marcatge amb [<sup>3</sup>H]WAY 100635, un lligand antagonista que marca tots els receptors 5-HT<sub>1A</sub>, independentment del seu estat d'acoblament a proteïnes G. La quantificació dels autoradiogrames demostra que les densitats de receptors visualitzats amb [<sup>3</sup>H]WAY 100635 són més elevades que les marcades amb [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT. La imatge C mostra l'autoradiograma generat per un joc de patrons de [<sup>3</sup>H] comercial (Autoradiographic [<sup>3</sup>H]Micro-scales, Amersham). Aquests patrons estan fets d'un polímer de plàstic constituït per bandes que contenen quantitats conegudes de [<sup>3</sup>H] a diferents concentracions. L'exposició conjunta d'aquests patrons amb les seccions de teixit incubades amb un radiolligand tritiat permet la quantificació posterior dels films. Barres: A i B= 3 mm; D i E= 5 mm.

FIGURA 2 (pàg. 90). Estudis combinats d'autoradiografia de receptors i d'hibridació *in situ* per a la localització del receptor 5-HT<sub>1F</sub> de la serotonina i del seu mRNA. Els autoradiogrames es varen obtenir a partir de seccions coronals consecutives de cervell de cobai. La imatge A mostra la fixació total del lligand [<sup>3</sup>H]sumatriptà (4 nM) que marca els receptors 5-HT<sub>1D</sub> i els 5-HT<sub>1F</sub> de la serotonina. La secció B va ser incubada amb el mateix lligand però en presència de 5-CT (10<sup>-8</sup> M) que s'uneix als receptors 5-HT<sub>1D</sub> inhibint la fixació de [<sup>3</sup>H]sumatriptà; en aquestes condicions només es visualitza el marcatge dels receptors 5-HT<sub>1F</sub>. Comparant les figures A i B es pot observar que el marcatge a l'hipotàlem i en alguna làmina de l'hipocamp (Hp) ha estat bloquejat per la 5-CT i correspon per tant a receptors 5-HT<sub>1D</sub>, mentre que la fixació al claustrum (Cl), escorça i tàlem (Th), entre d'altres, roman en presència de 5-CT, fet que indica que es tracta de marcatge 5-HT<sub>1F</sub>. Les imatges C i D varen ser obtingudes per hibridació *in situ* amb una sonda contra l'mRNA del receptor 5-HT<sub>1F</sub>. La imatge C il·lustra un autoradiograma tipus film on es pot observar que la distribució anatòmica de l'mRNA del receptor 5-HT<sub>1F</sub> és molt semblant a la del receptor marcat amb [<sup>3</sup>H]sumatriptà en presència de 5-CT. Aquest paral·lisme suggereix que els receptors 5-HT<sub>1F</sub> s'expressen majoritàriament a nivell de cossos cel·lulars i/o dendrites de les neurones que els sintetitzen. La figura D és una microfotografia obtinguda al microscopi en camp fosc d'un detall de l'escorça cerebral de la mateixa secció que es mostra a C un cop sotmesa a *dipping* en emulsió fotogràfica, i s'hi observen acumulacions de grans de plata (fletxes) sobre cossos cel·lulars que corresponen al senyal d'hibridació específic de l'mRNA del receptor 5-HT<sub>1F</sub>. Barres: A, B i C= 2 mm; D= 100 µm.





rar les densitats de radioactivitat (i per tant de receptors) presents a les diferents estructures tissulars. Actualment hi ha al mercat diversos analitzadors d'imatges computeritzats que faciliten enormement la lectura dels autoradiogrames.

### Aplicacions

L'aplicació més utilitzada de l'autoradiografia *in vitro* és sens dubte la realització d'estudis de localització detallada de receptors, especialment al cervell. Per fer aquests estudis de «cartografia» normalment s'incuben seccions de diferents nivells de cervell o de qualsevol altre òrgan amb una concentració fixa de radiolligand (Figures 1 i 2). Això permet obtenir un mapa quantitatiu de la distribució anatòmica del receptor d'interès. La informació sobre la seva localització anatòmica permet suggerir possibles rols funcionals d'un determinat receptor. Atès que l'autoradiografia de receptors és una tècnica aplicable a molts tipus de teixits -només cal que hagin estat congelats i preservats adequadament- aquests estudis de localització es poden fer tant en animals d'experimentació com en teixits humans, ja siguin procedents de biòpsies com de necròpsies (Palacios *et al.*, 1986; Probst *et al.*, 1991). Per exemple, a la figura 1 s'il·lustren autoradiogrames obtinguts amb cervell de rata i amb cervell humà *post mortem* on s'han marcat els receptors 5-HT<sub>1A</sub> de la serotonina amb dos lligands diferents. Igualment és possible analitzar canvis en densitats de re-

ceptors en situacions parafisiològiques (desenvolupament, envelliment), després de tractaments farmacològics o en situacions patològiques diverses.

Tal com s'ha comentat, mitjançant les tècniques autoradiogràfiques quantitatives també és possible realitzar experiments de tipus farmacològic com ara saturacions, desplaçaments amb lligands no marcats, cinètiques, etc. D'aquestes anàlisis es poden extreure dades com ara la densitat màxima de receptors ( $B_{max}$ ), la constant de dissociació del radiolligand ( $K_D$ ) i les constants d'inhibició de diferents desplaçadors ( $K_i$ ) per a cada àrea a nivell microscòpic. És possible també examinar quina és la distribució dels diferents estats d'afinitat d'un mateix receptor: És ben conegut que els receptors lligats a proteïnes G presenten un grau d'afinitat pels lligands agonistes que varia dependent de si el receptor està acoblat (estat d'alta afinitat) o no (estat de baixa afinitat) a proteïnes G, mentre que l'afinitat pels antagonistes resta invariable. En conseqüència, utilitzant radiolligands agonistes es visualitzen només receptors en estat d'alta afinitat, i amb radiolligands antagonistes es marca la població total de receptors. Un exemple d'aquest tipus d'anàlisi es presenta a la figura 1 per als receptors 5-HT<sub>1A</sub> de la serotonina marcats amb un agonista ( $[^3H]$ 8-OH-DPAT) i amb un antagonista ( $[^3H]$ WAY 100635). La quantificació dels autoradiogrames indica que les proporcions de receptors 5-HT<sub>1A</sub> acoblats a proteïnes G varia d'una regió anatòmica a una altra.

FIGURA 3 (pàg. 92). Estudis d'autoradiografia de receptors en animals lesionats. Els autoradiogrames mostren la presència de receptors 5-HT<sub>4</sub> marcats amb  $[^{125}I]$ SB 207710 (A i B) i de receptors 5-HT<sub>1D</sub> marcats amb  $[^{125}I]$ GTI (C i D) en seccions coronals de cervell de cobai. Els animals havien estat lesionats unilateralment amb una microinjecció local d'àcid quinolínic al nucli caudat-putamen (CPu). Quan es compara amb la banda contralateral, a la zona de l'estriat lesionada (asterisc) s'observa que la destrucció de neurones produeix una desaparició del marcatge d'ambdós subtipus de receptors (A i C). Al mateix temps a la substància negra (SN) del costat ipsilateral de la lesió també hi té lloc una disminució de la densitat de receptors 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> (fletxa) (B i D). Aquestes observacions suggereixen que, en condicions normals, els receptors 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> estan localitzats tant en cossos cel·lulars i/o dendrites de neurones estriatals com en terminacions d'aquestes neurones que envien projeccions a la substància negra. Barra: 3 mm.



Molts dels radiolligands comercials no són selectius per a un sol tipus o subtipus de receptor, sinó que reconeixen poblacions heterogènies de llocs d'unió. Malgrat això en molts casos és possible eliminar selectivament el marcatge dels diferents subtipus de receptors per arribar a visualitzar únicament el subtipus d'interès. Això s'aconsegueix incubant les seccions amb el radiolligand en presència de fàrmacs adequats que inhibeixin la fixació als subtipus que convingui bloquejar. La concentració dels fàrmacs blocadors s'ha de determinar abans en experiments de desplaçament. D'aquesta manera es pot aconseguir visualitzar receptors per als quals no hi ha radiolligands selectius. Un exemple d'això es presenta a la figura 2, on s'ha utilitzat el lligand [ $^3\text{H}$ ]sumatriptà que marca els receptors 5-HT<sub>1B/D</sub> i 5-HT<sub>1F</sub> de la serotonina. Amb la incubació d'aquest lligand en presència de 5-CT es pot evitar selectivament la fixació sobre receptors 5-HT<sub>1B/D'</sub> de manera que es visualitzin tan sols els receptors 5-HT<sub>1F</sub>.

Si bé l'autoradiografia *in vitro* permet per si sola identificar en quines cèl·lules estan localitzats els receptors que es visualitzen, és possible combinar-la amb altres tècniques com ara la hibridació *in situ* o la pràctica de lesions de vies nervioses o grups cel·lulars específics per arribar a determinar quines cèl·lules els expressen. A la figura C s'il·lustra un exemple d'estudis d'autoradiografia en cobais lesionats amb àcid quinolínic al cos estriat. Aquesta lesió destrueix neurones que tenen el cos cel·lular a l'estriat. Mitjançant el marcatge dels receptors 5-HT<sub>4</sub> (amb [ $^{125}\text{I}$ ]SB 207710) i 5-HT<sub>1D</sub> (amb [ $^{125}\text{I}$ ]GTI) es produeix la desaparició de la fixació en ambdòs subtipus de receptors a l'estriat, cosa que indica que aquests receptors en condicions normals s'expressen a nivell de cos cel·lular i/o dendrites de les cèl·lules lesionades. Aquest tipus de lesió comporta també una disminució de la fixació de [ $^{125}\text{I}$ ]SB

207710 i de [ $^{125}\text{I}$ ]GTI a la substància negra. Això suggereix que en aquesta regió una part de la població dels receptors 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>1D</sub> està localitzada en terminacions nervioses procedents del cos estriat.

### Limitacions

Un problema que sorgeix quan s'utilitzen lligands tritiats és l'anomenat *quenching* causat per l'absorció diferencial de les radiacions beta del [ $^3\text{H}$ ] per la matèria blanca i la matèria gris del cervell (Kuhar i Unnerstall, 1985; Geary i Wooten, 1985; Geary *et al.*, 1985). Això és degut al fet que els lípids, que són més abundants en estructures mielinitzades de la matèria blanca, absorbeixen més radiació beta. En conseqüència, una mateixa quantitat de radioactivitat donarà menys senyal si prové de matèria blanca. Cal tenir en compte a més que els diferents nuclis i àrees cerebrals contenen proporcions variables de matèria blanca i gris i per tant presentaran nivells de *quenching* diferents i difícils d'avaluar. Una possibilitat que es pot plantejar per superar parcialment aquest problema és fabricar diferents escales de patrons, amb matèria gris i matèria blanca separadament. Una altra alternativa és extreure els lípids del teixit amb dissolvents (alcohols i cloroform) per reduir l'absorció diferencial (Herkenham i Sokoloff, 1984), tot i que aquests procediments poden produir alteracions no desitjades (Kuhar i Unnerstall, 1985). Finalment també és possible recórrer a taules de factors de correcció de *quenching* per a diferents nuclis cerebrals (Geary i Wooten, 1985).

Una limitació que té l'autoradiografia de receptors és la resolució anatòmica que es pot aconseguir. El grau de resolució depèn de diversos factors, com ara l'energia d'emissió de l'isòtop, la distància entre la font emissora de radiació i l'emulsió, el gruix i la sensibilitat de l'emulsió, el grau

de preservació del teixit, entre d'altres (Leslie i Altar, 1988). Tot i treballar en condicions experimentals òptimes, la resolució que es pot aconseguir amb l'autoradiografia de receptors és limitada, especialment quan s'utilitzen films. La resolució anatómica és molt superior quan s'empra el mètode dels *coverslips*, tot i així no es pot arribar a determinar en quines cèl·lules es troben els receptors visualitzats. Per arribar a esbrinar quins tipus cel·lulars concrets expressen un receptor determinat cal recórrer a procediments autoradiogràfics de microscòpia electrònica (Beaudet, 1993), encara que aquestes tècniques també presenten certes limitacions. D'altra banda, tal com ja s'ha comentat anteriorment, la combinació de les tècniques d'autoradiografia de receptors amb la pràctica de lesions i/o amb mètodes d'hibridació *in situ* pot arribar a proporcionar molta informació sobre quines poblacions cel·lulars expressen un determinat receptor.

Finalment cal remarcar que els llocs d'unió visualitzats per autoradiografia de receptors no representen forçosament receptors funcionals. La seva funcionalitat ha de ser determinada amb l'ús d'altres tècniques de tipus fisiològic.

### LOCALITZACIÓ DE mRNA DE RECEPTORS PER HIBRIDACIÓ *IN SITU*

Una tècnica que ha esdevingut molt popular durant els darrers anys per localitzar mRNA microscòpicament és l'anomenada d'hibridació *in situ*. Amb el clonatge de pèptids i proteïnes involucrades en la neurotransmissió, inclosos un gran nombre de receptors per a neurotransmissors, ha estat possible conèixer la seqüència dels mRNA que els codifiquen. Gràcies a això és possible obtenir «sondes» que poden ser utilitzades

per detectar els mRNA d'interès. Aquestes sondes són cadenes d'àcids nucleics de mida variable, amb una seqüència complementària a la de l'RNA en estudi. Gràcies a aquesta complementaritat i en condicions adequades, les sondes d'àcids nucleics convenientment marcades es poden fer hibridar amb els corresponents mRNA immobilitzats sobre suports sòlids, ja siguin els anomenats *blots* (*dot blot* i *Northern blot*) o sobre seccions de teixit (per hibridació *in situ*) (Sambrook *et al.*, 1989; Polak i McGee, 1990). El procés d'hibridació té lloc gràcies a la formació de ponts d'hidrogen entre bases complementàries: guanina i citosina (G i C) o adenina i uracil (A i U).

### Metodologia

Hi ha diversos protocols d'hibridació *in situ*, que difereixen entre ells segons el tipus de sonda que s'utilitza i el teixit en estudi, principalment. Un protocol òptim per a hibridació *in situ* ha de complir una sèrie de requeriments, entre els quals es poden esmentar els següents: 1) Cal preservar la morfologia del teixit estabilitzant l'mRNA dins de la matriu cel·lular de manera que sigui accessible a la sonda d'hibridació; 2) cal aconseguir una elevada sensibilitat que permeti identificar mRNA poc abundants, i 3) s'han de fer controls de l'especificitat d'hibridació per tal de distingir el que és senyal d'hibridació autèntic del que és marcatge no específic per la unió de la sonda amb altres components del teixit o a RNA no homòlegs.

#### Sondes d'hibridació

Les sondes que s'utilitzen en la tècnica d'hibridació *in situ* poden ser cadenes de RNA o de DNA de llargada variable (entre 30 bases i vàries quilobases), i de seqüència

complementària a l'àcid nucleic diana. Fins ara les sondes que s'utilitzen en hibridació *in situ* solen ser marcades amb [ $^{32}\text{P}$ ] o amb [ $^{35}\text{S}$ ] (i darrerament també amb [ $^{33}\text{P}$ ]), que per la seva alta energia permeten una ràpida detecció del senyal d'hibridació i proporcionen molta sensibilitat. També és possible marcar les sondes amb [ $^3\text{H}$ ] per millorar la resolució, però al mateix temps s'allarga molt el temps d'exposició. Actualment, però, es tendeix a substituir els isòtops radioactius per altres mètodes no isotòpics. Així es poden marcar sondes amb biotina o digoxigenina. La detecció d'aquestes es fa de forma indirecta: avidina/estreptavidina per la biotina i anticossos antidigoxigenina acoblats a fosfatasa alcalina per la digoxigenina. Els mètodes no isotòpics tenen a més els avantatges d'oferir una alta resolució i molta rapidesa en el revelatge. En canvi l'inconvenient principal és que tenen molt poca sensibilitat i, per tant, no són gens recomanables per a l'estudi de mRNA poc abundants, com és el cas dels receptors de neurotransmissors.

El tipus de sondes i la manera de preparar-les que en l'actualitat s'utilitzen amb més freqüència són els següents:

**Ribosondes.** Són sondes de RNA. Per generar-les s'ha de disposar del DNA d'interès subclonat en un plasmid apropiat que contingui promotors reconeguts per alguna RNA polimerasa (per exemple, T7 o SP6). La transcripció d'aquest vector amb l'RNA polimerasa adequada i en presència de ribonucleòtids marcats proporciona un transcrit de RNA que pot ser utilitzat com a sonda d'hibridació. Un dels avantatges de les ribosondes generades d'aquesta manera és l'alta activitat específica que poden arribar a tenir, cosa especialment important quan es pretenen utilitzar per detectar espècies de RNA poc abundants. D'altra banda, els dúplex de RNA-RNA que es generen amb les ribosondes són més estables que no els hí-

brids de RNA-DNA formats a partir de sondes de DNA. En canvi, tenen l'inconvenient que obliguen a treballar en condicions molt estrictes per evitar que l'RNA es degradi.

**Sondes de DNA de cadena simple.** Aquest tipus de sonda s'ha popularitzat recentment arran de la introducció de la tècnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Per sintetitzar les sondes cal disposar d'un dúplex de DNA i de dos oligonucleòtids complementaris, un i altre a zones extremes i oposades de les dues cadenes de DNA. Un cop desnaturalitzat el DNA, els dos oligonucleòtids actuen com a iniciadors per a l'elongació de les corresponents cadenes de DNA en una reacció catalitzada per una DNA polimerasa termostable (com ara la TaqI). La repetició en cadena dels processos de desnaturalització i polimerització produeix l'amplificació del producte. Si aquesta cadena de reaccions es fa en presència de nucleòtids marcats es poden obtenir sondes marcades d'elevada activitat específica.

**Sondes d'oligonucleòtids sintètics.** Els oligonucleòtids que s'usen per a hibridació *in situ* són cadenes de DNA de 20 a 60 bases, que es preparen amb sintetitzadors de DNA automàtics. Tenen l'avantatge que són molt fàcils d'obtenir. A més, com són de mida petita penetren molt bé dins les cèl·lules. Per marcar-los existeixen diferents mètodes: 1) marcatge de l'extrem 5' amb  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP i polinucleòtid cinasa, 2) marcatge en 3' amb  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ddATP i deoxinucleotidil transferasa terminal, i 3) marcatge en 3' amb  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP i deoxinucleotidil transferasa terminal (*tailing*). Els dos primers procediments produeixen la incorporació d'una sola base, mentre que el *tailing* afegeix cues de nucleòtids marcats, cosa que proporciona una activitat específica més alta.

Un cop marcades les sondes és convenient purificar-les cromatogràficament per separar-ne els nucleòtids marcats que no s'han incorporat.

### Preparació del teixit

La tècnica d'hibridació *in situ* es pot aplicar tant en teixit congelat (ja sigui fresc o perfundit) com en teixit inclòs en parafina. Els teixits es tallen amb un criòstat o micròtom en seccions d'un gruix de 5 a 20  $\mu\text{m}$  i es munten sobre portaobjectes tractats amb productes adherents (vegeu l'autoradiografia de receptors). Quan s'utilitza teixit inclòs en parafina cal eliminar-la abans de la incubació.

La majoria de protocols d'hibridació inclouen una postfixació de les seccions de teixit amb paraformaldehid al 4%, seguida d'un rentatge amb solució tampó, deshidratació en sèries d'etanol, deslipidació amb cloroform i rehidratació amb etanol. Si es fan servir sondes llargues convé a més desproteïnitzar el teixit amb HCl 0,2% i/o pronasa.

### Hibridació

Els portaobjectes amb les seccions de teixit es recobreixen amb una solució (tampó d'hibridació) que, a part de la sonda marcada, sol contenir: formamida (per augmentar l'astringència), cations monovalents, solució de Denhardt, tRNA de llevat, DNA d'esperma de salmó i sulfat de dexdrà. La hibridació es du a terme durant 16-20 hores en un incubador a temperatura variable que oscil·la entorn dels 42 °C.

### Rentatge

Després de l'etapa d'hibridació, les seccions incubades se sotmeten a successius rentatges amb solucions tampó. La composició del tampó i la temperatura de rentatge varien molt d'un protocol a un altre. Com més llargues són les sondes més exhaustius han de ser els rentatges, més baix el contingut en sals del tampó i més elevada la temperatura.

Idealment la temperatura de rentatge s'ha de determinar per a cada sonda, ja que ha d'estar per sota de la  $T_m$  de l'híbrid. Quan es treballa amb ribosondes convé fer un tractament amb RNAsa per tal de destruir les molècules de sonda que no han hibridat. Un cop acabats els rentatges, les seccions s'assequen amb aire.

### Exposició i obtenció d'autoradiogrames

El procediment és idèntic al descrit anteriorment per a l'autoradiografia de receptors. El tipus de films i emulsions varia, però, en funció de l'isòtop utilitzat. En el cas de la hibridació *in situ* és molt habitual utilitzar films i també la tècnica de *dipping*, ja que els híbrids formats resisteixen la temperatura de l'emulsió. Aquesta última permet la detecció microscòpica de mRNA sobre cossos cel·lulars.

### Controls d'especificitat

Com en qualsevol tècnica histoquímica, no tots els senyals observats per hibridació *in situ* són específics. Com que no existeix un mètode únic per determinar de manera infal·lible l'especificitat del senyal d'hibridació, cal recórrer a l'aplicació d'una sèrie de controls, entre els quals es poden citar els següents:

1. Anàlisi per *Northern blot*: Serveix per determinar la mida de l'mRNA marcat, i veure si es correspon amb la mida esperada.

2. Anàlisi amb diferents sondes: És factible amb oligonucleòtids complementaris en diferents regions d'un mateix mRNA. Analitzant seccions consecutives, totes les sondes han de mostrar el mateix patró de distribució.

3. Cohibridació amb un excés de sonda no marcada: Ha d'eliminar el senyal d'hibridació.

4. Anàlisi de l'estabilitat tèrmica dels hí-

brids: Rentant a temperatures cada cop més elevades s'observa un descens brusc del senyal d'hibridació que té lloc prop de la  $T_m$  teòrica dels híbrids (en què el 50% d'ells es dissocien).

5. Pretractament amb RNAsa: Ha d'eliminar totalment el senyal d'hibridació.

6. Verificar que el senyal obtingut prové de cossos cel·lulars: Es pot fer utilitzant la tècnica de *dipping*.

#### *Avantatges de la hibridació in situ*

A l'igual de l'autoradiografia de receptors, la tècnica d'hibridació *in situ* és aplicable a tot tipus de teixits i es pot utilitzar sobre mostres humanes obtingudes en biòpsies o necròpsies.

Mitjançant la hibridació *in situ* es pot determinar quins nuclis o àrees anatòmiques del cervell contenen un determinat mRNA, i fins i tot arribar a identificar quines cèl·lules l'expressen. Això representa un important avantatge sobre les tècniques d'autoradiografia de receptors i d'immunohistoquímica, amb les quals no sempre és possible identificar quines cèl·lules contenen la proteïna detectada, ja que aquesta pot ser transportada lluny del cos cel·lular de les neurones.

D'altra banda, la hibridació *in situ* permet discernir fàcilment entre diferents subtipus de receptors i entre molècules isomorfes, com ara els productes generats per *splicing* alternatiu d'un mateix mRNA. Fer aquesta diferenciació no sempre és possible quan s'utilitzen altres tipus de tècniques com l'autoradiografia de receptors.

Tal com s'ha comentat anteriorment, la combinació de la hibridació *in situ* amb l'autoradiografia de receptors i la pràctica de lesions específiques proporciona un poderós mètode per determinar on se sintetitzen els receptors i on s'expressen, tant a nivell macroscòpic com cel·lular i subcel·lular.

#### **Limitacions**

Un problema important que té la hibridació *in situ* és la difícil quantificació dels resultats. Tècnicament és possible mesurar concentracions de radioactivitat en relació amb la densitat òptica o la densitat de grans de plata, sempre que s'utilitzin escales de patrons adequades. Tot i això, el fet és que és gairebé impossible determinar amb precisió quina és l'activitat específica de les sondes marcades i, per tant, els resultats no es poden traduir en densitats de mRNA. Per aquesta raó normalment es recorre a semi-quantificacions microdensitomètriques o al comptatge de grans de plata.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- BARNARD, E. A.; M. G. DARLISON; P. SEEBURG (1987). «Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptor: The receptor/channel superfamily». *Trends NeuroSci.*, núm. 10, pàg. 502-509.
- BEAUDET, A. (1993). «Receptor Autoradiography». A: Wharton, J.; Polak, J.M. *Autoradiographic localization of receptors at the electron microscopic level*. Oxford: Oxford University Press. pàg. 135-158.
- GEARY, W. A. II; A. W. TOGA; G. F. WOOTEN (1985). «Quantitative film autoradiography for tritium: methodological considerations». *Brain Res.*, núm. 337, pàg. 99-108.
- GEARY, W. A.; G. F. WOOTEN (1985). «Regional tritium quenching in quantitative autoradiography of the central nervous system». *Brain Res.*, núm. 336, pàg. 334-336.
- HERKENHAM, M.; L. SOKOLOFF (1984). «Quantitative receptor autoradiography: tissue defatting eliminates differential self-absorption of tritium radiation in gray and white matter of brain». *Brain Res.*, núm. 321, pàg. 363-368.
- KUHAR, M. J.; J. R. UNNERSTALL (1985). «Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current technical problems». *Trends NeuroSci.*, núm. 8, pàg. 49-53.
- LESLIE, F. M.; C. A. ALATR (1988). «Receptor localization: Ligand Autoradiography». New York: Alan R. Liss.
- PALACIOS, J. M.; D. L. NIEHOFF; M. J. KUCHAR (1981). «Receptor autoradiography with tritium sensitive film: potential for computerized densitometry». *Neurosci. Lett.*, núm. 25, pàg. 101-105.

- PALACIOS, J. M.; A. PROBST; R. CORTÉS (1986). «Mapping receptors in the human brain». *Trends NeuroSci.*, núm. 9, pàg. 284-289.
- POLAK, J. M.; J. O'D. MCGEE (1990). «*In situ* hybridization. Principles and practice». Oxford: Oxford University Press.
- PROBST, A.; G. MENGOD; J. M. PALACIOS (1991). «Current Topics in Pathology. Vol. 83. Cell Receptors». A: Seifert, S. *Neurotransmitter receptors in human brain diseases*. Berlín: Springer Verlag, pàg. 219-270.
- SAMBROOK, J.; E. F. FRITSCH; T. MANIATIS (1989). «Molecular Cloning. A Laboratory Manual». Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- STRADER, C. D.; T. M. FONG; M. R. TOTA; D. UDERWOOD (1994). «Structure and function of G protein-coupled receptors». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 63, pàg. 101-132.
- WHARTON, J.; J. M. POLAK (1993). «Receptor Autoradiography: Principles and Practice». Oxford: Oxford Science Publications.
- YAMAMURA, H. I.; S. J. ENNA; M. J. KUCHAR (1990). «Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis». New York: Raven Press.