



TESI DOCTORAL

**LA VIA JAK/STAT COM A MEDIADORA
DE RESPOSTES A L'ESTRÈS OXIDATIU,
LA INFLAMACIÓ I LA IMMUNITAT
INNATA EN ASTRÒCITS**

ROSER GORINA MENDIZ

DECEMBRE 2007

MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1. 1. CULTIU DE GLIA MIXTA DE RATA

Els cultius gials es preparen a partir de les escorces cerebrals de rates postnats P1-2 Sprague-Dawley, tal i com es descriu a (Fauconneau et al., 2002) amb algunes modificacions. Per cada cultiu, es decapiten 10 rates, s'extreu el cervell asèpticament i es manté en una placa Petri amb PBS en gel. De cada cervell es descarta el cerebel i els lòbuls olfactors, i es separen els dos hemisferis cerebrals. Amb l'ajut de la lupa binocular, es disseccionen les meninges de cada hemisferi i els hemisferis es mantenen en medi DMEM en gel. La dissociació del teixit es realitza mecànicament, disgregant la mescla amb pipeta Pasteur fins que s'aconsegueix una suspensió homogènia. Es filtra la suspensió amb un filtre de 70µm i es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm. Es descarta el sobrenadant i es resuspèn el pellet en medi DMEM suplementat amb un 20% de sèrum boví fetal (FBS) i un 0.4% de penicil·lina/estreptomicina (taula 8). Després de sembrar, les cèl·lules es mantenen a l'incubador a 37°C i en una atmosfera humidificada amb 5% CO₂ i 95% d'aire.

El medi es canvia cada 4 ó 5 dies i el percentatge de FBS es va disminuint progressivament a 10% en el primer canvi, 7% en el següent (figura 23). La confluència s'assoleix després de 12-13 dies in vitro (DIV). En aquest punt el cultiu està format per un 75 % d'astròcits i un 25% de microglia.

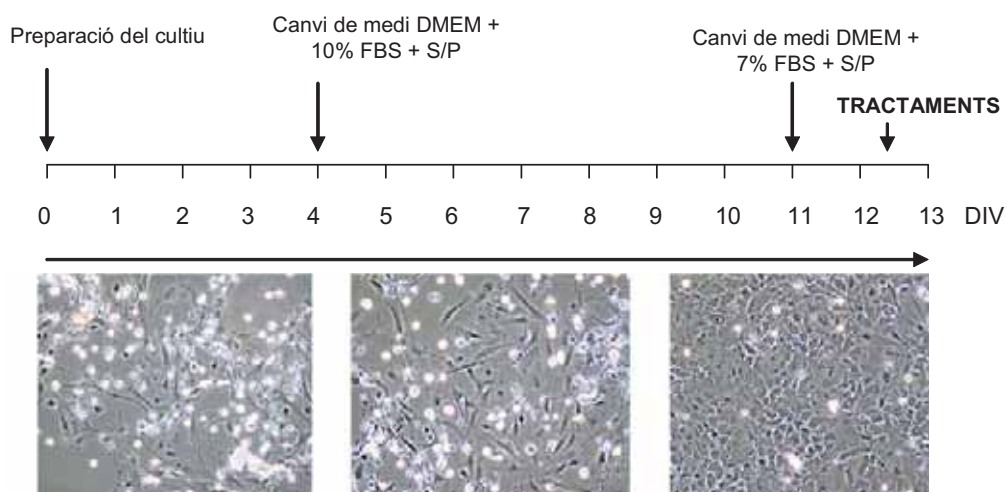


Figura 23. Cultiu de glia mixta de rata.

1.2. CULTIU GLIA MIXTA DE RATOLÍ

El cultiu de glia mixta de ratolí s'ha preparat segons el mètode de Giulian i Baker (1986). A diferència del mètode de Fauconneau, la dissociació del teixit es realitza de manera mecànica i química. Després de l'obtenció dels hemisferis

cerebrals, el teixit es disgrega amb tripsina 0,25%/EDTA 1mM durant 25minuts en agitació a 37°C. la tripsina es neutralitza amb DMEM:F12 (1:1) + 10% FBS + DNasa 4mg/mL. La disgregació es continua mecànicament pipetejant fins que s'aconsegueix una suspensió cel·lular completament homogènia. Les cèl·lules gials es mantenen en medi DMEM:F12 suplementat amb un 10% de FBS i el medi es canvia un cop a la setmana. En els cultius de ratolí, en els procediments per la purificació d'astròcits i microglia s'utilitza el medi DMEM:F12 al 10% de FBS més antibiòtics.

1. 3. CULTIU PUR D' ASTRÒCITS

El cultiu d'astròcits pur s'obté a partir d'un cultiu de glia mixta. En el cultiu glial, quan les cèl·lules arriben a confluència, aproximadament a 8-9 DIV, afegim citosina arabinosa (AraC) 4µM. En el cultiu de glia mixta confluent prolifera la microglia i els progenitors per sobre la capa d'astròcits. L'AraC és un antimitòtic que impedirà la proliferació cel·lular i no permetrà que s'incrementi el percentatge de cèl·lules microgials. L'AraC es manté en el medi de cultiu fins al moment de subcultivar (figura 24).

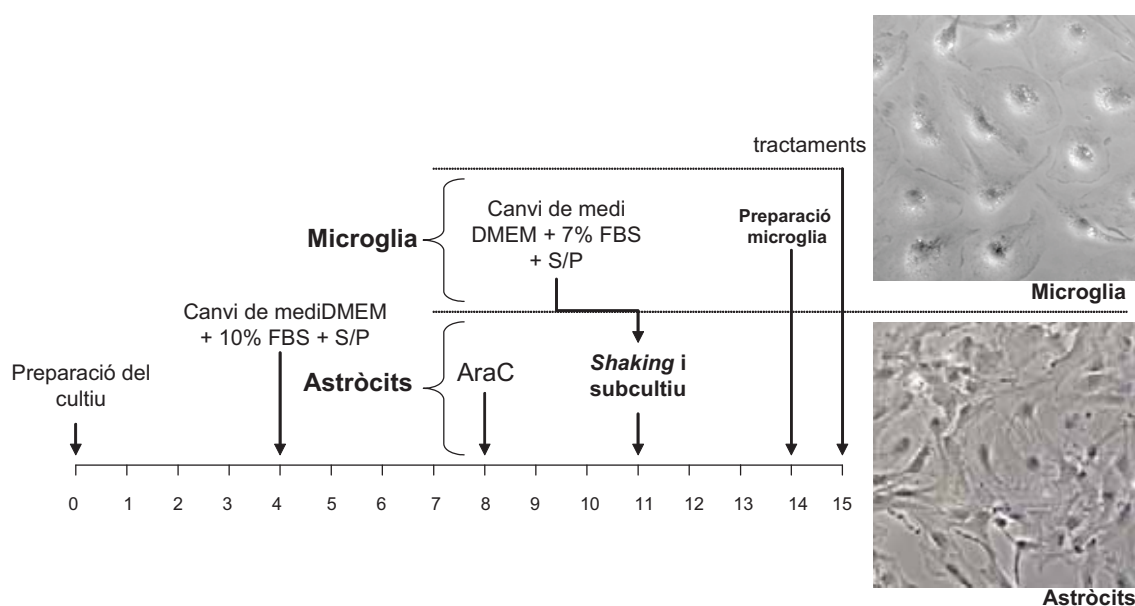


Figura 24. Obtenció d'astròcits pur o microglia a partir d'un cultiu de glia mixta.

Abans de subcultivar les cèl·lules s'agiten en un agitador orbital a 100 rpm durant 3h per eliminar la microglia adherida damunt de la monocapa astrocitària. Després de l'agitació, es fa un rentat amb PBS per eliminar les restes de sèrum i es desadhereixen les cèl·lules amb tripsina 0,05%/EDTA 2mM. Els cations bivalents són inhibidors de la tripsina, afegim EDTA (quelant de cations bivalent) per augmentar l'acció de la tripsina. Es deixa actuar la tripsina dins l'incubador durant 5 minuts aproximadament fins que observem que les cèl·lules es desadhereixen. Neutralitzem

l'acció de la tripsina addicionant PBS + 20%FBS. Recuperem la suspensió cel·lular i centrifuguem 5min a 1000 rpm. Després de la centrifugació descartem el sobrenadant i recuperem el pellet cel·lular en amb DMEM + 10% amb antibiòtics. A continuació, contem les cèl·lules i sembrem a baixa densitat (50.000 -100.000 cèl·lules /mL).

1.4. CULTIU DE MICROGLIA

Els cultius de microglia s'han obtingut mitjançant el mètode *Mild Trypsinization* descrit per Saura et al. (2003). El cultiu glial mixta confluent es sotmet a una tripsinització suau (0,062% Tripsina, 0,25mM EDTA) de manera que la monocapa d'astròcits es desadhereix sencera i les cèl·lules que es mantenen adherides a la placa són microglia en més d'un 98%.

Per obtenir microglia a partir d'un cultiu de cèl·lules glials, cal tenir moltes cèl·lules rodones i brillants (microglia i precursors) en la monocapa astroglial (figura 24). Per aconseguir-ho cal deixar el cultiu mixta arribar a confluència. La microglia creix per sobre i per sota de la monocapa d'astròcits, i amb aquest protocol obtenim la microglia de la part inferior.

A partir d'un cultiu de glia mixta confluent, recuperem el medi condicionat i el reservem. Utilitzarem el medi condicionat per mantenir la microglia, doncs, li calen els factors tròfics alliberats pels astròcits per sobreviure *in vitro*. Fem un rentat amb DMEM:F12. Afegim la tripsina suau (Tripsina 0,25%, EDTA 1mM diluït en DMEM:F12 en una proporció 1:4.) i la deixem actuar durant uns 30 minuts aproximadament. Durant aquest temps la capa d'astroglia es desadhereix des dels extrems del pou cap al centre, cal controlar el procés mirant al microscopi cada pocs minuts. Finalment, la capa d'astròcits es desenganxa i queda suspesa en el medi i s'observa a simple vista.. Seguidament es neutralitza la tripsina amb DMEM:F-12+ 10% FBS i s'aspira el medi. Afegim el medi condicionat. La microglia es tracta 1 ó 2 dies després.

1.5. LÍNIES CEL·LULARS

1.5.1. LÍNIA CEL·LULAR NIH3T3

La línia cel·lular NIH3T3 (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*) va ser establerta el 1963 per George Todaro i Howard Grenn a partir de teixit de embrió de ratolí albí Swiss. La línia cel·lular 3T3 s'ha convertit en una línia de fibroblasts estàndard, àmpliament utilitzada en recerca. Aquests fibroblasts són molt sensibles a l'inhibició per contacte i tendeixen a formar monocapes confluents (figura 25). Les cèl·lules es mantenen en medi DMEM suplementat amb un 10% FBS i antibiòtics.

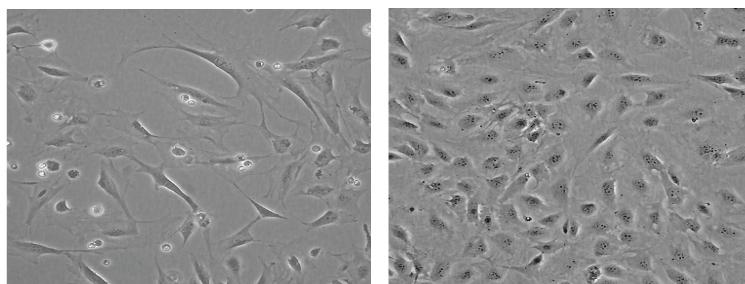


Figura 25. Cèl·lules NIH3T3 a diferents densitats.

1.5.2. DESCONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS

Es treu el criotub que conté la línia cel·lular congelada del tanc de nitrogen líquid i el deixem atemperar durant uns minuts a temperatura ambient. Seguidament, es col·loca el criotub en el bany a 37°C durant 1-2 minuts per accelerar el procés de descongelació. Recollim el contingut del criotub i el transferim a un tub Falcon que conté 20 mL de medi de cultiu prèviament atemperat a 37°C. El DMSO que conté el criotub queda diluït en el medi de cultiu de manera que el percentatge de DMSO al medi és inferior al 1%. Concentracions majors de DMSO produeixen toxicitat a les cèl·lules en cultiu. A continuació, s'homogeneïtza bé la suspensió cel·lular i sembrem en plaques Petri de 10cm de diàmetre on mantindrem la línia cel·lular a 37°C amb una atmosfera de 5% CO₂ i 95% aire.

1.5.3. SUBCULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS

El subcultiu ens permetrà mantenir o estendre la línia cel·lular. Les NIH3T3 necessiten subcultivar-se molt freqüentment donada la seva elevada taxa de creixement. Per subcultivar les cèl·lules, les desadherim del suport amb tripsina 0,05%/EDTA 2mM. A diferència del subcultiu d'astroglia, les línies cel·lulars es desadhereixen ràpidament de la placa, així que en pocs segons neutralitzem l'acció de la tripsina amb PBS + 20% FBS. Recuperem la suspensió cel·lular i centrifuguem 5 minuts a 1000 rpm. Recuperem el pellet cel·lular i es dilueix en medi fresc. Contem el número de cèl·lules amb la cambra de Neubauer per conèixer la concentració cel·lular. S'ajusta el volum a la densitat adequada i sembrem la suspensió cel·lular .

1.5.4. CONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS

Procedim de la mateixa manera que per subcultivar desadherint les cèl·lules, centrifugant i contant. Recollim el volum de suspensió cel·lular que conté un milió de cèl·lules i tornem a centrifugar per eliminar el sobrenadant. El pellet cel·lular es resuspèn en 900µL de FBS i es transfereix al criotub que conté 100µL de DMSO. La congelació ha de ser progressiva, les cèl·lules protegides en porexpan es mantenen

durant un dia a -20°C , llavors es transfereixen a -80°C i un dia després es col·loquen al tanc de nitrogen líquid.

Reactiu	Abreviatura	Referència	Casa comercial
Dulbecco's Mod Eagle medium	DMEM	31885-023	Gibco
Foetal Bovine Serum	FBS	10500-064	Gibco
DMEM:F12 (1:1)	DFF	31330-038	Gibco
Trypsin-EDTA (0,25%, 1mM)	tripsina	25200-056	Gibco
Penicillin-Streptomycin	P/S	15140-122	Gibco
DNase-I (diluïda en PBS a 4m/mL)	DNasa	D-5025	Sigma

Taula 8. Taula de reactius utilitzats pels cultius cel·lulars.

Suport	Volum de medi
Placa Petri 100mm	10mL
Placa Petri 60 mm	5 mL
Placa 12 pous	1,0 mL / pou
Placa 24 pous	0,5 mL / pou
Placa 96 pous	100 μL / pou
Flascó 75 cm ²	15 mL
Flascó 25 cm ²	5 mL

Taula 9. Taula indicadora del volum de medi de cultiu afegit segons el tipus de placa.

2. MÈTODES DE MESURA DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

2.1. ASSAIG D'EXCLUSIÓ DEL COLORANT BLAU TRIPÀ

L'assaig d'exclusió del colorant Blau Tripà ens permet mesurar percentatge de cèl·lules vives i mortes. Les cèl·lules s'exposen al colorant i les que presentin la membrana cel·lular intacta quedaran sense tenyir, mentre les cèl·lules amb la membrana malmesa internalitzaran el Blau Tripà, de manera que l'integritat de la membrana cel·lular ens permetrà discriminar entre cèl·lules vives i mortes. Aquest assaig s'ha realitzat segons es va descriure a Fanconneau et al. (2002).

Solucions:

- Blau Tripà 0,4% estèril (Sigma)

Assaig:

Es recull el medi dels pous i es reserva en un tub Falcon, cada tub correspon a un pou de la placa. Es fa un rentat amb PBS 1x estèril i el PBS es recupera i s'afegeix al tub, d'aquesta manera recuperarem les possibles cèl·lules mortes que s'hagin desadherit. Afegim tripsina 0,05%, EDTA 0,2mM i incubem a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxin, 5 minuts aproximadament (anar comprovant si perden l'adherència sota el microscopi). Seguidament, es neutralitza la tripsina amb PBS + 20% FBS i la suspensió de cèl·lules obtinguda s'afegeix als tubs. Centrifuguem els tubs 5 minuts a 1000 rpm. A continuació, es descarta el sobrenadant i el pellet es resuspèn en 100µL de PBS 1x a temperatura ambient. S'homogeneïtza la suspensió cel·lular amb pipeta unes 10 vegades. En un tub Eppendorf mesquem 50µL de suspensió cel·lular amb 50µL de Blau Tripà. Pipetejar per mesclar bé. Amb la cambra de Neubauer, es conta el total de cèl·lules a cada quadrant i el nombre de cèl·lules tenyides, d'aquesta manera s'obté el percentatge de mort cel·lular.

2.2. IODUR DE PROPIDI

S'ha utilitzat la tinció amb iodur de Propidi per identificar les cèl·lules mortes en cultiu sense fixar. Aquest assaig es basa en el mateix principi que l'assaig d'exclusió de Blau Tripà, l'IP s'internalitza a les cèl·lules amb la membrana danyada i produeix fluorescència en intercalar-se en als àcids nucleics. Per tant, els nuclis de les cèl·lules danyades queden tenyits amb fluorescència vermella.

Solucions:

- Iodur de Propidi . Es prepara una solució mare de 1,5mg/ml en PBS.

Assaig:

L'IP s'addiciona al medi de cultiu a una concentració final de 15µg/mL i s'incuba durant 30 minuts protegit de la llum. Aleshores es fa un rentat amb PBS calent i es fan fotografies amb el microscopi invertit de fluorescència. El valor corresponent al 100% de mort (F_{max}) s'obté tractant les cèl·lules amb Tritò-X100 0,02% durant 60 minuts abans d'afegir l'IP. Els resultats dels diferents tractaments (F) es calculen segons: $(F - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100$, on F_{min} correspon a la mitjana del valors del grup control.

2.3. ASSAIG DE L'ACTIVITAT LACTAT DESHIDROGENASA

L'assaig de la lactat deshidrogenasa va ser descrit originalment per Wroblewski i LaDue al 1955. L'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) és un enzim citosòlic que catalitza la reacció:



En aquest assaig enzimàtic es mesura la velocitat de desaparició del NADH, que és proporcional a la concentració de LDH. Es mesura la desaparició de NADH tenint en compte que el NADH presenta un màxim d'absorció a 340nm mentre que la forma oxidada no absorbeix entre 300 i 400nm.

Solucions:

- Tampó fosfat potassi 0.05M, pH 7.4
- Solució NADH

Àcid pravis	4.2mM
β-NADH	0.75mM
NaHCO ₃	9,45mM

La solució NADH es prepara en el tampó fosfat potassi just abans d'usar.

Assaig:

Per obtenir un control del 100% de mort tractem alguns pous amb Tritó X-100 0,02% durant 1h abans de realitzar l'assaig. Després dels tractaments, es recullen 50µL de medi de cada pou i es transfereixen en una placa de lectura de 96 pous. Just abans d'iniciar la lectura espectrofotomètrica s'addiciona 100µL de solució NADH a cada i pou amb l'ajut de la pipeta multicanal. Posem la placa al espectrofotòmetre que realitza una lectura d'absorbància a 340nm cada 15 segons durant 4min. El paràmetre que utilitzem per fer els càlculs és la velocitat de desaparició del NADH expressat en absorbància /minut. A partir d'aquest paràmetre fem els càlculs aplicant la mateixa fórmula que per l'IP.

2.4. ASSAIG MTT

L'assaig de MTT per mesurar citotoxicitat va ser desenvolupat per Mosmann (1983) i es realitza seguint les modificacions de Hansen et al. (1989). Les cèl·lules viables amb les mitocondris actius poden metabolitzar la sal de tetrazoli (MTT) de color groc i donar lloc a la formació de cristalls de formazan que són insolubles i de color violaci.

Solucions:

- Solució MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoli bromidi es dissolt a la concentració de 5mg/ml en PBS. S'esterilitza per filtratge, cal protegir de la llum i conservar a 4°C.
- Solució de llisi: Utilitzem aquesta solució per llisar les cèl·lules i dissoldre els cristalls. Es prepara un 20% de sodi dodecil sulfat (SDS) dissolt en N, N-dimetil formamida/aigua (1:1) a pH 7.4.

Assaig:

L'assaig de MTT s'ha portat a terme en plaques de 96 pous. Traiem les plaques de l'incubador i afegim 10µL de solució MTT a cada pou, on quedarà una concentració final de 500µg/mL de MTT. Retornem les plaques a l'incubador i les hi deixem 2 hores. Durant aquest temps les cèl·lules viables reduiran la sal de MTT donant lloc a la formació dels cristalls. Per fer el blanc deixem alguns pous sense tractar i sense afegir solució de MTT, però sí que hi afegirem la solució de llisi. Per dissoldre els cristalls, afegim 100µL de solució de llisi a cada pou i incubem les plaques en l'estufa a 37°C durant tota la nit. Llegim a la densitat òptica de 560 i 620nm en l'espectrofotòmetre, s'utilitza l'absorbància a 620nm com a referència i s'obté la diferència respecte a l'absorbància a 560nm per eliminar el soroll de fons.

Els resultats es calculen segons:

$$\text{percentatge de reducció de MTT} = \{(DO - DO_0) / (DO_c - DO_0)\}$$

on DO_c és la mitjana dels pous control i DO_0 la mitjana dels pous usats com a blanc.

2.5. ASSAIG DE L'ACTIVITAT CASPASA -3

Per portar a terme l'assaig de l'activitat caspasa-3 s'ha utilitzat el kit CaspaTag™ (Intergen Co. Purchase, NY, USA) tal com es descriu prèviament al treball de Fauconneau et al. (2002). Aquest assaig ens permet detectar l'activació de caspasa 3 en cèl·lules vives mitjançant l'ús d'un anàleg del l'inhibidor de caspases carboxifluoresceïna (FAM): àcid benziloxycarbonil-aspartilglutamilvalilaspatic fluorometil cetona (zVEVD-FMK). El FAM-DEVD-FMK és un potent inhibidor de la caspasa 3. Aquest inhibidor és permeable a la cèl·lula i no és tòxic, un cop dins la cèl·lula s'uneix covalentment a la caspasa activada (Ekert et al., 1999).

Solucions:

- 30x Working Dilution FAM-Peptide-FMK,
- 1x Working Dilution Wash Buffer
- Fixative solution

Aquestes solucions són subministrades en el kit Caspatag.

Assaig:

Segons les instruccions del fabricant, el protocol es divideix en els següents passos:

- Recollir les cèl·lules
 1. Rentar les cèl·lules amb PBS 1x estèril
 2. Afegir la Tripsina-EDTA i incubar a 37°C fins que les cèl·lules es desadhereixin
 3. Neutralitzar la tripsina amb PBS + FBS 20%

4. Centrifugar 5min 1000rpm RT
 5. Aspirar el sobrenadant i resuspendre les cèl·lules en PBS 1x
 6. Contatge cel·lular
 7. Portar la suspensió cel·lular a una concentració de 10^6 cèl·lules/mL amb PBS 1x estèril
- Marcatge cel·lular
 8. Agafar una alíquota de 300 μ L de la suspensió anterior (posar-la en un Falcon de 15mL) i afegir-hi 5 μ L 30x *Working Dilution FAM-Peptide-FMK*, mesclar suaument.
 9. Incubar la suspensió durant 1h dins l'incubador deixant el tub obert i protegit de la llum. En aquest pas té lloc l'entrada del FAM-DEVD-FMK a la cèl·lula i la seva unió amb la caspasa 3.
 - Rentats
 10. Afegir 1mL de *1x Working Dilution Wash Buffer* a la suspensió. Mesclar bé.
 11. Centrifugar les cèl·lules a 400 x g durant 5min a RT
 12. Aspirar el sobrenadant i agitar el pellet per evitar l'agrupament cel·lular
 13. Resuspendre les cèl·lules en 1mL de *1x Working Dilution Wash Buffer* i tornar a centrifugar en les mateixes condicions, aspirar el sobrenadant.
 14. Resuspendre el pellet cel·lular en 400 μ L de *1x Working Dilution Wash Buffer*. Mantenir les cèl·lules en gel.
 - Fixació de les cèl·lules
 15. Afegir 40 μ L de *Fixative solution* als 400 μ L de suspensió cel·lular, i mesclar bé i mantenir en gel a la foscor fins anar a fer l'anàlisi en el citòmetre de flux.
 - Citometria de flux
 16. El citòmetre empleat en aquest assaig ha estat l'EPICS XL, Flow Cytometer de Coulter Cooperation del Serveis Científico-tècnics de la UB. L'anàlisi per citometria es fa utilitzant un làser d'argó de 15mW a 488nm. Es mesura la fluorescència en el canal FL1. Es genera un histograma amb el logaritme de FL1 (eix de les absisses) vs. el nombre de cèl·lules (eix de les ordenades).

3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ I FOSFORILACIÓ DE PROTEÏNES

3.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES TOTALS

Després del tractaments, es recullen les cèl·lules per estudiar l'expressió i fosforilació de proteïnes.

Solucions:

- Tampó RIPA (productes obtinguts de Sigma)

Duodecil sulfat sòdic (SDS) 0,1%

Deoxicolat sòdic 0,5%

Igepal 1%

dissolt en PBS 0,01 M.

A més a més, s'hi afegeix el *cocktail* d'inhibidors de proteases (Complete; Boehringer Mannheim) i l'inhibidor de fosfatases ortovanadat de sodi (NaVa) a 1mM.

Assaig:

Per obtenir els extractes cel·lulars, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS fred. Directament a la placa s'afegeix el tampó RIPA (*Radio ImmunoPrecipitation Assay buffer*) que conté detergents que llisaran la membrana cel·lular i porta un *cocktail* d'inhibidors de proteases que impediran la degradació de la mostra. Deixem que el tampó RIPA actuï durant uns minuts mentre la placa es manté en gel, i a continuació recollim els extractes rasant el fons de la placa amb la punta de la pipeta per assegurar-nos de recuperar tot l'extracte. Els extractes proteics obtinguts es soniquen durant 10 segons per obtenir una solució homogènia.

3.2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

La determinació de la concentració de proteïnes es fa seguint el mètode de Bradford descrit el 1976. El reactiu Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) canvia el seu màxim d'absorció des de 465nm a 595 quan interacciona amb els enllaços peptídics.

Solucions

- Bio-RAD Protein Assay (Bio Rad)

- Solució BSA: Albúmina de sèrum boví a 0,2mg/mL

Assaig

Es prepara una corba patró amb diferents concentracions conegudes de BSA. A partir de la solució mare de BSA preparam les dilucions en aigua Milli-Q segons la taula 10.

μg de proteïna / mL	0	1	2	4	8	12	16	20
BSA 0,2mg/mL	0	5 μL	10 μL	20 μL	40 μL	60 μL	80 μL	100 μL
H ₂ O	800 μL	795 μL	790 μL	780 μL	760 μL	740 μL	720 μL	700 μL
Reactiu Bradford	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL

Taula 10. Corba patró per l'assaig Bradford.

Preparem les mostres mesclant 3 μL de extracte proteic amb 800 μL d'aigua. Quan es té les mostres i la recta patró a punt s'addiciona 200 μL de reactiu Bradford. Agitem i incubem durant 15 minuts a temperatura ambient. A continuació, es mesura l'absorbància a 595nm. La concentració de proteïnes de cada mostra es calcula interpolant el valor absorbància de la mostra en la recta patró de BSA que es prepara a cada assaig.

3.3. WESTERN-BLOT

El Western-Blot és un mètode per detectar l'expressió o modificació de proteïnes específiques a partir d'un extracte proteic. El primer pas és fer córrer la mostra en un gel d'electroforesi per separar les proteïnes segons el seu pes molecular. A continuació les proteïnes es transfereixen a una membrana, i la membrana s'incuba amb un anticòs específic per a la proteïna que es vol detectar (anticòs primari). Després de rentar la membrana per eliminar l'excés d' anticòs primari, la membrana s'exposa a un altre anticòs que reconeixerà la porció específica d'espècie de l'anticòs primari. Quan la detecció es fa per quimioluminiscència, l'anticòs secundari porta unit un enzim peroxidasa que s'utilitza en conjunció amb un agent luminiscent i la reacció produeix luminiscència en proporció a la quantitat de proteïna. Es fa contactar un film fotogràfic amb la membrana, i l'exposició crea un senyal. L'intensitat del senyal es quantifica per densitometria.

Solucions:

- Solució 1 → 0,75M Tris base (PM= 121,14), pH 8.8 amb HCl
0,2% Dodecil sulfat de sodi (SDS)
en aigua Milli-Q
- Solució 2 → 30% Acrilamida / Bis Solution, 37,5:1 (Bio-Rad)
- Solució 3 → 0,25M Tris base (PM= 121,14), ajustar a pH 6.8
0,2% Dodecil sulfat de sodi (SDS)
en aigua Milli-Q

-
- Persulfat amònic → 13% Persulfat amònic

 - TEMED → TEMED (Sigma)

 - Tampó electròlit → 25mM tris-base (PM = 121,14), no s'ajusta el pH
192mM glicina (PM = 75,07)
en aigua destil·lada

 - Tampó Transferència → 25mM Tris-base, no s'ajusta el pH
192mM glicina (PM = 75,07)
20% v/v Metanol
en aigua destil·lada

 - Tampó de càrrega → 0,5M NaPi (pH7) = 0.5M Na₂HPO₄+0.5M NaH₂PO₄
20% glicerol
4% SDS
10% DTT (2, 4-ditiotreitòl)
0,05% de Blau de Bromofenol
en aigua destil·lada

 - Tampó T-TBS → 0.02M Tris HCl, ajustar al pH a 7.5
0.150M NaCl
0,05% Tween 20
en aigua destil·lada

 - Solució Luminol → 1,25mM Luminol Na
0.03% H₂O₂
0.1M Tris HCl, ajustem a pH = 8.6 / 8.7

 - Solució Enhancer → 11mg Àcid P-OH-cumàric
en 10 mL DMSO

Protocol:

- PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

Després de quantificar la concentració de proteïnes, es calcula el volum de mostra necessari per carregar 25µg de proteïna. S'afegeix aigua per ajustar totes les mostres al mateix volum. El tampó de càrrega està concentrat 3x. Es porta a 1x amb el

volum de mostra. Les mostres amb tampó de càrrega es fan bullir a 100°C durant 5minuts per desnaturalitzar totalment les proteïnes.

- SDS-PAGE (*SDS PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*)

En els gels d'acrilamida amb SDS, les proteïnes es mantenen desnaturalitzades. El SDS s'uneix a les proteïnes, les desplega i els hi confereix càrrega negativa. Durant l'electroforesi, les proteïnes migraran cap al elèctrode positiu. Les proteïnes petites avancen més ràpidament a través de la malla d'acrilamida de manera que les proteïnes queden separades segons el seu pes molecular. El percentatge d'acrilamida determina la resolució del gel, una major concentració d'acrilamida permetrà separar millor proteïnes de baix pes molecular.

Per fer l'electroforesi s'utilitza el kit Mini-Protean de Bio-Rad. Es preparen dos gels, un gel separador i, per sobre, un gel apilador amb gran porus de poliacrilamida (4%). El gel apilador es prepara a pH 6,8, dues unitats de pH per sota del pH del tampó d'electroforesi. Fent córrer la mostra en aquestes condicions s'aconsegueix que les proteïnes s'agrupin i entrin al gel separador a la vegada. El gels es preparen segons la taula 11.

	6%	8%	10%	12%	15%	STACKING
Solució 1	4mL	4mL	4mL	4mL	4mL	-
	6mL	6mL	6mL	6mL	6mL	
Acrilamida	1.6mL	2.16mL	2.68mL	3.2mL	4mL	0.225mL
	2.4mL	3.24mL	4.02mL	4.8mL	6mL	0.45mL
Solució 3	-	-	-	-	-	0.975mL
	-	-	-	-	-	1.95mL
H₂O	2.4mL	1.84mL	1.32mL	0.8mL	-	0.775mL
	3.6mL	2.76mL	1.98mL	1.2mL	-	1.55mL
PSA 13%	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL	20µL
	60µL	60µL	60µL	60µL	60µL	40µL
TEMED	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	5µL
	15µL	15µL	15µL	15µL	15µL	10µL

Taula 11. Preparació dels gels d'acrilamida a diferents concentracions.

Fila en blanc, volums per preparar un únic gel; fila en groc, volums per preparar dos gels.

Un cop els gels han polimeritzat es col·loquen en la cubeta d'electroforesi que s'omple amb el tampó d'electroforesi 1x. Les mostres es carreguen en els pous del gel amb una xeringa Hamilton. Reservem un carril per carregar el marcador de pes molecular (*Precision Plus Protein Standards*, Bio-Rad). Es connecta la cubeta a la font i les proteïnes es fan córrer a 100V fins que s'observa que el front arriba al final del

gel. El tampó de càrrega porta un colorant, el Blau de Bromofenol, per poder observar com avança el front.

- TRANSFERÈNCIA PER *ELECTROBLOTTING*

Per tal que les proteïnes siguin accessibles a la detecció amb l'anticòs, les proteïnes es transfereixen des del gel a una membrana de *Polyvinylidene fluoride* (PVDF) (Immobilon, Millipore). El gel d'acrilamida es posa en contacte amb la membrana i mitjançant el pas de corrent elèctric les proteïnes migren cap a la membrana, mantenint la mateixa organització que en el gel. Per tal que les proteïnes quedin unides a la membrana és necessari activar-la. L'activació de la membrana de PVDF es fa posant-la 2 minuts en metanol, i un minut en aigua fins que s'equilibri (segons el protocol d'Immobilon). Muntem la transferència posant les esponges, el paper Whatman, el gel i la membrana en contacte. La transferència es realitza a 100v durant 90minuts. El temps de transferència també es pot ajustar al tamany de la proteïna que volem detectar, doncs, proteïnes petites transferiran més ràpidament cap a la membrana.

Després de la transferència, la membrana es desactiva incubant-la novament amb metanol i es deixa assecar. Seguint el protocol *Fast System* (Immobilon), no és necessari bloquejar les membranes de PVDF i les membranes desactivades s'incuben directament amb l'anticòs primari.

- IMMUNOBLOT

L'anticòs primari diluït en tampó T-TBS s'incuba amb la membrana durant tota la nit en agitació a 4°C. Després de l'incubació es fan 2 rentats amb T-TBS durant 15minuts per eliminar l'excés d'anticòs. A continuació, la membrana s'exposa amb un anticòs secundari que reconeix la porció específica d'espècie de l'anticòs primari. Per això els anticossos secundaris s'anomenen: *anti-mouse*, *anti-rabbit*,... segons l'espècie que reconeixen.

- DETECCIÓ PER QUIMIOLUMINISCÈNCIA

Després d'hibridar amb l'anticòs secundari que porta unit l'enzim peroxidasa, la membrana s'incuba amb la solució luminol i enhancer durant 1minut. La detecció de la llum produïda per la reacció de la peroxidasa es fa posant en contacte la membrana amb una pel·lícula fotogràfica dins d'un cassette.

- ANÀLISI PER DENSITOMETRIA

L'anàlisi de l'intensitat de les bandes es va realitzar utilitzant el software Quantity One (Bio-Rad). L'intensitat de banda es calcula a partir del *ratio* entre l'intensitat de banda de la proteïna en estudi i l'intensitat de banda de una proteïna control de càrrega, com la β -tubulina, actina o GAPDH.

3.4. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

L'immunofluorescència és una tècnica que permet detectar una proteïna específica mitjançant l'hibridació amb un anticòs secundari conjugat a una molècula fluorescent.

Solucions:

- Paraformaldehid al 4%
- PBS + 0,2% de Tritó X100
- PBS 1x

Protocol

- FIXACIÓ DE LES CÈL·LULES

A partir de les cèl·lules en cultiu, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS 1x. Les cèl·lules es fixen amb paraformaldehid 4% durant 30minuts a temperatura ambient. Després de la fixació, es fan dos rentats de 5 minuts amb PBS.

- IMMUNOCITOQUIMICA

Quan l'antígen és intracel·lular, cal permeabilitzar les cèl·lules perquè l'antígen sigui accessible a l'anticòs. La permeabilització de la membrana cel·lular es fa amb PBS + 0,2 % Tritó x100 durant 8 minuts. A continuació, es fa un rentat per eliminar les restes de detergent.

Per bloquejar les unions inespecífiques, utilitzem sèrum de l'animal en el qual hagi estat fet els anticòs secundari, per evitar que l'anticòs secundari doni reacció inespecífica. La solució de bloqueig es prepara en PBS amb un 3% de sèrum. Fem un rentat amb PBS i incubem amb l'anticòs primari que reconeixerà la proteïna específica. Es dilueix l'anticòs en PBS + 1% de sèrum (s'utilitza el mateix sèrum que en la solució de bloqueig). L'incubació amb l'anticòs primari es porta a terme durant tota la nit a 4°C. A l'endemà, es fan 2 rentats de 5 minuts amb PBS i incubem amb l'anticòs secundari. L'anticòs secundari porta unida una molècula fluorescent Alexa (Molecular Probes) que podrem visualitzar amb el microscopi invertit de fluorescència (Olympus). S'incuba amb l'anticòs secundari diluït en PBS amb 1% de sèrum durant 1h a temperatura ambient. Després de l'incubació, es fan 2 rentats amb PBS. Es fan fotografies amb el microscopi de fluorescència.

3.5. TINCIÓ NUCLEAR AMB BISBENZIMIDA (HOECHST)

La bisbenzimidida s'intercala entre els àcids nucleics i emet fluorescència. Aquesta tinció ens permetrà identificar els nuclis cel·lulars. Les mostres fixades es tracten amb bisbenzimidida 5mg/mL (Hoechst 33258, Sigma) durant 10minuts a temperatura ambient. Seguidament es fan rentats amb PBS per eliminar l'excés.

Anticossos utilitzats en els diferents treballs:

Anticòs primari	Aplicació	dilució	l s o t i p	Casa comercial
GFAP	WB	1:8000	Mouse monoclonal	Boehringer Manheim
	ICQ	1:1000		
ED-1	WB	1:5000	Mouse monoclonal	Serotec
	ICQ	1:100		
β -tubulina	WB	1:50000	Mouse monoclonal	Sigma
Actina	WB	1:10000	Mouse monoclonal	Sigma
Jak2	WB	1:1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling
p-Tyr ⁷⁰¹ Stat1	WB	1:1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling
Stat1	WB	1:4000	Mouse monoclonal	BD Trans. Labs.
Nitro-Tyr	WB	1:1000	Mouse monoclonal	StressGen
iNOS	WB	1:1000	Mouse monoclonal	BD Trans. Labs.
p-eiF2alpha	WB	1:1000	Rabbit monoclonal	Epitopics
panERK	WB	1:8000	Mouse monoclonal	Cell Signaling
Stat3	WB	1:4000	Mouse monoclonal	BD Trans. Labs.
p21	WB	1:2000	Mouse monoclonal	BD Trans. Labs.
VCAM-1	WB	1:1000	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotch.
COX-2	WB	1:1000	Rabbit polyclonal	Cayman Chemical co
p-Tyr ⁷⁰⁵ Stat3	WB	1:500	Rabbit polyclonal	Santa Cruz
p-Ser ⁷²⁷ Stat1	WB	1:1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling
p-Ser ⁷²⁷ Stat3	WB	1:500	Rabbit polyclonal	Upstate

A n t i c ò s s e c u n d a r i s	Aplicació	Dilució	Casa comercial
Anti-mouse Ig peroxidase linked antibody	WB	1:4000	Bio-Rad
Anti-rabbit Ig peroxidase linked antibody	WB	1:2000	Amersham
Anti-goat Ig peroxidase linked antibody	WB	1:2000	Amersham

3. 5. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

La tècnica ELISA permet detectar i quantificar la concentració d'una proteïna determinada. S'han utilitzat diferents kits de ELISA específics per estudiar la presència de citoquines i quimioquines en medis de cultiu. Els diferents kits utilitzats es basen en el mètode d'ELISA anomenat *sandwich*.

Els kits incorporen una placa de 96 pous on prèviament s'ha immobilitzat un anticòs específic per la proteïna que es vol detectar. La mostra s'addiciona en els diferents pous de la placa, la proteïna d'interès s'hibridarà amb els anticossos immobilitzats.

Les proteïnes que no s'han unit, s'eliminen dels pous en els rentats posteriors. L'anticòs de detecció s'afegeix al medi i interacciona amb l'antigen, formant un immunocomplex anomenat sandwich ELISA. A continuació, s'afegeix un anticòs secundari que detecta el Fc de l'anticòs de detecció. Es fan rentats per eliminar l'excés d'anticòs secundari. El revelat es porta a terme mitjançant una reacció enzimàtica catalitzada per l'enzim que es troba unit al anticòs secundari. S'afegeix el substrat que serà convertit a una forma detectable colorimètricament. Finalment, es mesura l'absorbància en l'espectrofotòmetre. Els kits emprats utilitzen una corba patró amb concentracions conegudes de la proteïna d'interès per quantificar la concentració a les nostres mostres

Proteïna	K i t d ' E L I S A	Casa comercial	referència
IP-10	Quantikine murine IP-10/CRG-2/CXCL10	R&D	MCX100
IP-9	Quantikine murine CXCL10/MIG	R&D	MCX900
IL-6	Murine IL-6 Elisa Kit	Diaclone	860.020.192
IFN- β	Mouse Interferon beta Elisa Kit	R&D	42400-1
TNF- α	Rat TNF- α Ultrasensitive Immunoassay kit	Biosource	KRC3014
MCP-1	Rat MCP-1 Immunoassay kit	Biosource	KRC1012

4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

4.1. EXTRACCIÓ D'ARN

L'extracció d'ARN s'ha portat a terme segons el mètode descrit per Chomczynski i Sacchi al 1987.

Solucions

- Solució D →

Tiocianat de guanidina	4M
Citrat de sodi	25mM
Sarcosil sòdic	0,5%
β -mercaptoetanol	0,001% afegir abans d'usar

 en aigua Milli-Q estèril
- Acetat sòdic 2M, ajustar el pH a 4.0
- Fenol
- Solució cloroform/ alcohol isoamil (50:1)
- Isopropanol
- Etanol 70% (v/v)

Protocol

Les cèl·lules es renten amb PBS i es congelen adherides a la placa a -80°C fins al moment de l'extracció de l'ARN. El primer pas de l'extracció és la llisi cel·lular amb una mescla de solució D, fenol, i acetat sòdic a una proporció 1:1:0,1. Per cada placa Petri de 6 cm de diàmetre addicionem 1mL d'aquesta mescla. Mantenim les cèl·lules en gel mentre es van lliant i recollim la solució on s'ha solubilitzat l'RNA en tubs Eppendorfs de 2mL estèrils lliures de nucleases. L'extracció a partir del lliant es realitza afegint 400 μL de cloroform/alcohol isoamil i agitant durant 30 segons amb vòrtex perquè es mesclin bé les dues fases. A continuació es centrifuga a 12000 rpm a 4°C durant 15 minuts. Després de la centrifugació s'obtenen dues fases ben diferenciades: a la fase aquosa (fase superior) s'hi troba l'ARN solubilitzat i a la fase orgànica de fenol-cloroform (fase inferior) hi ha l'ADN. Les dues fases es troben separades per una banda blanquinosa que conté les proteïnes. Recollim la fase aquosa i la transferim a un tub Eppendorf nou amb molt de compte de no arrossegar proteïnes ni ADN. Repetim aquest pas tornant a afegir 400 μL de cloroform/alcohol isoamil i centrifugant novament per assegurar-nos de recuperar la fase aquosa amb ARN únicament. La precipitació de l'ARN es porta a terme afegint a la fase aquosa un volum igual d'isopropanol. Agitem les mostres i les mantenim durant 1 hora a -20°C . Passat aquest temps, centrifuguem a 12000rpm durant 15minuts a 4°C per obtenir un petit precipitat blanc que conté l'ARN. Rentem el pellet amb 1mL d'etanol 70% (el 30% d'aigua és necessari per dissoldre les salts del pellet). Seguidament centrifuguem 10 minuts a 10000 rpm a 4°C i decantem l'etanol. És important eliminar totalment les restes de d'etanol, per això s'eixuguen les gotes amb paper Whatman. Resuspenem el pellet en 30 μL d'aigua Milli-Q estèril. Les mostres d'ARN es guarden a -20°C .

4.2. QUANTIFICACIÓ D'ARN

Per determinar la concentració d'ARN llegim l'absorbància en un espectofotòmetre a 260nm i 280nm. (Nanodrop, Bonsai Technologies). L' $A_{260\text{nm}}$ ens dóna la concentració d'ARN tenint en compte que 1 unitat d'absorbància a 260nm equival a 40 μg d'ARN. El quocient entre $L'A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ indica la puresa de la mostra (és importat que es mantingui entre 1,8 i 2).

4.3. RETROTRANSCRIPCIÓ

Per analitzar l'expressió dels missatgers per PCR, és necessari fer una transcripció reversa. La transcripció reversa genera una còpia de la cadena d'ARNm, aquesta còpia és ADN complementari (cDNA) que és estable al calor i pot resistir la metodologia PCR.

Assaig

La síntesi de cDNA s'ha portat a terme utilitzant l'AMV First-Strand cDNA Synthesis KIT (Invitrogen).

A partir de 1µg d'ARN es prepara un volum de reacció de 20µL. La reacció es realitza en tubs de PCR lliures de nucleases. En el tub mesquem l'ARN, amb 1µL de random hexàmers i 2µL de dNTPs Mix (10mM de dATP, dTTP, dGTP i dCTP a pH neutre) i ho portem a 12µL amb aigua Milli-Q estèril. La mescla s'escalfa a 65°C durant 5 minuts i llavors es mantenen els tubs en gel. Es prepara el mix de síntesi que conté per cada mostra: 4µL de 5x cDNA Synthesis Buffer, 1µL de DTT 0,1M, 1µL de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µL) i la Transcriptasa Reversa a 15U/µL. Després d'afegir el mix es mescla bé el tub i s'incuba a 50°C durant 50 minuts. La reacció s'acaba pujant la temperatura a 85°C durant 5 minuts.

4.4. PCR EN TEMPS REAL

En la PCR en Temps Real, els processos d'amplificació i detecció es produeixen de manera simultània. Mitjançant la detecció de fluorescència es pot mesurar la quantitat d'ADN amplificat a cada moment, ja que l'emissió de fluorescència produïda en la reacció és proporcional a la quantitat d'ADN format.

Per analitzar els canvis relatius de la quantitat de missatger s'escull com a patró un ARNm de referència que no canviï la seva expressió amb els diferents tractament, normalment s'utilitza un gen de manteniment (housekeeping), com l'actina o el GAPDH.

4.4.1. TAQMAN

A part dels primers que s'uniran al cDNA corresponent al gen que es vol amplificar, el sistema Taqman incorpora una tercera sonda dissenyada per hibridar amb una regió interna del producte de PCR. Aquesta sonda complementaria porta adherida una molècula fluorescent en l'extrem 5' i una altra molècula que inhibeix aquesta fluorescència "quencher" a l'extrem 3'. Quan la sonda està lliure, la proximitat entre el fluoròfor i el "quencher" impedeix la detecció de senyal fluorescent. Durant la PCR, quan l'ADN polimerasa replica la cadena motlle on s'ha unit la sonda Taqman, la activitat 5'nucleasa de la polimerasa trenca la sonda. Aleshores, la molècula fluorescent s'allibera de l'inhibició del quencher i emet fluorescència al ser il·luminada pel làser. La quantificació de la fluorescència emesa en cada cicle es proporcional a la quantitat d'ADN que s'està amplificant (figura 26).

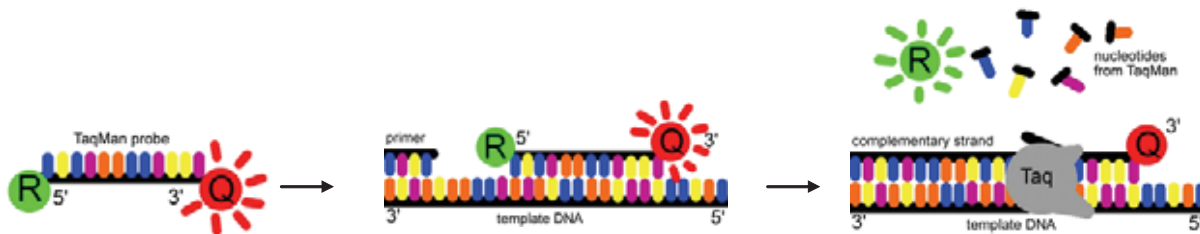


Figura 26. Funcionament de les sondes Taqman.

Assaig

Els primers utilitzats per a detectar l'expressió de TLR3 i TLR7 s'han obtingut de FAM-labelled Taqman Gene Expression assays (Applied Biosystems). Per cada mostra es prepara una reacció de PCR de 25µL. La reacció conté: 2µL de cDNA obtingut en la retrotranscripció de la mostra d'ARN, 1,25µL de 20X Taqman Gene Expression Assay Mix, 12,5 µL Taqman Universal PCR Master MIX i 9,25µL d'aigua. Totes les mostres s'analitzen per duplicat a cada placa. Les condicions d'amplificació utilitzades són: 10minuts a 95°C, seguit de 40 cicles de 15 segons a 95°C (desnaturalització) i 1 minuts a 60°C (hibridació i extensió).

El Ct és el nombre de cicles necessaris perquè es produeixi un augment significatiu de fluorescència en relació amb el senyal basal, i és inversament proporcional a la quantitat inicial de molècules motlle. A partir dels valors de Ct obtinguts pel missatger d'interès i pel missatger del gen *housekeeping*, s'analitzen resultats seguint el mètode doble delta descrit per Livak i Schmittgen (2001).

El nombre de còpies del missatger a l'inici de la reacció es pot quantificar relativament a través del cicle llindar (Ct). A partir d'una mescla de totes les mostres de cDNA que seran analitzades, es fan dilucions seriades i es construeix una recta de calibració que relaciona el Ct amb una quantitat inicial relativa de missatger. Extrapolant a la recta els valors de Ct obtinguts per cada mostra, es pot estimar el nombre de còpies inicial. Per obtenir els resultats, es calcula el *ratio* entre el nombre relatiu de còpies de l'ARNm d'interès i de l'ARNm de l'actina.

5. MÈTODES DE DETERMINACIÓ D'ESTRÈS OXIDATIU

5.1. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS INTRACEL·LULARS D'HIDROPERÒXIDS MITJANÇANT DIACETAT DE 2',7'-DICLOROFLUORESCÈINA

El mètode de quantificació dels nivells intracel·lulars de peròxids va ser inicialment descrit per LeBel et al (1992). El diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna (DCFH-DA) és una molècula no fluorescent i permeable a la cèl·lula. Dins la cèl·lula els acetats són hidroxilats per acció de les esterases endògenes de manera que el DCFH esdevé impermeable. La presència intracel·lular d'espècies reactives d'oxigen,

principalment peròxids, encara que també peroxinitrits (Possel et al.,1997), produeix l'oxidació del DCFH a 2',7'-diclorofloresceïna (DCF) que resulta ser altament fluorescent.

Solucions:

- DCFH-DA, es prepara una solució mare de DCFH-DA 2mM dissolt en metanol i es conserva aliquidat a -80°C.

- Solució salina tamponada amb HEPES (SSTH):

NaCl	135mM
KCl	5mM
CaCl ₂	1,8mM
MgSO ₄	0,62mM
HEPES	10mM

Cal ajustar la solució a pH 7,4 amb NaOH. La solució es prepara sense glucosa i es conserva a 4°C. Abans d'usar s'afegeix glucosa 6mM.

Assaig:

L'assaig s'ha realitzat en plaques de 96 pous. En fa un rentat amb la solució SSTH , i a continuació a cada pou s'afegeix 100µL de DCFH-DA 10µM. El DCFH-DA 10µM ha estat preparat a partir de la solució mare i dissolt en SSTH. A continuació, la placa protegida de la llum es retorna a l'incubador durant 20minuts. En aquest temps el DCFH-DA entrarà a la cèl·lula. Després s'aspira el DCFH-DA i es fa un rentat amb SSTH. En aquest moment es realitza la lectura basal en el fluorímetre (Cytofluor™ 2350; Millipore). Les longituds d'ona de emissió/excitació son de 485nm/530nm, l'amplitud de banda de 20nm/25nm i sensibilitat 5. La lectura final es realitza en les mateixes condicions que la basal al cap d'una hora de tractament amb l'agent prooxidant. La mesura basal es substrau i els resultats s'expressen com a percentatge del control.

5.2. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS INTRACEL·LULARS DE SUPERÒXIDS MITJANÇANT DIHIDROETIDI

La producció de radical superòxid es pot mesurar selectivament donada la seva capacitat per oxidar el dihidroetidi (DHE) per donar lloc a etidi (Bindokas et al.,1996). L'etidi generat actua intercalant-se en l'ADN i emet fluorescència vermella.

Solucions:

- DHE, es prepara una solució mare de DHE 3,2 mM en DMSO i es conserva a -80°C.

- Solució salina tamponada amb HEPES (SSTH), la mateixa utilitzada en l'assaig de la DCFH-DA.

Assaig:

Les plaques de 96 pous es renten amb solució SSTH i s'incuben amb DHE 4,8µM durant 10 minuts, durant aquest temps les plaques es mantenen dins l'incubador protegides de la llum. Després de la carrega es llegeix la mesura de fluorescència basal a les longituds d'ona de 485nm d'excitació i 590nm d'emissió (Cytofluor™ 2350; Millipore). Aleshores les cèl·lules són tractades amb els components oxidants durant una hora, i després es mesura la lectura final. Els càlculs per obtenir els resultats es realitzen de la mateixa manera que pel DCFH-DA.

5.3. MESURA DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA: TBARS

La mesura de les Substàncies Reactives amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) és un mètode indirecte per quantificar la peroxidació lipídica (Aruoma et al., 1989). Els lípid peròxids són uns indicadors inestables dels nivells d'estrès oxidatiu cel·lular, ja que es descomponen per formar altres compostos reactius més complexes com el malondialdehid (MDA), que és un producte natural derivat de la peroxidació lipídica.

El principi d'aquest mètode consisteix en detectar aquests productes secundaris de la peroxidació lipídica. El MDA reacciona i forma un adducte 1:2 amb el àcid tiobarbitúric (figura 27). Aquest adducte pot ser mesurat per fluorometria, espectrofotometria i HPLC. L'assaig T-BARS que em realitzat està dirigit a la mesura de la capacitat antioxidant de diferents compostos. En una suspensió microssomal s'indueix peroxidació lipídica tractant amb sulfat ferros.

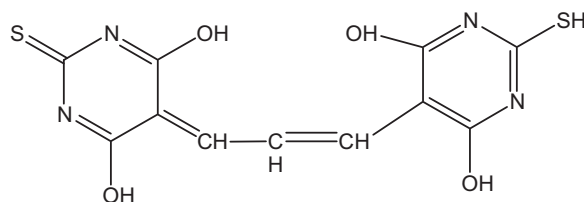


Figura 27. Adducte MDA:2TBA

Solucions:

- Solució FeSO₄-ascòrbic: preparem una dissolució de FeSO₄ hepta hidratada 50µM en aigua Milli-Q, i d'altra banda una dissolució d'àcid ascòrbic 0.5mM. Les mesclen 1:1 just abans d'usar.
- Tampó Krebs-Ringer fosfat (KRP)
- Solució TBA: 74mg d'àcid tiobarbitúric + 28,94mL aigua Milli-Q + 1.06mL d'àcid perclòric al 60%.

Assaig• **incubacions**

En primer lloc es prepara la suspensió microsomal (AdvanCell, Barcelona, Spain) a una concentració de 1mg/mL en tampó KRP, pH 7.2. 180µL de suspensió microsomal es pretracten amb 2µL de diferents concentracions del compost del qual volem analitzar la capacitat antioxidant, durant 15minuts a 37°C en agitació orbital. Seguidament, s'addiciona 20µL de solució de FeSO₄-Ascòrbic i s'incuba durant 40minuts a 37°C, perquè tingui lloc la peroxidació lipídica. Després de l'incubació, es mesclen 750µL de solució TBA amb 100µL d'extractes microsomals i s'escalfa a 95°C durant 1h en una bany de sorra. Durant aquest temps es produeix la reacció entre el MDA i el TBA per donar l'adducte MDA·2TBA. Les mostres es deixen refredar durant 10 minuts en gel i es fa un pas de centrifuga durant 5minuts a 12000 rpm.

• **test TBARS**

El procediment analític per a la determinació del compost MDA·2TBA es porta a terme segons va descriure Bird et al. (1983).

Instrument:	HPLC
Columna:	4.6 x 150mm C18 (5µm, Terra, MS)
Solució d'elució:	solució 52% d'àcid fòrmic 50mM/ trietilamina, 48% metanol, pH 6
Programa:	1ml/min, λ = 532nm

És necessari que les mostres es trobin al voltant de pH 6 abans de ser injectades a la columna. Per això es neutralitza 200µL de cada mostra amb NaOH 0,7M i es comprova el pH amb paper indicador. És important que cada mostra es porti a pH 6 i s'analitzi immediatament, doncs l'adducte MDA·2TBA és molt inestable a pH6.

Després de l'anàlisi cromatogràfic, s'enregistra el valor de l'àrea del pic corresponent al adducte i s'aplica la següent relació per calcular el % d'inhibició:

$$\% \text{ Inhibició} = \{1 - (A_{\text{mostra}} - A_{\text{blanc}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blanc}})\}$$

on A_{blanc} és una mostra sense tractar amb FeSO₄ i A_{control} és la mostra sense compost antioxidant.

5.4. MESURA DE L'OXIDACIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇANT LA TÈCNICA OXIBLOT

Aquesta tècnica ens permet mesurar els nivells d'oxidació de les proteïnes de la mostra. Les espècies reactives d'oxigen modifiquen les cadenes laterals dels aminoàcids metionina, histidina i tirosina i formen ponts disulfur en els grups tiol de les cisteïnes. Les oxidacions catalitzades per metalls introdueixen grups carbonils

(aldehids i cetones) als residus de lisina, arginina, prolina i treonina de manera específica (Stadtman, 1992).

Per detectar les modificacions de les proteïnes per acció dels ROS, els grups carbonils de les proteïnes de la mostra es derivatitzen a 2, 4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) fent-los reaccionar amb 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Les proteïnes derivades amb DNP es separen en un gel electroforesi i es transfereixen a una membrana de PVDF (veure Western Blot). S'incuba la membrana amb un anticòs primari específic per DNP i la detecció es realitza segons el protocol de Western Blot.

Protocol

Els diferents reactius utilitzats en aquest assaig són subministrats en l'*OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit*. 20µg de proteïna es desnaturalitzen afegint igual volum de SDS 12% . Les mostres es derivatitzen addicionant 10µL de Solució 1x DNPH. S'incuben els tubs durant 15 minuts a temperatura ambient perquè tingui lloc la reacció i a continuació la reacció s'atura afegint 7,5µL de Solució de neutralització. Després de la derivatització, addicionem 1µL de β-mercaptoetanol a cada mostra i les fem córrer en un gel d'acrilamida al 8%. Després de la transferència les membranes s'incuben amb l'anticòs primari *Rabbit Anti-DNP antibody* diluït 1:150 en T-TBS durant una hora a temperatura ambient. Després es fan 2 rentats de 15 minuts amb T-TBS i s'incuba amb l'anticòs secundari *Goat Anti-Rabbit IgG (HRP-conjugated)* diluït 1:300 durant 1h a temperatura ambient. La membrana es revela com s'especifica al protocol de Western-Blot.

6. SILENCIAMENT GÈNIC: ARN D'INTERFERÈNCIA (RNAi)

L'ARN d'interferència (RNAi) és un mecanisme de regulació de l'expressió gènica en el que una molècula de doble cadena d'ARN inhibeix l'expressió dels gens amb complementarietat de seqüència nucleotídica. El RNAi és un mecanisme intrínsec de la cèl·lula per regular l'expressió gènica, especialment durant el desenvolupament.

La via de l'ARN i s'inicia amb l'enzim Dicer, que talla les dobles cadenes d'ARN en fragments curts de 20-25 parells de bases. Una de les dues cadenes, l'anomenada *guide strand*, s'incorpora en el complex *RNA-induced silencing complex* (RISC) i s'aparella amb la molècula d'ARN missatger de seqüència complementaria. Aleshores l'enzim *argonaute*, el component catalític del complex RISC, indueix la degradació del mRNA.

Els fragments curts d'ARN s'anomenen *microRNA* (miRNA) quan són transcrits a partir del propi genoma cel·lular i *small interfering RNA* (siRNA) quan provenen de fonts exògenes. Els siRNA solen tenir una longitud de 19-21 nucleòtids amb dos nucleòtids que sobresurten als extrems 3'.

L'ús de siRNAs per silenciar l'expressió d'un gen determinat ha revolucionat l'estudi de la funció gènica en cultius cel·lulars i en organismes vius.

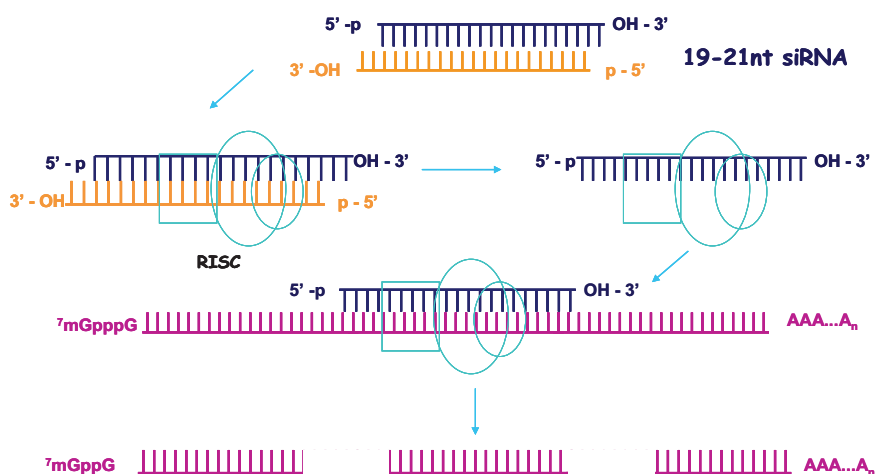


Figura 26. Mecanisme de RNA d'interferència.

Abans d'iniciar els experiments s'ha optimitzat l'eficiència de la transfecció utilitzant un ARN no específic fluorescent. S'ha treballat amb diferents densitats cel·lulars, concentracions de siRNA i temps de transfecció fins aconseguir les condicions òptimes que assoleixen un major grau de silenciament.

Es va estandaritzar un protocol de siRNA que s'ha utilitzat en els diferents treballs d'aquesta tesi. Les cèl·lules s'utilitzen al 60-70% de confluència i la concentració de siRNA ha estat 100nM. En primer lloc, l'oligofectaminaTM (Invitrogen) diluïda en Opti-MEM I reduced Serum Medium (Invitrogen) es mescla amb el siRNA perquè tingui lloc la formació dels complexos lípid-siRNA. S'incuben els complexos 15 minuts a temperatura ambient i s'afegeixen a la placa de cultiu de manera que la concentració d'oligofectamina en el medi de cultiu sigui 4µL/mL. Els siRNA i l'oligofectamina es mantenen en el medi en tot moment després de la transfecció i fins que es recullen les cèl·lules.

Alhora de portar a terme els experiments, també s'ha emprat ARN sense homologia per cap gen com a control negatiu i els controls s'han tractat amb oligofectamina sola. Finalment ha estat necessari quantificar l'efecte del silenciament. El knock down de la proteïna es pot quantificar a nivell de missatger, mitjançant Real-Time PCR, o a nivell de proteïna per Western-Blot. L'efecte de silenciament a nivell de missatger es pot observar a partir de 48h, en el cas de els nivells de proteïna dependrà del turnover de cada proteïna. Pels nostres siRNAs s'ha observat un òptim nivell d'inhibició de l'expressió entre 72h i 96h.

En aquesta tesi s'ha utilitzat siRNAs específics per al silenciament de diferents proteïnes:

proteïna	espècie	N o m d e l p r o d u c t e	Núm. Cat.	Casa comercial
nsRNA	rata, ratolí, humà	Control (non-sil.) siRNA	1022076	Qiagen
p21	ratolí	P21 Cip1/Waf1 mouse pub siRNA	1024837	Qiagen
ERK	ratolí, humà	Mn/Hs_MAPK1 control siRNA	1022564	Qiagen
Stat1	ratolí	Stat1 SureSilencing™ siRNA kit	RM-1171	SuperArray
Jak2	ratolí	Jak2 SureSilencing™ siRNA kit	RM-1164	SuperArray
GAPDH	ratolí	GAPDH SureSilencing™ siRNA kit	RM-0057	SuperArray
RNA fluoresc ent	rata, ratolí, humà	siGLO RISC-Free siRNA (Rhodamine)	D-001600-01	Dharmacon
nsRNA	rata, ratolí, humà	ON-TARGET plus siCONTROL	D-001810-01	Dharmacon
p21	ratolí	ON-TARGETplus SMARTpool, mouse, NM_007669	J-0588636- 05	Dharmacon
Jak2	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rat jak2, NM_031514	L-088340-01	Dharmacon
Jak1	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rat jak1, XM_342872	L-101621-01	Dharmacon
IFN-β	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rat IFNB1, NM_019127	L-094752-01	Dharmacon
TLR4	rata	ON-TARGETplus SMARTpool, rat TLR4, NM_019178	L-090819-00	Dharmacon