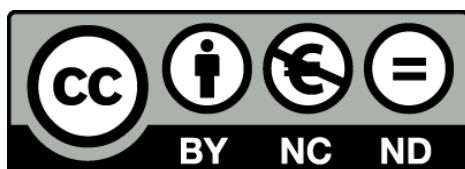


Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

M^a Lluïsa Miró Martí



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals

Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia

Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

Programa de doctorat: Biotecnologia

Directors:

Dr. Miquel Moretó Pedragosa,

Catedràtic de Fisiologia

Dra. Anna Pérez Bosque,

Professora Associada de Fisiologia

Coordinadora del programa de doctorat:

Josefa Badia Palacin

M^a Lluïsa Miró Martí

Barcelona, 2012

III. MATERIALS I MÈTODES

1. MANTENIMENT DE LES LÍNIES CEL·LULARS

1.1. CULTIUS CEL·LULARS

Per a la realització d'aquesta tesi doctoral es van emprar dues línies cel·lulars que van ser comprades a ATCC® (American Type Culture Collection, Virginia, EUA). La línia cel·lular **T84** amb fenotip de colonòcit, va arribar al passatge 52 i es va fer créixer en medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12), suplementat amb un 5% de sèrum fetal boví (FBS, *Fetal Bovine Serum*) i HEPES 15 mM. L'altra línia cel·lular que es va utilitzar va ser la **CCD-18Co** que va arribar al passatge 6. Aquesta línia presenta morfologia de miofibroblast i es va fer créixer en medi *Minimal Essencial Medium* (MEM), al qual es va afegir un 10% de FBS, aminoàcids no essencials a 0,1 mM, piruvat sòdic a 1 mM i bicarbonat sòdic a 17,8 mM. A ambdós medis se'ls va afegir penicil·lina (100 UI/mL) i estreptomicina (100 µg/mL). Tant els medis com les solucions van ser subministrats per Gibco-Invitrogen (Nova York, EUA).

Ambdues línies cel·lulars es van expandir i es van mantenir en flascons de 75 i 175 cm² i el medi es va renovar cada dos dies. El color del medi de cultiu ens dóna informació sobre el creixement cel·lular, per això els medis contenen un indicador de pH (roig fenol) que vira a groc en condicions d'acidesa i a fúcsia en condicions d'alcalinitat. Si el medi vira cap a color groc és indicatiu que hi ha una acumulació de productes degut al creixement cel·lular, per tant caldrà canviar el medi. Per altra banda, si es produeix un viratge a fúcsia és indicatiu de falta de CO₂. Sempre ambdues línies es van incubar sota condicions controlades a l'incubador (Thermo Scientific Inc., California, EUA), a una temperatura de 37°C i atmosfera d'aire humidificat amb un contingut del 5% en CO₂. Es va treballar en cabina de flux laminar vertical de classe II (Telstar, Espanya). Al llarg de tot l'estudi es van utilitzar les cèl·lules CCD-18Co entre els passatges 12 i 15, i les cèl·lules T84 entre els passatges 57 i 68.

1.2. CONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Després de tripsinitzar i efectuar el recompte cel·lular, es van preparar els criovials amb 1 mL de medi de congelació en el qual hi havia 10⁶ cèl·lules. El medi de congelació es va preparar amb el corresponent medi, un 20% de FBS i un 5% de dimetilsulfòxid (DMSO, *Dimethyl sulfoxide*; Sigma, Missouri, EUA). El DMSO és un crioconservant que evita la formació de cristalls a la

temperatura de -195°C (nitrogen líquid) i per tant redueix la mortalitat cel·lular. Els vials van seguir un procés de congelació gradual des de -20°C fins al seu dipòsit en nitrogen líquid.

1.3. DESCONGELACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

Per descongelar les cèl·lules es van agafar les alíquotes de cada línia cel·lular que estaven conservades en nitrogen líquid i es van descongelar al bany a 37°C . Aquest procés es va realitzar amb la màxima rapidesa, ja que el DMSO a temperatura ambient és altament tòxic. Un cop el vial va ser descongelat es va traspasar el seu contingut a un tub on hi havia 8 mL del medi corresponent. Tot seguit, es va centrifugar durant 7 min a 300g i a 25°C (Megafuge 2.0R, Heraeus, Alemanya) per tal d'eliminar les restes de DMSO. Es va eliminar el sobrenedant, es va resuspendre el precipitat cel·lular amb 2 mL de medi i es van desfer els agregats cel·lulars. Aquesta suspensió cel·lular es va portar fins a un volum de 20 mL que es va sembrar en un flascó de 75 cm^2 . Les cèl·lules van créixer fins a una confluència de 80-90% i es va procedir a tripsinitzar-les.

1.4. TRIPSINITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

La tripsinització permet separar les cèl·lules que creixen adherides mitjançant l'enzim tripsina, que trenca tant les unions intercel·lulars com les unions al substrat, i s'obté una suspensió cel·lular. La presència d'un quelant de calci, en aquest cas d'EtilenDiaminoTetraAcetat (EDTA) a la solució de tripsina optimitza el procés de disgregació perquè actua com a quelant de metalls que podrien inhibir l'activitat de l'enzim. El procediment que es va seguir va consistir en aspirar tot el medi del flascó i realitzar dos rentats amb tampó fosfat salí estèril (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) per eliminar les restes de l'FBS present en el medi, ja que la seva presència inhibeix l'efecte de la tripsina. A continuació es va aspirar el PBS i es va afegir la solució de tripsina prèviament temperada a 37°C i es va distribuir homogèniament per tota la superfície. Transcorreguts 7 min a 37°C , es va afegir medi dins el flascó per tal que l'FBS inhibís l'acció de la tripsina i s'evités la destrucció cel·lular. Tot aquest medi es va traspasar a un tub i es va centrifugar durant 7 min a 300g i a 25°C . Es va descartar el sobrenedant en el qual hi havia la tripsina i es va resuspendre el precipitat cel·lular per procedir al recompte cel·lular.

1.5. RECOMPTE I SEMBRA CEL·LULAR

El recompte cel·lular es va dur a terme per determinar la quantitat de cèl·lules i, així, assegurar que teníem la quantitat necessària de cèl·lules amb una bona viabilitat per realitzar l'experiment. Les cèl·lules es van comptar en un microscopi de fluorescència sota llum U.V. Per discriminar les cèl·lules vives de les mortes es va utilitzar una solució de tinció formada per dues substàncies fluorescentes, taronja d'acridina 3 µmol/L (AO, *Acridine Orange*; Merck, Alemanya) i bromur d'etidi 50 µmol/L (EBr, *Ethidium Bromide*; Sigma, Missouri, EUA) en PBS. El colorant AO és capaç d'incorporar-se dins les cèl·lules vives, mitjançant un transport actiu, i tenyir de color verd els nuclis; mentre que el colorant EBr penetra a través de les membranes cel·lulars danyades per difusió passiva i tenyeix els nuclis de les cèl·lules mortes de color taronja.

La fórmula utilitzada per realitzar el recompte cel·lular és la següent:

$$\text{n}^\circ \text{ cèl·lules} / \mu\text{L suspensió} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cèl·lules vives} \times \text{dilució}}{\text{n}^\circ \text{ quadres comptats}} \times 160$$

On 160 és el número de quadres que ocupa 1 µL de la solució.

Un cop conegut el recompte, les cèl·lules es van sembrar a la concentració adequada per a cada experiment. Així doncs, depenent de les mostres que s'havien d'obtenir es va sembrar en els següents tipus de recipients cel·lulars:

- **Flascons.** Van ser els recipients en els que es va realitzar l'expansió de les línies cel·lulars. Són recipients de cultiu de poliestirè amb una superfície de creixement de 25, 75 o 150 cm² (Figura 3.1.A). El volum final del medi d'incubació va ser de 8, 25 i 40 mL pels flascons de 25, 75 o 150 cm² de superfície de creixement, respectivament.
- **Clusters o plaques.** En aquests recipients es van dur a terme els experiments d'ambdues línies cel·lulars. Es van utilitzar plaques amb diferent nombre de pous en funció de les mostres que s'havien d'obtenir. Així doncs, es va treballar amb plaques de 6, 12 o 24 pous amb una superfície de creixement de 9,6, 3,5 i 1,9 cm²,

respectivament. El volum final de medi de cultiu va ser de 4, 2 i 1 mL per les plaques de 6, 12 i 24 pous, respectivament (Figura 3.1.B).

- *Transwells*[®] o filtres. Aquests sistemes estan indicats per realitzar estudis de transport i/o permeabilitat. Les cèl·lules creixen sobre un filtre que permet la discriminació de dos compartiments, l'apical i el basolateral. Es van emprar plaques de 6 pous amb un suport permeable o filtre de polièster amb un porus de 0,4 µm de diàmetre amb una superfície de creixement de 4,5 cm². El volum del medi de cultiu va ser de 1 mL i 2,5 mL en el compartiment apical i basolateral, respectivament (Figura 3.1.C).

Tot el material de plàstic emprat en els experiments i en les expansions cel·lulars va ser tractat per facilitar l'adhesió cel·lular. El material va ser subministrat per la casa comercial NUNC[®] (Dinamarca).

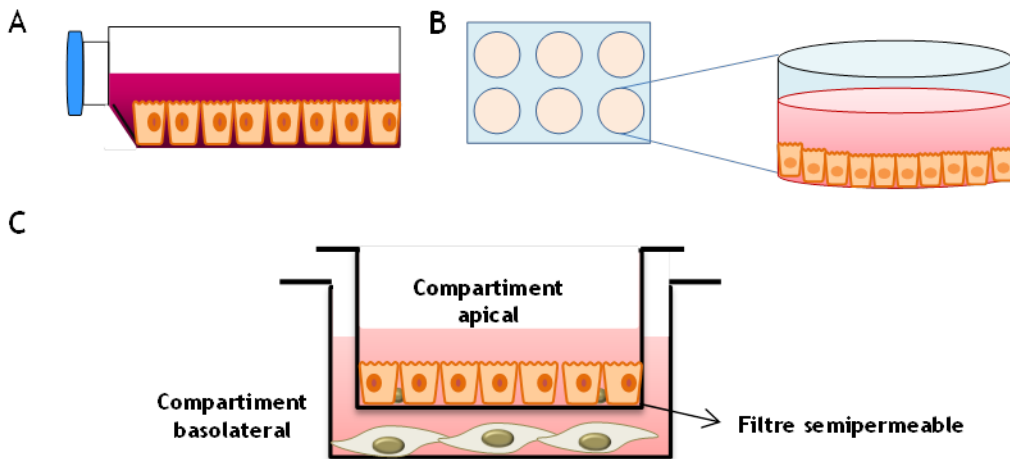


Figura 3.1. Esquema representatiu dels diferents recipients emprats en cultius cel·lulars. A) Flascó en que a la part inferior hi queden adherides les cèl·lules formant una monocapa i totes elles queden cobertes pel medi de cultiu. B) Imatge representativa d'una placa de 6 pous, on al fons dels pous hi ha les cèl·lules enganxades que quan arriben a la confluència formen una monocapa compacta. C) Imatge representativa d'un *Transwell*[®], es pot veure que queden separats dos compartiments l'apical (superior) i el basolateral (inferior), separats per un filtre semipermeable.

1.6. DISSENY EXPERIMENTAL

L'aldosterona i la vasopressina es van addicionar de forma directa sobre els miofibroblasts i sobre els colonòcits, i són les condicions ALDO i AVP, respectivament. Es van estudiar variables com la proliferació cel·lular, l'expressió de proteïnes del complex d'unió i l'expressió de diferents factors de creixement. Posteriorment, es va estudiar si la incubació dels colonòcits amb el medi que havia estat en contacte amb els miofibroblasts, medi condicionat (CM, *conditioned medium*), modificava alguna de les variables anomenades anteriorment.

1.6.1. ACCIÓ DIRECTE DE LES HORMONES

Els miofibroblasts **CCD-18Co** es van sembrar $7 \cdot 10^3$ cel/cm² a les plaques de 24 pous o en flasconets de 25 cm². Set dies després es va aplicar el tractament hormonal corresponent. En el cas dels colonòcits **T84** es van sembrar 10^5 cel/cm² en plaques de 6 pous. Transcorreguts 15 dies, les cèl·lules van formar una monocapa compacta i es va procedir a aplicar el tractament hormonal.

El tractament hormonal es va dur a terme en absència de FBS, per això, 24 h prèvies a l'addició del tractament, es va canviar el medi d'incubació per un altre que no tingués FBS. La durada del tractament va ser entre 18 h i 48 h en funció de les mostres que s'havien d'obtenir. A la **figura 3.2** s'hi pot veure un esquema del disseny experimental seguit per cada una de les línies cel·lulars.

En aquest treball s'ha estudiat l'efecte que té l'aldosterona i la vasopressina sobre colonòcits i sobre miofibroblasts humans. Així doncs, es pot diferenciar dos grans apartats; el que permet reproduir un model d'hiperaldosteronisme i un altre que permet repetir un model de deshidratació.

En el **model d'hiperaldosteronisme**, l'hormona d'estudi és l'aldosterona i les condicions amb les que es va treballar són les següents:

- **CTL**. Va ser tractat amb el mateix vehicle en què es va dissoldre l'hormona, és a dir, es va afegir etanol 0,2% v/v.

- **ALDO.** L'aldosterona va ser subministrada per Sigma (Missouri, EUA). Es va dissoldre en etanol i es va usar a una concentració final de 100 nM. L'etanol final va ser del 0,2% v/v.
- **ALDO+SPI.** Espironolactona (SPI, *Spironolactone*) inhibidor de l'MR es va comprar a Sigma (Missouri, EUA) i es va dissoldre en etanol a 10 µM. L'inhibidor es va afegir 45 min abans d'afegir-hi l'aldosterona i el percentatge final d'etanol va ser del 0,2% v/v.
- **SPI.** Es va afegir l'inhibidor que es va dissoldre en etanol a una concentració final de 10 µM. En aquest cas es va afegir més etanol per aconseguir un percentatge final d'etanol del 0,2% v/v igual a les altres condicions.

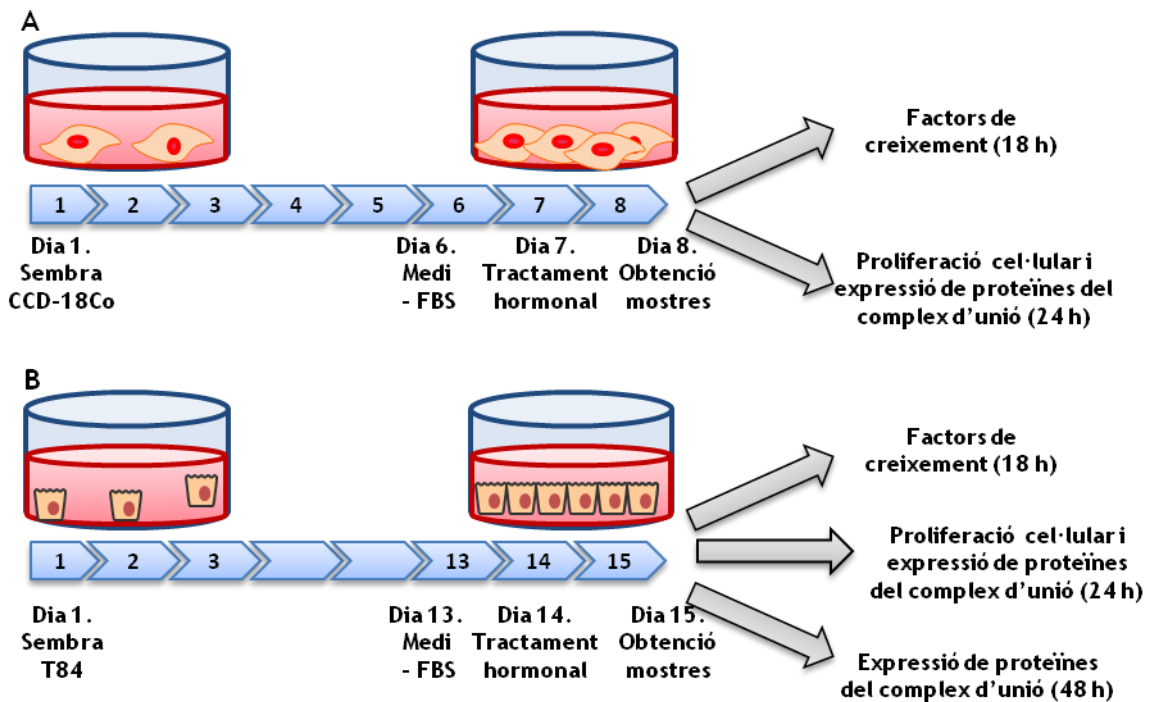


Figura 3.2. Esquema representatiu del disseny experimental utilitzat pels miofibroblasts (A) i pels colonòcits (B). A) Els miofibroblasts es van sembrar en plaques i cada dos dies el medi es va anar renovant. El dia 6 el medi es va canviar per un que no hi hagués la presència de FBS en el medi de cultiu i al cap de 24 h es va aplicar el corresponent tractament hormonal. Aquest es va deixar més o menys temps en funció de les mostres que s'havien d'obtenir. És a dir, per 18 h per realitzar l'estudi dels factors de creixement i 24 h per estudiar la proliferació cel·lular i l'expressió de proteïnes del complex d'unió. B) Els colonòcits es van sembrar en plaques i cada dos dies es va renovar el medi de cultiu. El dia 13 es va canviar el medi per un que no tingués FBS i es va deixar 24 h. Transcorregut aquest temps es va afegir el tractament hormonal i es va deixar 18 h per l'estudi dels factors de creixement, 24 h per estudiar la proliferació cel·lular i en el cas de l'expressió de proteïnes del complex d'unió va ser 24 h en alguns casos i en d'altres 48 h.

En el model de deshidratació l'hormona d'estudi és la vasopressina. Les condicions amb les que es va treballar es mostren a continuació:

- **CTL.** En aquest cas es va afegir-hi etanol 0,1% v/v, el mateix que a les altres condicions.
- **AVP.** La vasopressina 10 nM (Sigma, Missouri, EUA) es va dissoldre en aigua i es va addicionar etanol 0,1% v/v.
- **AVP+MIX INHIB.** Es van emprar dos inhibidors dels dos receptors de la vasopressina, al mateix temps; el *manning compound* (Bachem, Suïssa) que es va dissoldre en aigua i el tolvaptan (donació de l'Otsuka Pharmaceutical Co., Japó), que es va dissoldre en etanol, ambdós a una concentració final de 1 μ M. Tots dos inhibidors es van afegir 45 min abans d'afegir l'hormona. El percentatge final d'etanol en aquesta condició va ser del 0,1% v/v.
- **MIX INHIB.** Es van utilitzar els dos inhibidors dels receptors de la vasopressina al mateix temps; el *manning compound* i el tolvaptan, tots dos a 1 μ M. El percentatge final d'etanol en aquesta condició va ser del 0,1% v/v.

Un cop es van caracteritzar els efectes de les hormones en les condicions esmentades, es va estudiar quins mediadors podien desencadenar-los. Els principals mediadors implicats es van afegir de forma exògena i es va analitzar els seus efectes sobre la proliferació cel·lular. Va ser el cas del factor de creixement epidèrmic (EGF, *Epidermal Growth Factor*, Preprotech, Regne Unit) o la isoforma A del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFA, *Platelet derived growth factor*, Preprotech, Regne Unit) que es van dissoldre en aigua i es va treballar a unes concentracions finals de 50 ng/mL i 10 ng/mL, respectivament. Per inhibir l'efecte d'aquest factors es van utilitzar anticossos específics contra l'EGF (α -EGF, Preprotech, Regne Unit) o contra el PDGFA (α -PDGFA, Preprotech, Regne Unit) que es van emprar a 0,5 μ g/mL i a 0,1 μ g/mL, respectivament.

Per estudiar amb més profunditat el mecanisme d'acció de cada una de les hormones també es van usar inhibidors de receptors, com és l'AG1478 (inhibidor del receptor del EGF) o l'AG1296 (inhibidor del PDGFA). Aquests dos inhibidors es van comprar a Sigma (Missouri, EUA) i es van dissoldre en DMSO i metanol a proporció 1:1, i la concentració final de treball va ser de 5 μ M. A més, es va estudiar si les vies com la PI3K/AKT o la via Ras/Raf/MAPK participaven en la proliferació cel·lular dels CCD-18Co quan eren tractats amb les hormones. Per poder veure si la

via estava involucrada es va treballar amb inhibidors d'alguns punts de les cascades com PD98059 (inhibidor de la MEK 1) i el LY294002 (inhibidor del PI3K). Aquests inhibidors van ser subministrats per Sigma (Missouri, EUA) i es van dissoldre en DMSO a una concentració final de 10 μM . El percentatge final de DMSO en aquestes condicions va ser del 0,1% v/v.

Tots aquests inhibidors o anticossos bloquejadors es van afegir en el medi de cultiu 45 min abans d'afegir-hi l'hormona corresponent.

1.6.2. ACCIÓ MEDI CONDICIONAT (CM)

El medi condicionat (CM) va estar en contacte amb els miofibroblasts durant 24 h es va recollir i es va aplicar sobre els colonòcits.

Així doncs, els miofibroblasts es van fer créixer en flascons de 25 cm^2 . Al cap de 7 dies es va arribar a la confluència del 90-95% i es va aplicar el tractament corresponent segons les condicions del model d'hiperaldosteronisme o les del model de deshidratació. Transcorregudes 24 h, es va recollir aquest CM i es va incubar a diferents temps sobre els colonòcits. A fi d'obtenir àcid ribonucleic (RNA; *Ribonucleic Acid*) per l'anàlisi dels factors de creixement la incubació va ser entre 18 h i 24 h, per l'estudi de l'expressió de les proteïnes del complex d'unió entre 24 h i 48 h i per la realització dels estudis de la proliferació cel·lular 24 h. A la **figura 3.3** hi ha representat el disseny que es va seguir.

La utilització del CM dels miofibroblasts associava l'efecte observat a canvis produïts per l'hormona estudiada, però si es volia aprofundir amb més detall quin component o element del medi era responsable de l'efecte observat en els colonòcits es va haver de modificar el CM dels miofibroblasts.

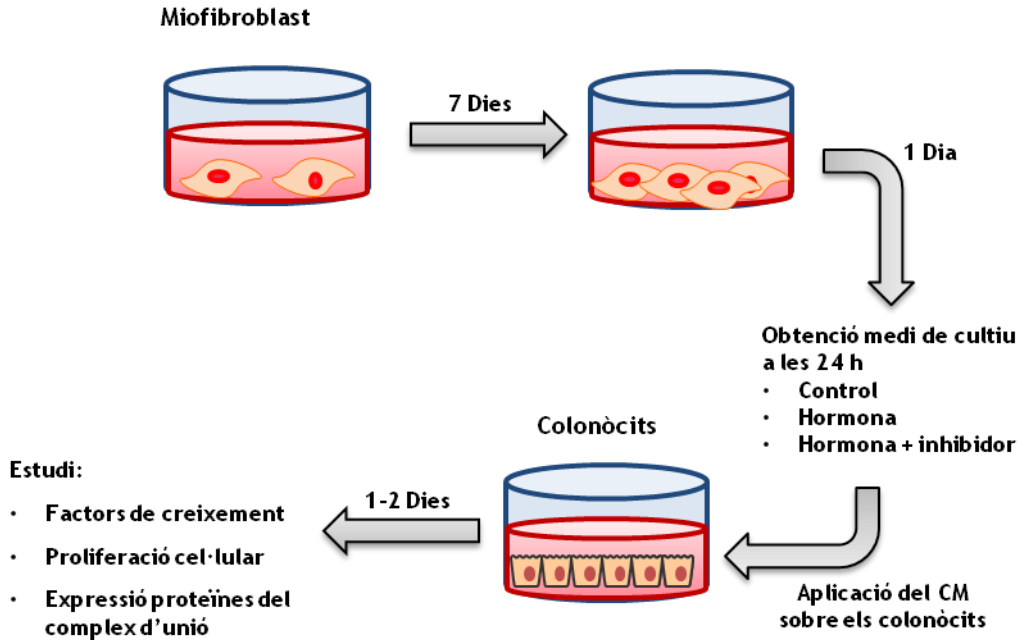


Figura 3.3. Esquema representatiu del disseny experimental sobre els miofibroblasts i obtenció del medi condicionat i aplicació sobre els colònocits. Els miofibroblasts es van sembrar i al cap de 6 dies es va aplicar el tractament hormonal corresponent durant 24 h. Aquest medi es va recollir en diferents tubs segons el tractament que havien rebut: Control, Hormona o Hormona més inhibidor. Aquest medi es va temperar i es va aplicar sobre els colònocits que feia 14 dies que estaven sembrats. Aquest medi condicionat (CM) es va deixar 24 h o 48 h depenent de les mostres que van obtenir. Es a dir, es va deixar 18 h per l'estudi dels factors de creixement, 24 h per estudiar la proliferació cel·lular i en el cas de l'expressió de proteïnes del complex d'unió va ser 24 h en alguns casos i en d'altres 48 h.

1.6.2.1 MODEL D'HIPERALDOSTERONISME

Transcorregudes 24 h del tractament amb els CCD-18Co, es va recollir el CM i es va agrupar en tubs segons els tractaments que havien rebut, que van ser: Control, ALDO i ALDO+SPI. En el model d'hiperaldosteronisme es va treballar amb les següents condicions:

- **CM-CTL**, la que es va mantenir tal i com s'havia recollit.
- **CM-EGF**, que se li va addicionar de forma exògena l'EGF que es va dissoldre en aigua i es va utilitzar a una concentració final de 50 ng/mL.
- **CM-ALDO**, que no se li va fer cap modificació.

- **CM-ALDO+ α -EGF**, en aquest CM se li va afegir l'anticòs específic de l'EGF que es va emprar a una concentració final de 0,5 μ g/mL.
- **CM-ALDO+AG1478**, l'AG1478 es va dissoldre a una concentració final de 5 μ M.
- **CM-ALDO+SPI**, que es va aplicar tal i com es va recollir dels miofibroblasts.

1.6.2.2 MODEL DE DESHIDRATACIÓ

A continuació es mostren les condicions que es van restablir pel model de deshidratació:

- **CM-CTL**, es va mantenir tal i com s'havia recollit.
- **CM-PDGFA**, que se li va addicionar de forma exògena el PDGFA que es va dissoldre en aigua i es va treballar a una concentració final de 10 ng/mL.
- **CM-AVP**, que no se li va fer cap modificació.
- **CM-AVP+ α -PDGFA**, en aquest CM se li va afegir l'anticòs neutralitzant del PDGFA (α -PDGFA, Preprotech, Regne Unit) que es va emprar a una concentració final de 0,1 μ g/mL.
- **CM-AVP+AG1296**, l'AG1296 es va dissoldre a una concentració final de 5 μ M.
- **CM-AVP+MIX INHIB**, que es va aplicar tal i com es va recollir dels miofibroblasts.

Així doncs, a la **figura 3.4.** es pot veure esquematitzat com es van distribuir aquestes condicions de CM que es van aplicar sobre els colonòcits. Un cop aquest CM va estar preparat, es va incubar al bany 37°C durant 10 min i, posteriorment, es va aplicar sobre els colonòcits. La incubació amb el CM va estar entre 18 h i 48 h en funció a les mostres que s'havien d'obtenir.

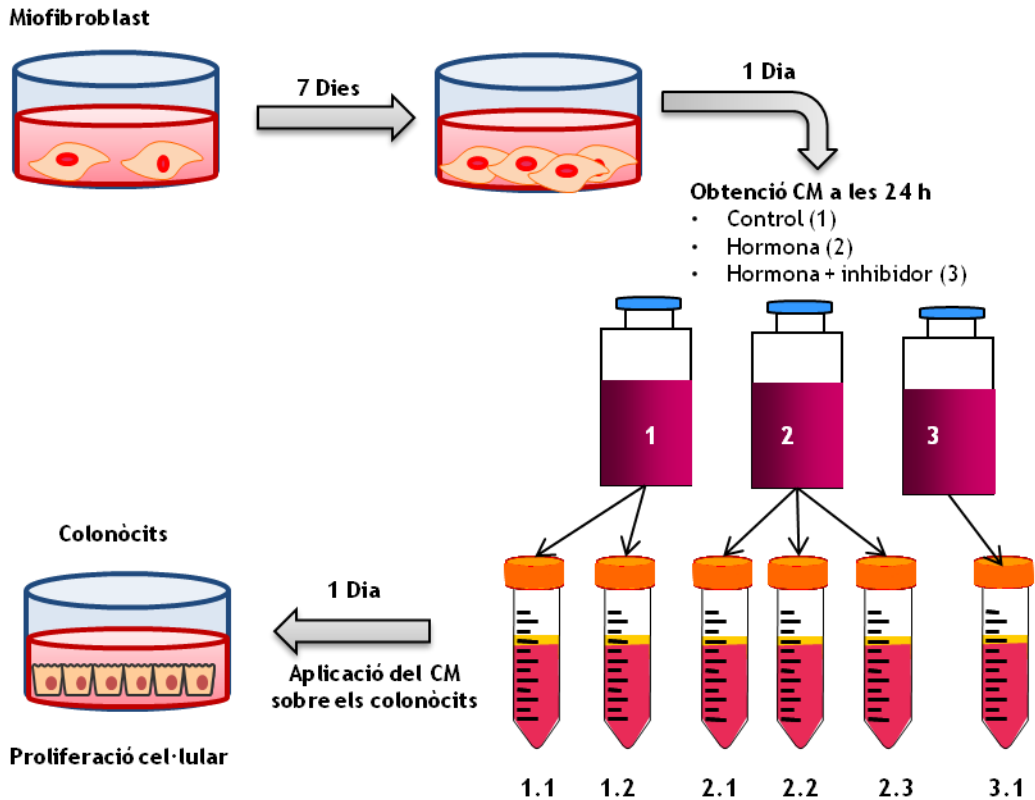


Figura 3.4. Disseny experimental de l'obtenció del medi condicionat dels miofibroblasts i aplicació sobre els colonòcits. El medi obtingut dels CCD-18Co estava format per la condició CTL (1), la condició tractada amb l'hormona (2) i la condició tractada amb l'hormona amb el corresponent inhibidor (3). La condició CTL es va subdividir en dos, un que es va deixar sense fer cap modificació (1.1) i altre se li va afegir exògenament el factor de creixement en estudi (1.2). De la condició tractada amb l'hormona (2) en van sortir 3 condicions: condició sense cap modificació (2.1), la segona condició era l'hormona més anticòs neutralitzant del factor de creixement implicat (2.2) i la tercera condició se li va addicionar l'inhibidor del receptor implicat (2.3). En el cas de la condició tractada amb l'hormona més inhibidor no es va realitzar cap modificació (3.1). Les sis condicions es van incubar 24 h o 48 h sobre els colonòcits.

2. EXPERIMENTS IN VIVO

Per tal de reproduir els efectes observats *in vitro* en models *in vivo*, es va utilitzar un model d'hiperaldosteronisme secundari i amb un model de deshidratació en rata.

2.1. ANIMALS

Per realitzar aquest treball es van utilitzar rates mascles de la soca Sprague-Dawley (Harlan Interfauna Ibèrica, Espanya). Durant tot el període experimental, els animals es van mantenir sota condicions òptimes de temperatura (18-22°C) i humitat relativa (55%), així com també amb cicles programats de llum i fosc de 12 h en el Servei d'Estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els protocols utilitzats en l'estudi van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona, seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA, Guidelines for ethical care and use of animals, 1995).

2.2. DIETES

Durant tot el període experimental els animals van tenir accés *ad libitum* tant a l'aigua de beguda com al pinso. El pinso va ser blat i ordi en proporció 1:1, de manera que els animals van rebre una dieta equilibrada amb tots els nutrients necessaris però amb baix contingut de Na⁺. La ingesta de Na⁺ d'aquests animals es va modificar amb la quantitat de NaCl que hi havia a l'aigua de beguda, de manera que es va poder distingir dos grups experimentals:

- **Tractament amb un alt contingut de Na⁺ (HS, High sodium).** Es va utilitzar aigua desionitzada per dissoldre una solució de NaCl de 150 mM.
- **Tractament amb un baix contingut de Na⁺ (LS, Low sodium).** Es va emprar aigua desionitzada per dissoldre una solució de NaCl de 150 µM.

2.3. DISSENY EXPERIMENTAL

2.3.1. MODEL D'HIPERADOSTERONISME SECUNDARI

Aquest model va ser descrit per Moretó *et al.*, (2005) i es caracteritza perquè els animals incrementen la concentració plasmàtica de l'aldosterona en resposta a una baixa ingesta de Na^+ . Les rates van ser distribuïdes de forma homogènia respecte el pes i durant 4 dies van rebre un tractament amb HS. Transcorregut aquest temps es van dividir en tres grups:

- **Grup HS**, els animals es van mantenir durant 3 dies més amb el tractament HS.
- **Grup LS**, els animals es van canviar a el tractament LS durant 3 dies més.
- **Grup LS+SPI**, els animals van rebre el tractament LS durant 3 dies més i diàriament se'ls va administrar l'espironolactona. Aquest inhibidor es va donar per via oral a una dosi de 10 mg/kg/dia dissolt en una solució al 25% de propilenglicol.

En la **figura 3.5** hi ha l'esquema de distribució dels animals que van formar part d'aquest model d'hiperadosteronisme secundari.

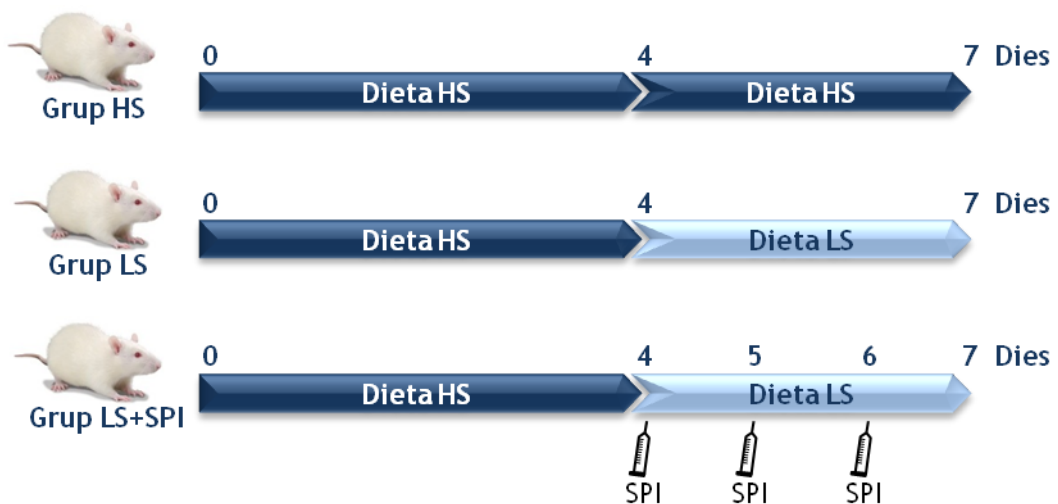


Figura 3.5. Disseny experimental del model d'hiperaldoesteronisme secundari. Els animals del grup HS van rebre el tractament amb alt contingut en Na^+ (HS) durant els 7 dies. Els grups LS i LS+SPI van rebre la dieta HS durant 4 dies i després es va canviar a una dieta amb baix contingut en Na^+ (LS) durant 3 dies. Els dies 4, 5 i 6 els animals del grup LS+SPI van rebre via oral una dosi de 10 mg/kg/dia d'espironolactona (SPI).

2.3.2. MODEL DE DESHIDRATACIÓ

Aquest model és similar a l'anterior però amb algunes modificacions, ja que la finalitat és aconseguir que els nivells plasmàtics de la vasopressina siguin elevats. Per aconseguir-ho cal que els animals tinguin una restricció a l'aigua de beguda el darrer dia experimental tal i com ho va realitzar Cristià *et al.*, (2007). Així doncs, durant 4 dies els animals van rebre un tractament amb HS. Passat aquests dies els animals es van dividir en els següents grups experimentals:

- **Grup HSD**, els animals van rebre el tractament HS durant 3 dies més.
- **Grup LSD**, les rates es van canviar al tractament LS durant 3 dies més.
- **Grup LSD+CAP**, els animals van rebre el tractament LS durant 3 dies però, a més se'ls va administrar per via oral un inhibidor de la síntesi d'aldosterona, el captopril (CAP, Sigma, Missouri, EUA), a una dosi de 65 mg/Kg/dia.
- **Grup LSD+CAP+MIX**, els animals van ser tractats amb LS durant 3 dies i es va administrar el captopril a la mateixa dosi que el grup anterior. A més, aquests animals se'ls va administrar diàriament per via oral el tolvaptan, a una dosi de 5 mg/kg que es va dissoldre amb hidroxipropilmetilcel·lulosa (Sigma, Missouri, EUA), i per via i.p. el *manning compound* a una dosi de 1 µg/kg.

El dia 6 els animals se'ls va restringir l'aigua de beguda durant 24 h. A la **figura 3.6** es pot veure el disseny experimental de forma esquemàtica.

2.4. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

En ambdós models, es va dur a terme un seguiment de l'evolució del pes i del consum de pinso dels animals al llarg del període experimental. Totes les mesures es van realitzar dins de l'estabulari, d'acord amb la normativa vigent. Per evitar variacions degudes al ritme circadiari els animals van ser sacrificats en el mateix rang horari.

El dia del sacrifici, els animals van ser anestesiats per via intraperitoneal amb ketamina (90 mg/kg, Imalgène 1000[®], Merial, França) i xilacina (10 mg/kg, Rompún[®], Bayer, Alemanya) i, posteriorment, se'ls va realitzar una laparotomia que va deixar la cavitat abdominal al

descobert. La mort de l'animal es va produir a causa de la hipovolèmia deguda a l'extracció de sang per punció cardíaca, que es va deixar durant 20 min a temperatura ambient i, tot seguit, es va centrifugar a 960g durant 30 min a 4°C. Un cop es va obtenir el sèrum se li va afegir 10 µL de *còctel inhibidor* (Sigma, Missouri, EUA) i es va guardar a -80°C fins al seu processament. També es va extreure el còlon que es va rentar amb PBS i, posteriorment, es va obrir longitudinalment, i es va raspar la mucosa amb l'ajut de dos portaobjectes. La mostra mucosa es va dividir en diferents eppendorfs i es va congelar amb nitrogen líquid. Tot seguit, es va guardar a -80°C fins el seu posterior processament.

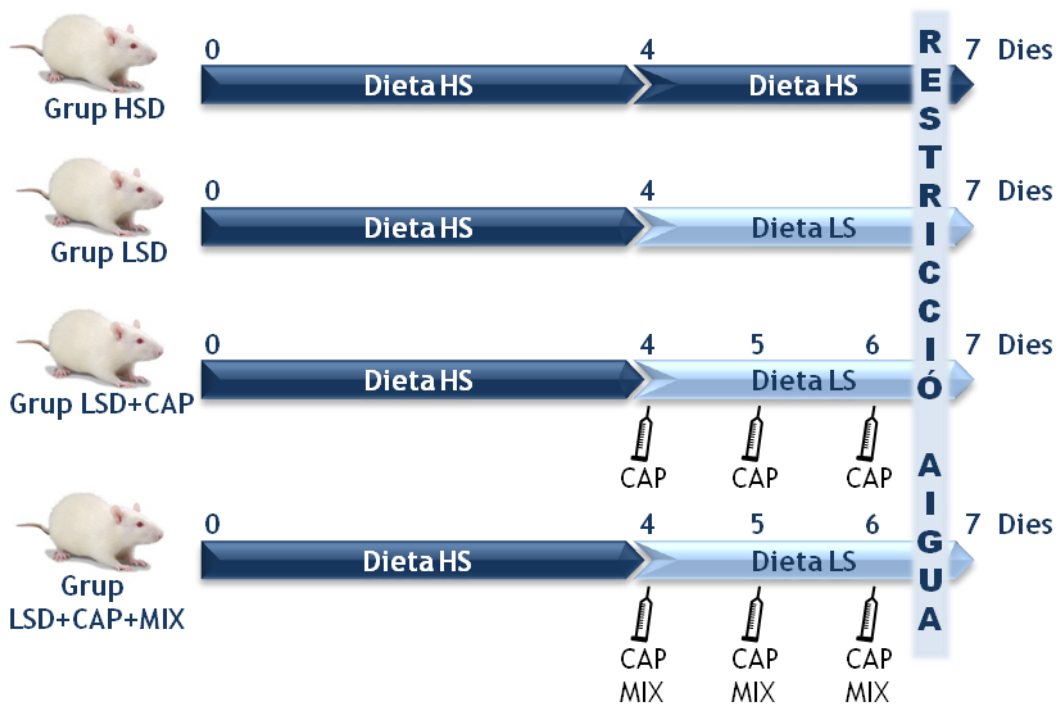


Figura 3.6. Disseny experimental del model de deshidratació. Els animals del grup HSD van rebre el tractament amb alt contingut en Na⁺ (HS) durant els 7 dies. La resta de grups, LSD, LSD+CAP i LSD+CAP+MIX, durant 4 dies van rebre la dieta HS i a partir del quart es van canviar a una dieta baixa en Na⁺ (LS). Els dies 4, 5 i 6 els animals dels grups LSD+CAP i LSD+CAP+MIX van rebre via oral una dosi de 65 mg/kg/dia de captopril (CAP). A més, al grup LSD+CAP+MIX es va administrar via oral el tolvaptan a una dosi 5 mg/Kg i via intraperitoneal el *manning compound* a 1 µg/kg. El dia 6 es va restringir l'aigua de beguda a tots els animals.

3. TÈCNIQUES EMPRADES

3.1. ELECTROFISIOLOGIA

Les propietats elèctriques intestinals es pot analitzar mitjançant les anomenades *cambres d'Ussing*, en honor a la gran contribució que va fer el doctor Ussing en el camp de l'electrofisiologia (Ussing i Zerahn, 1951). Són unes cambres de metacrilat que permeten aplicar diferents tractaments i solucions a cada un dels compartiments; el mucosal i el serosal. Les cèl·lules es mantenen en condicions fisiològiques mitjançant un bany a 37°C, i una carbogenació del medi d'incubació del teixit (Figura 3.7). Dins les cambres, i en contacte amb la solució d'incubació, hi han quatre elèctrodes per fer les mesures elèctriques. Aquests elèctrodes normalment són de clorur de plata, dos dels quals mesuren el potencial i els altres dos mesuren la intensitat de corrent. Els elèctrodes estan connectats a un sistema d'enregistrament i processament de les dades de forma automàtica.

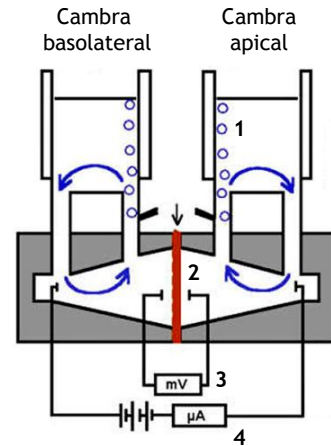


Figura 3.7. Imatge gràfica d'una cambra Ussing. Està formada per dos compartiments el basolateral i l'apical. Hi ha un sistema de carbogenació (1), el teixit que separa les dues cambres (2) i els elèctrodes que mesuren diferència de potencial (3) i el corrent de curt circuit (4).

Tranacorregut el temps del tractament hormonal és van obtenir els *Transwells*[®] sembrats amb cèl·lules T84 i es van acoblar a les cambres d'Ussing (Dipl.-Ing. K. Mußler Scientific Instruments, Alemanya). El muntatge es va realitzar amb la màxima rapidesa i tot seguit es va afegir el medi de Krebs (Taula 3.1) al mateix temps en els dos compartiments de cada cambra. Les cambres estaven connectades a un sistema d'enregistrament (Clamp v.2-14, Dipl.-Ing. K. Mußler Scientific Instruments, Alemanya) que mesura les variables elèctriques: la diferència de potencial (PD, mV), el corrent de curt circuit (ISC, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) i la resistència epitelial (TER, $\text{ohm}\cdot\text{cm}^2$). Un cop tranacorreguts 30 min d'estabilització i quan el registre va ser prou estable es van afegir els diferents reactius per veure la resposta de les cèl·lules T84. A la cambra apical es va afegir l'amilorida 10 μM , que és un inhibidor del transport electrogènic de Na^+ . Una vegada la resposta és estable, es va afegir bumetanida 100 μM a la cambra basolateral, que és un inhibidor del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. L'últim reactiu que es va afegir va ser la

forscolina 10 μM a la cambra apical, que és un inhibidor dels canals de K^+ , potent activador del sistema de l'adenilat ciclasi i de la biosíntesi de l'AMP cíclic.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
KCl	4,7 mM	Sigma
CaCl_2	2,5 mM	Sigma
NaCl	116 mM	Sigma
KH_2PO_4	1,2 mM	Sigma
NaHCO_3	24,8 mM	Sigma
D-Glucosa	11,1 mM	Sigma

Taula 3.1. Solució de Krebs. *Sigma* (Missouri, EUA).

3.2. DETERMINACIÓ DE L'EGF AL MEDI DE CULTIU

Després d'estimular els miofibroblasts amb aldosterona durant 24 h, es va recollir el medi de cultiu per poder determinar la concentració d'EGF amb el kit comercial EGF human kit Flowcytomix (Bender MedSystems®, Austria). Es va realitzar seguint les instruccions del fabricant.

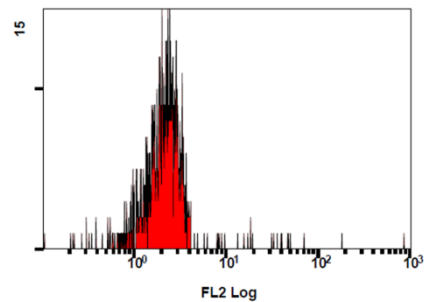
Les concentracions de l'estàndard que es van utilitzar van ser 27, 82, 247, 741, 2222, 6667 i 20000 pg/mL. El volum de mostra que es va afegir als pous va ser de 25 μL , que es va barrejar amb les corresponents esferes de poliestirè conjugades a l'anticòs de captura i amb l'anticòs de detecció conjugat a biotina. Acte seguit, es va incubar durant 2 h a temperatura ambient, amb agitació constant a 300g. El següent pas va ser la incubació amb l'estreptovidina conjugada amb ficoeritrina, que es va mantenir 1 h a temperatura ambient amb agitació. La sensibilitat del kit és de 22,7 pg/mL. Totes les mostres es van processar per duplicat.

Aquest kit consisteix en una sèrie de microsferes de poliestirè espectralment discretes que s'utilitzen per capturar i quantificar molècules solubles. La fluorescència associada a les molècules unides a les microsferes és mesurada per citometria de flux (**Figura 3.8**). Les

partícules d'aquest kit són una sola població de microsfères que estan recobertes d'anticossos de captura específics per a l'EGF. Es va utilitzar un citòmetre de flux FC500-MPL (Beckman Coulter, Califòrnia, EUA) de la Unitat de Citometria de Flux dels serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Els resultats obtinguts amb el kit són comparables als assajos ELISA. La concentració de mostres no conegudes es calculen igual que en un ELISA *sandwich*, és a dir, s'utilitzen concentracions conegudes i interpolant els valors de les mostres no conegudes a la corba estàndard.

Figura 3.8. Histograma de distribució d'una població de microsfères en el canal FL2 d'una mostra representativa. Aquest histograma mostra el nombre de microsfères respecte la intensitat de fluorescència en FL2 (fluorescència associada a l'anticòs de detecció). Retorna valors d'intensitat de totes les microsfères.



3.3. HOMOGENEÏTZACIÓ DE LES MOSTRES

Es coneix com el procés de disrupció d'una cèl·lula o teixit per mitjans mecànics o químics i la dispersió dels seus components en un medi aquós. En aquest treball es van utilitzar mostres de cultius cel·lulars i de teixit animal (veure apartat 2.3.3). A continuació s'explica breument com es va realitzar el procés d'homogenat en cada cas i quin va ser el tampó de lisi emprat.

3.3.1. HOMOGENEÏTZACIÓ MOSTRES CEL·LULARS

Transcorregudes 24 h o 48 h del tractament hormonal corresponent es va procedir a homogeneïtzar les cèl·lules. Primer es va fer un rentat amb PBS i es va afegir el tampó de lisi, que contenia detergents que lisen la membrana cel·lular i faciliten la separació de les cèl·lules (Taula 3.2). Després d'incubar-les amb el tampó de lisi 1 h en fred, les cèl·lules es van desenganxar del plàstic mitjançant raspadors i es va obtenir una suspensió cel·lular que es va traspasar a un eppendorf. Tot seguit, es van homogeneïtzar les mostres amb un homogeneïtzador elèctric durant 40 segons; i posteriorment, les mostres es van centrifugar a

20800g, durant 15 min a 4°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Alemanya). Es va obtenir el sobrenedant del qual es van fer alíquotes. Una de les quals es va utilitzar per determinar la concentració de proteïnes. Les alíquotes es van desar a -80°C fins la seva utilització.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
HEPES pH 7,4	50 mM	Sigma
Tritó X [®] -100	1%	Fluka
Deoxicolat sòdic	0,2%	Sigma
Dodecil sulfat de sodi	0,1%	Bio-Rad
NaCl	150 mM	Sigma
MgCl ₂	1,5 mM	Sigma
EGTA	1 mM	Sigma
<i>Coctail inhibidor de proteases</i>	20 µL/mL	Sigma

Taula 3.2. Tampó de lisi per cultius cel·lulars. *Sigma* (Missouri, EUA); *Fluka* (Suïssa); *Bio-Rad* (Alemanya).

3.3.2. HOMOGENEÏTZACIÓ DE LA MUCOSA DE CÒLON

Les mucoses de còlon provinents dels animals es van homogeneïtzar manualment amb el tampó de lisi (Taula 3.3). L'homogenat es va traspasar a un eppendorf i es va centrifugar a 20800g durant 10 min a 4°C a la centrifuga Eppendorf. El sobrenedant es va dividir en alíquotes i es va conservar a -80°C fins la seva posterior determinació.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
EDTA	0,1 mM	Sigma
Tritó X [®] -100	1%	Fluka
EGTA	0,1 mM	Sigma
<i>Coctail inhibidor de proteases</i>	20 µL/mL	Sigma

Taula 3.3. Composició del tampó de lisi. *Fluka (Suïssa); Sigma (Missouri, EUA).*

3.4. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES

La concentració de proteïnes es va determinar seguint el mètode descrit per Bradford (1976), utilitzant com a estàndard l'albumina sèrica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*; Sigma, Missouri, EUA). Es va emprar el reactiu Bio-Rad[®] (Bio-Rad, Alemanya), que conté Coomassie Brilliant Blue G-250 que en medi àcid es combina ràpidament amb les proteïnes i forma un complex de color blau estable durant aproximadament 1 h. El procediment seguit va ser el mateix per la recta patró que per a les mostres a determinar. Es va preparar una recta patró a partir de la solució mare de BSA 1 mg/mL, i es van fer dilucions progressives amb PBS fins a obtenir diferents concentracions de BSA compreses des de 15,6 fins a 1000 µg/mL. Tot seguit es va preparar el colorant Bio-Rad[®], que es va diluir amb aigua destil·lada a una proporció 1:5 i es va filtrar a través d'un filtre Whatman[®] del número 1 (Whatman International, Regne Unit). A continuació es van fer les dilucions de les mostres de sobrenedant tant dels experiments de cultius cel·lulars com dels animals. Tot seguit, es van afegir 15 µL d'àcid fòrmic, 35 µL de la mostra o de l'estàndard i 500 µL de reactiu Bio-Rad diluït. Es va realitzar un vòrtex i es va mesurar l'absorbància en un lector ELISA a 595 nm (Labsystems Multiskan MS, Finlàndia). La concentració de proteïnes de cada mostra es va calcular interpolant el valor d'absorbància de la mostra a la recta patró de BSA que es va preparar en cada assaig.

3.5. IMMUNOLOCALITZACIÓ

La immunolocalització és una tècnica mitjançant la qual és possible detectar i localitzar proteïnes específiques dins una cèl·lula o teixit, gràcies a l'especificitat de la unió antígen-anticòs. El procediment de detecció s'inicia fent una fixació de la mostra per tal que retengui la distribució de l'antigen i la morfologia cel·lular i/o tissular. Posteriorment, s'incuba la mostra amb un anticòs primari específic per a la proteïna que es vol determinar i, tot seguit, s'afegeix un anticòs secundari conjugat a un fluorocrom que reconeix l'anticòs primari inicial. La fluorescència emesa per aquest fluorocrom pot ser detectada i captada amb un microscopi de fluorescència amb càmera i quantificada.

3.5.1. MARCATGE DE PROTEÏNES ESPECÍFIQUES

En els miofibroblasts es van mirar marcadors específics com l'actina associada a múscul llis (α -SMA, *alpha-Smooth muscle actin*) i la vimentina. En els colonòcits es van estudiar tres proteïnes de les unions estretes i del cinturó d'adhesió mitjançant anticossos contra la ZO-1 (*Zonula Occludens Protein 1*), la claudina IV i la β -catenina.

Es va dur a terme una prova de reacció creuada abans de realitzar el marcatge. Aquesta va consistir en incubar amb un anticòs primari i després fer una segona incubació amb la solució dels dos o tres anticossos secundaris. Només es va obtenir marcatge amb el fluorocrom corresponent a l'anticòs primari utilitzat.

Transcorregudes 24 h amb el tractament hormonal, es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid (Sigma, Missouri, EUA) al 4% a temperatura ambient durant 15 min. Posteriorment, es va dur a terme un blocatge d'unions inespecífiques amb la solució de blocatge que estava format per BSA 1% i glicina 20 mM (Sigma, Missouri, EUA) dissolts en PBS i, tot seguit, es va permeabilitzar les cèl·lules amb una solució al 0,1% de Tritó X[®]-100 (Fluka, Suïssa) dissolt en solució de bloqueig que es va incubar durant 20 min a temperatura ambient. Es van realitzar dos rentats amb PBS, i es va incubar amb l'anticòs primari (Taula 3.4) durant 1 h 30 min a temperatura ambient.

Reactiu	Hoste	Dilució	Casa Comercial
<i>α-SMA</i>	Ratolí	1/100	Sigma
<i>Vimentina</i>	Conill	1/50	Acris
<i>Claudina IV</i>	Ratolí	1/100	Zymed
<i>ZO-1</i>	Conill	1/150	Zymed

Taula 3.4. Anticossos utilitzats en la immunolocalització. *Sigma* (Missouri, EUA); *Acris* (Alemanya); *Zymed Laboratories Inc.* (California, EUA).

Es van fer dos rentats amb PBS i es va incubar amb l'anticòs secundari contra immunoglobulines (Ig) de ratolí conjugat a Alexa Fluor® 488 i/o amb l'anticòs secundari contra Ig de conill conjugat a Alexa Fluor® 546 (Molecular Probes Inc., Oregon, EUA) diluïts 1/400 en solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient en fosc. En algun cas, també es va afegir faloidina conjugada a Alexa Fluor® 633 (Molecular Probes Inc., Oregon, EUA) a una dilució 1/100 per tal de marcar els filaments d'actina. A continuació es van realitzar dos rentats més i es va fer el muntatge en un medi que protegia de la decaiguda de la fluorescència (*Mowiol 488*®, *Calbiochem*, Alemanya). Les mostres es van deixar 1 h a temperatura ambient per afavorir la polimerització del *Mowiol* i després es van desar a 4°C fins el moment d'observar-les. Des del moment en que es va fer la incubació amb els anticossos secundaris fins a l'observació les mostres es van protegir de la llum.

3.5.2. MARCATGE DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Juntament amb el tractament corresponent a cada un dels pous, s'hi va afegir la bromodeoxiuridina (BrdU) a 100 μ M per poder estudiar la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co o T84. La BrdU és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina capaç d'incorporar-se al DNA de les cèl·lules que estan en fase S de la mitosi. La incorporació de BrdU a la doble cadena de DNA es detecta mitjançant una immunolocalització amb anticossos anti-BrdU i, com a resultat, permet quantificar les cèl·lules que s'han dividit des de l'addició de la BrdU.

Després de 24 h amb el tractament hormonal, es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% a temperatura ambient durant 15 min, seguit de dos rentats amb PBS. Tot seguit, es van

desnaturalitzar les cèl·lules amb HCl 5 N (Sigma, Missouri, EUA), es van neutralitzar amb tetraborat sòdic al 0,1 M (Scharlab, Espanya) pH 8,5, i finalment es van fer dos rentats amb PBS. Posteriorment, es van bloquejar les unions inespecífiques amb la solució de bloqueig, i es van permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de Tritó X[®]-100 al 0,1% dissolt en solució de bloqueig durant 20 min a temperatura ambient. Es van realitzar dos rentats amb PBS i es va afegir l'anticòs primari anti-BrdU (Sigma, Missouri, EUA) diluït 1/1000 en solució de bloqueig i es va incubar durant 1 h i 30 min a temperatura ambient. Es van fer dos rentats amb PBS i es va incubar amb l'anticòs secundari contra Ig de ratolí conjugat a Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes Inc., Oregon, EUA) diluït 1/400 en solució de bloqueig durant 1 h a temperatura ambient protegit de la llum. Les mostres es van rentar dues vegades amb PBS i es van incubar amb el marcador nuclear Hoescht 33258 a 2 µg/mL (Calbiochem, Alemanya) durant 20 min a temperatura ambient. Després de rentar les mostres amb PBS, es va afegir el medi de muntatge Mowiol 488[®] (Calbiochem, Alemanya). Finalment, es van observar les mostres en un microscopi de fluorescència.

3.5.3. VISUALITZACIÓ DE LES IMATGES

Per obtenir les imatges per l'estudi de la proliferació cel·lular es va emprar el microscopi de fluorescència Olympus BX41 (Olympus, Alemanya) que hi ha al departament de Fisiologia de la Facultat de Fàrmacia. Per cada cobre-objectes es van captar entre 8 i 10 camps amb l'objectiu de 10X a una resolució de 938 per 1024 bits.

3.5.4. QUANTIFICACIÓ DE LES IMATGES

Només es van quantificar les imatges provinents de les immunolocalitzacions de les cèl·lules proliferades. Per determinar la proliferació cel·lular es va fer el recompte de les cèl·lules que havien proliferat (que estaven marcades amb BrdU) respecte el de les cèl·lules totals (tenyides amb Hoescht). La fluorescència dels marcatges es va quantificar amb el programa Image J, (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El programa Image J ens va permetre colocalitzar els dos marcatges i veure les cèl·lules que havien proliferat respecte el total. En funció de la línia cel·lular en que es va treballar, es va

quantificar de forma diferent. En el cas dels miofibroblasts la fórmula emprada per determinar el percentatge de les cèl·lules proliferades és la que es mostra a continuació:

$$\text{Proliferació cel·lular} = \frac{\text{Nombre cèl·lules proliferades}}{\text{Nombre cèl·lules totals}} \times 100$$

A la **figura 3.9** es pot veure unes imatges representatives de les utilitzades per la quantificació de la proliferació en miofibroblasts.

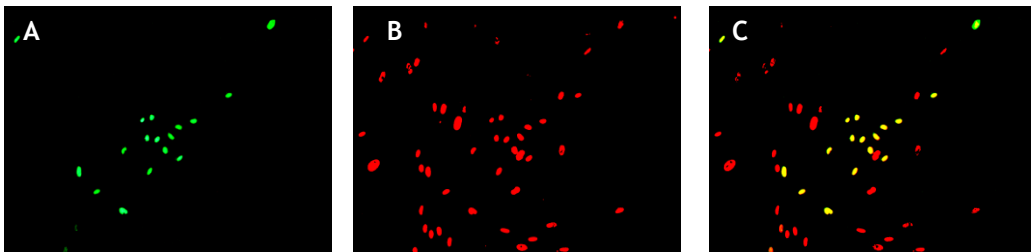


Figura 3.9. Imatges representatives de la proliferació dels miofibroblasts (CCD-18Co) després d'afegir el tractament hormonal durant 24 h. A) En color verd es veuen les cèl·lules proliferades, és a dir, que han incorporat la BrdU. B) En vermell s'observen les cèl·lules totals, és a dir que s'han tenyit amb el marcador nuclear (Hoescht). C) En color groc s'observen les cèl·lules que han proliferat un cop es van colocalitzar les imatges associades a la incorporació de la BrdU i el Hoescht. En aquesta imatge es veu que han proliferat 17 cèl·lules (A), les cèl·lules totals en són 44 (B), per tant la proliferació és del 38,6%.

Per la determinació de la proliferació dels colonòcits es va quantificar l'àrea marcada per les cèl·lules proliferades (BrdU⁺) i l'àrea marcada per les cèl·lules totals (tenyides amb Hoescht). Finalment es va realitzar un quocient amb els valors obtinguts i expressant-los en percentatge, utilitzant la fórmula que es mostra a continuació:

$$\text{Proliferació cel·lular} = \frac{\text{Àrea cèl·lules proliferades}}{\text{Àrea cèl·lules totals}} \times 100$$

A la **figura 3.10** es mostra imatges representatives utilitzades per la quantificació de la proliferació en els colonòcits.

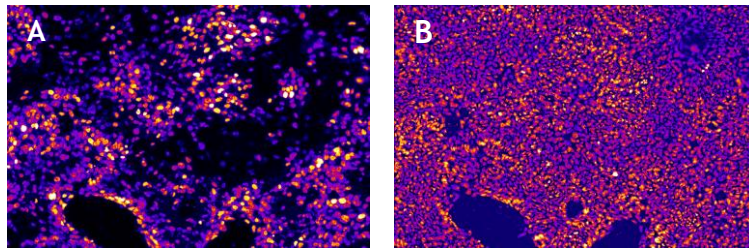


Figura 3.10. Imatges representatives de la proliferació de les cèl·lules T84 després de 24 h de tractament hormonal. A) Marcatge de les cèl·lules T84 que han incorporat la BrdU. B) Imatge de les cèl·lules totals marcades amb Hoescht.

3.6. WESTERN BLOT

La tècnica del Western Blot (*Towbin et al., 1979*) permet detectar i identificar proteïnes específiques en una mostra complexa procedent d'un extracte cel·lular mitjançant el reconeixement específic per anticossos. Aquesta tècnica consta de diferents fases: la primera de les quals és la preparació i solubilització de les proteïnes; seguida d'una electroforesi, en la qual es separen les proteïnes per pes molecular, hidrofobicitat i estructura; a continuació, es realitza la transferència a una membrana, en que les proteïnes són transferides a un suport més sòlid i, finalment té lloc, la immunodetecció.

3.6.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

Per tal de facilitar la migració de les proteïnes dins del gel on es duu a terme l'electroforesi, prèviament es realitza un tractament de les mostres anomenat desnaturalització. Aquest procés desfà l'estructura tridimensional de les proteïnes i resta tan sols la cadena polipeptídica lineal, que és més soluble en el tampó de mostra i permet una millor separació. Les proteïnes són solubilitzades amb dodecil sulfat de sodi (SDS, *Sodium dodecyl sulfate*) i agents reductors com el 2-mercaptoetanol.

Tot seguit, es va calcular el volum necessari de cada una de les mostres per tal que continguessin 15 µg de proteïna i es va solubilitzar en un tampó 5X Laemmli (**Taula 3.5**). Un

cop preparat es van fer bullir les mostres durant 10 min i a continuació es van conservar en gel per evitar que tornessin a tenir l'estructura tridimensional.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
Tris (pH 6,8)	30% v/v	Sigma
SDS	10% p/v	Bio-Rad
Glicerol	50% v/v	Sigma
<i>Blau de bromofenol</i>	0,001% p/v	Sigma

Taula 3.5. Composició del tampó 5X Laemmli. *Bio-Rad (Alemanya); Sigma (Missouri, EUA).*

3.6.2. ELECTROFORESI

En primer lloc es prepara els gels de poliacrilamida formats per la copolimerització dels compostos d'acrilamida i bisacrilamida. Aquests dos compostos confereixen l'estructura al gel, el qual comença a polimeritzar just després d'afegir els catalitzadors persulfat amònic (APS, *Ammonium Persulfate*; Sigma, Missouri, EUA) i N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED; Bio-Rad, Alemanya). En aquests gels hi ha dues zones; la superior que està formada pel gel concentrador, que la seva finalitat és concentrar i agrupar la mostra a la mateixa posició de sortida abans de començar a separar-se i, després, es troba el gel separador que permet separar les proteïnes pel seu pes molecular i la seva càrrega elèctrica. La composició del gel concentrador sempre és la mateixa, mentre que la del gel separador varia en funció del pes molecular de la proteïna que es vol determinar.

Primer es va preparar el gel separador que es va abocar a l'espai que formen els dos vidres per tal que el gel tingui el mateix gruix. El gel separador amb el que majoritàriament es va treballar va ser del 10% i estava format per Acrilamida/bisacrilamida (30%) 33%, Tris 1,5 mol/L 25%, SDS (10%) 1%, APS (10%) 0,4%, TEMED 0,1%. A continuació, es va afegir una mica aigua destil·lada, ja que l'absència d'oxigen afavoreix la polimerització dels gels. Transcorreguts 20 min a temperatura ambient es va retirar l'aigua i es va procedir afegir-hi el gel concentrador (Acrilamida/bisacrilamida (30%) 12,3%, Tris 1 mol/L 12,3%, SDS (10%) 0,1%, APS (10%) 0,5%,

TEMED 0,24%.) i una pinta de plàstic que ens va permetre la formació dels pous. Es va deixar uns 20 min a temperatura ambient perquè polimeritzés.

Un cop polimeritzats els gels es va procedir a muntar la cubeta d'electroforesi Mini-Protean III Cell® (Bio-Rad, Alemanya) que es va omplir amb el tampó d'electroforesi (Taula 3.6). Posteriorment, es van carregar les mostres i el pes molecular. Tot seguit es van sotmetre les proteïnes a un camp elèctric, a un voltatge de 80 V per tal de facilitar que les proteïnes es disposessin en el mateix punt de sortida i després es va incrementar fins a 100 V, de manera que es separen en funció del seu pes molecular i de la seva càrrega. Les proteïnes de menor pes molecular avancen més ràpid mentre que les de major pes queden retingudes més a prop del pou on es sembla la mostra.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
Tris	25 mM	Sigma
SDS	1%	Bio-Rad
Glicina	192 mM	Sigma

Taula 3.6. Composició del tampó d'electroforesi. *Bio-Rad* (Alemanya); *Sigma* (Missouri, EUA).

3.6.3. TRANSFERÈNCIA

Després de separar les proteïnes per electroforesi, es van transferir a una membrana de fluorur de polivinil (PVDF, *Polyvinylidene fluoride*) mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. Primer de tot, es van activar les membranes de PVDF amb metanol. Al mateix temps, es va deixar que el material a utilitzar quedés amarant amb el tampó de transferència. Tot seguit es va desmuntar el suport de vidre, i el gel es va posar sobre dos papers de filtre, a sobre es va afegir la membrana de PVDF i dos papers de filtre més. A continuació, es va envoltar el conjunt amb dues esponges i es va muntar dins d'un suport de plàstic, que es va submergir dins d'una cubeta de transferència Mini Trans-Blot Cell® (Bio-Rad, Alemanya) que estava plena de tampó de transferència (Taula 3.7). Es va iniciar la transferència a 100 V durant 1 h i 30 min a 4°C.

Reactiu	Concentració	Casa Comercial
Tris	25 mM	Sigma
Metanol	20%	Sigma
Glicina	192 mM	Sigma

Taula 3.7. Composició del tampó de transferència. *Sigma* (Missouri, EUA).

3.6.4. BLOCATGE I IMMUNODETECCIÓ

Una vegada les proteïnes van ser transferides, es va procedir a bloquejar tots els possibles llocs d'unió inespecífica de la membrana. Per això, la membrana es va submergir en una solució de blocatge amb agitació constant durant 1-2 h, i seguidament, es va realitzar la immunodetecció emprant anticossos específics contra les proteïnes que s'havien de determinar.

Es va utilitzar un anticòs policlonal de conill anti- β -catenina (102 kDa) diluït prèviament a 1/2000 (NeoMarkers, California, EUA), un anticòs monoclonal de ratolí anti-claudina IV (22 kDa) diluït a 1/3000 (Zymed Laboratories Inc, California, EUA), un anticòs policlonal de ratolí anti-E-cadherina (120 kDa) diluït a 1/300 (Santa Cruz Biotechnology Inc, California, EUA), un anticòs policlonal de conill anti-cadherina 11 (112 kDa) diluït a 1/100, un anticòs policlonal de ratolí anti-EGFR i un anticòs policlonal de ratolí anti-phospho-EGFR (ambdós de 170 kDa) diluïts a 1/500, (Signalway antibody, Texas, EUA) i l'anticòs monoclonal de ratolí anti-GAPDH (32 kDa) diluït a 1/10000 (Sigma, Missouri, EUA) que va servir per normalitzar. Les membranes es van incubar amb els anticossos corresponents durant tota la nit, a 4°C i amb agitació orbital. Finalment, les membranes es van incubar amb el kit WesternDot™ 625 (Molecular Probes Inc., Oregon, EUA), seguint el protocol del fabricant. El WesternDot™ 625 Kits combinen les propietats úniques dels nanocristalls Qdot® 625 amb l'alta afinitat de la unió d'estreptovidina-biotina per permetre la detecció de les proteïnes. El senyal fluorescent és compatible amb els sistemes de detecció fluorescent de gels del DNA o de proteïna i no requereix de filtres especials d'emissió.

3.6.5. CAPTACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LES IMATGES

Un cop es van realitzar totes les incubacions de les membranes, per tal de captar la fluorescència associada a les bandes del nostre interès es van posar les membranes sobre un transil·luminador amb llum U.V. Per captar-les es va utilitzar la càmera Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, Regne Unit) que hi ha al departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia. La intensitat de fluorescència dels marcatges realitzats es va quantificar amb el programa Image J.

3.7. EXPRESSIÓ GÈNICA

L'RNA de les cèl·lules T84 i CCD-18Co es va obtenir mitjançant el mètode d'extracció fenòlica. Aquest mètode es basa en l'ús d'una solució monofàsica de fenol i isocianat de guanidina per la lisis de les cèl·lules i la separació de la mostra en dues fases (aquosa i orgànica). A continuació, a partir de la fase aquosa es fa una precipitació de l'RNA total amb isopropanol. Aquestes tècniques permeten l'aïllament de l'RNA total a partir de qualsevol tipus de teixit o cultiu cel·lular.

L'RNA és un àcid nucleic molt làbil, que es degrada fàcilment per les endocucleases, anomenades RNAses. Per tal d'evitar la degradació de l'RNA durant l'experiment es va treballar amb material lliure de RNAses, material autoclavat i aigua de puresa dietil pirocarbonat (DEPC, aigua tractada amb un agent que inactiva les ribonucleases). A més, les mostres s'han de tractar amb molta cura per evitar contaminacions per RNAses.

3.7.1. OBTENCIÓ DE L'RNA

Un cop finalitzat el tractament hormonal es van obtenir les mostres de l'RNA. Les cèl·lules es van rentar amb PBS i s'hi va afegir el Trizol[®] (Life Technologies-Invitrogen, California, EUA). Es va deixar actuar 5 min i tot seguit amb l'ajuda dels raspadors es van desenganxar les cèl·lules del fons del pou. El contingut es va traspasar a un eppendorf i es va afegir cloroform (Sigma, Missouri, EUA). A continuació, les mostres es van centrifugar a 20800g a 4°C durant 15 min. Es va recollir la fase aquosa, es va traspasar a un eppendorf nou i es va afegir la mateixa

quantitat d'isopropanol fred (Sigma, Missouri, EUA). Es va agitar vigorosament i es va deixar precipitar durant tota la nit a -20°C . Les mostres es van centrifugar a 20800g a 4°C durant 20 min. El precipitat es va rentar amb etanol al 100% i després amb etanol al 70%. En la darrera centrifugació es va eliminar tot l'etanol i el precipitat es va resuspendre amb aigua lliure RNAsa. Durant tot el procés les mostres es van mantenir en gel per evitar la degradació de l'RNA.

Un cop es va obtenir l'RNA es va quantificar amb el Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., California, EUA). Per determinar la concentració de RNA és té en compte l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. L'absorbància a 260 nm ens dóna la concentració de RNA tenint en compte que 1 unitat d'absorbància a 260 nm equival a 40 µg de RNA. El quocient entre l'absorbància a 260 nm amb l'absorbància a 280 nm ens indica la puresa de la mostra i és necessari que aquest valor es trobi entre 1.8 i 2.

3.7.2. RETROTRANSCRIPCIÓ

El pas de l'RNA a cDNA s'aconsegueix per acció d'una retrotranscriptasa, enzim capaç de sintetitzar una cadena de DNA utilitzant RNA com a motlle.

La reacció de retrotranscripció requereix d'uns *primers* o encebadors, l'elecció dels quals afecta la mida i l'especificitat del cDNA obtingut. Existeixen tres tipus de primers que poden ser utilitzats per a la retrotranscripció: els Oligo(dT) que només retrotranscriuen mRNA ja que s'uneix a les cues de poliA; els hexanucleòtids aleatoris que retrotranscriuen tot RNA, i si està fragmentat es pot arribar a tenir tota la mostra; i els Oligonucleòtids específics que s'utilitzen en la retrotranscripció quantitativa.

Es va partir d'una solució que contenia 1-2 µg de RNA, Oligo(dT) i dNTPs. Es va incubar durant 5 min a 25°C i les mostres es van mantenir en gel. A continuació, es va afegir la barreja enzimàtica formada pel tampó de reacció, el DTT 0,1M i la Superscript II RT. La reacció de retrotranscripció va durar 1 h a 50°C . La reacció finalitza amb la inactivació de l'enzim durant 15 min a 75°C .

3.7.3. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA O PCR

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* per a la síntesi de seqüències definides de DNA. La tècnica de PCR a més d'utilitzar-se com una tècnica qualitativa també pot emprar-se quantitativament per comparar l'abundància d'un gen d'interès respecte un gen endogen. Una vegada ha finalitzat la PCR, es fan córrer els productes amplificats en un gel d'agarosa que separa el producte amplificat segons la seva grandària i es visualitza amb un marcador fluorescent.

Per comparar l'expressió del gen d'interès amb l'expressió d'un gen control endogen, cal que aquest es mantingui invariable entre les diferents condicions experimentals. En el nostre estudi s'ha utilitzat com a control endogen la GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

Els primers van ser dissenyats amb el programa primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Abans de realitzar les PCR de tots els productes, es va determinar les condicions òptimes d'amplificació (Taula 3.8 i 3.9). Cal que les condicions de treball hi hagi una relació lineal entre l'increment del cDNA de partida i l'augment del producte amplificat. Els paràmetres que es van modificar van ser el nombre de cicles i la temperatura d'anellament.

Gen	Seqüència d'oligonucleòtids Sentit 5'-3'	Seqüència d'oligonucleòtids Anti-sentit 5'-3'	Mida del cDNA	Temp. anella- ment
EGF	TGTCAGCACCGAGACTTACG	CCACCACACAGACAGACACC	91 bp	60°C
PDGFA	GTACGTGGCGTGTGACATTC	CACGGAGGAGAACAAGACC	82 bp	60°C
GADPH	AGGTCCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGCGGTCA	122 bp	60°C
CK19	GGATTCCACACCAGGCATTGAC	GGTACCAGGCTTCAGCATCCTT	106 bp	60°C

Taula 3.8. Seqüències dels primers de rata utilitzats. Factor de creixement epidèrmic (EGF), Factor de creixement derivat de plaquetes isoforma A (PDGFA), Gliceralehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i citoqueratina 19 (CK19).

Gen	Seqüència d'oligonucleòtids Sentit 5'-3'	Seqüència d'oligonucleòtids Anti-sentit 5'-3'	Mida del cDNA	Temp. anella- ment
ENaC	AATCAAGAAGAATCTGCCCG	GGGTGTTGGTGTGAGGCAGT	86 bp	59°C
EGF	CTTGTCATGCTGCTCCTCCTG	TGCGACTCCTCACATCTCTGC	118 bp	60°C
EGFR	CTCAGCCACCCATATGTACC	GGTCTCGGGCCATTTTGG	123 bp	60°C
TGFβ1	TGCGGCAGCTGTACATTGA	TGGTTGTACAGGGCCAGGA	151 bp	60°C
TGFβ R1	GGCCAAATATCCCAAACAGA	GCAATGCTGTAAGCCTAGCTG	108 bp	58°C
AVTR1	CGGCTTCATCTGCTACAACATC	CGAGTCCCTCCACATACCCGT	505 bp	58°C
ATGR1	GCATTATGTGGACTGAACCG	GAGCAGCCGTCATCTGTCTA	112 bp	58°C
MR	GACTGCAGCTCACCTTTGAAGA	GGGACACTTAGTTACCATCTTCTC	152 bp	58°C
PDGFA	GGATTATCGGGAAGAGGACAC	ACATCTGGTTGGCTGCTTTAG	96 bp	60°C
PDGFB	GATCCGCTCCTTTGATGATCT	GTCATGTTCCAGTCCAACCTCG	84 bp	60°C
COL4A5	AAAGGCATACAAGGTGTGGC	CCGGCTGGGTTATAGTCTGA	88 bp	58°C
VEGFA	CCAGCACATAGGAGAGATGAGCTT	TCTTTCTTTGGTCTGCATTCACAT	63 bp	58°C
GADPH	GCTGAACGGGAAGCTCACTGGC	GTAGCCCAGGATGCCCTTGAG	160 bp	60°C

Taula 3.9. Seqüències dels primers humans utilitzats. Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH), Canal epitelial de Na⁺ (ENaC), Factor de creixement epidèrmic (EGF) i el seu receptor (EGFR), Factor de creixement transformant-B 1 (TGFβ1) i el seu receptor tipus 1 TGFβ R1, receptor de la vasopressina tipus 1 (AVPR1), receptor de la angiotensina tipus 1 (ATGR1), receptor mineralocorticoid (MR), Factor de creixement derivat de plaquetes isoforma A i B (PDGFA I PDGFB), colagen IV subunitat 5 (COL4A5), Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF).

3.7.3.1. PCR SEMIQUANTITATIVA

Per desenvolupar la PCR es va emprar la polimerasa Accuprime® (Invitrogen, California, EUA), i els encebadors 300 μM. Les seqüències dels primers utilitzats són els citats a les taules 3.8 i 3.9. La PCR en temps real es va dur a terme MJ MINI™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad).

Un cop acabada la reacció de PCR, el producte amplificat es va detectar en un gel d'agarosa no desnaturitzant al 4%. El DNA es va detectar amb SyBR® (Invitrogen, California, EUA), que s'intercala als àcids nucleics de doble cadena.

Es prepara una solució d'agarosa al 2-6% (en funció de la mida de la banda) en tampó TAE 0,5X, es dissol i s'hi afegeix el Sybr[®] Sale DNA gel stain (Molecular Probes Inc., Oregon, EUA) a l'1%. Un cop gelificat es corren 20 µl del producte de PCR amb 5 µl de tampó de càrrega (Bio-Rad, Alemanya). Finalment, el gel es va observar en un transil·luminador amb llum U.V. La radiació ultravioleta absorbida pels àcids nucleics es transmet al Sybr[®] Sale DNA gel stain emetent com resultat la fluorescència de color ataronjat que és proporcional a la quantitat d'àcid nucleic present.

3.7.3.2. PCR A TEMPS REAL

En la PCR a temps real, els processos d'amplificació i detecció es produeixen de forma simultània. Mitjançant la detecció de fluorescència es pot mesurar la quantitat de RNA amplificat a cada moment, ja que el marcador fluorescent s'activa quan es forma un dúplex de DNA.

Per a la PCR en temps real, es van utilitzar els encebadors a 0,3 µM, Sybr Greener[®] a 1x (Invitrogen, California, EUA). La PCR en temps real es va dur a terme amb MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Alemanya) i la temperatura i el nombre de cicles es va adaptar per cada gen interès i estan recollits a la taula 3.8 i 3.9.

3.8. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic de les dades es va dur a terme amb el programa estadístic SPSS[®] 17 (SPSS Incorporated, Illinois, EUA) i així, valorar l'efecte dels diferents tractaments mitjançant l'estudi de la variància d'un factor (ANOVA). Tot seguit es va fer el test de Scheffé en el cas de variàncies homogènies o del test de Tamhane en el cas de variàncies no homogènies. Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de $P < 0,05$.

IV. RESULTATS

L'apartat de resultats està dividit en tres seccions:

- Secció 1: Caracterització de les línies cel·lulars T84 i CCD-18Co
- Secció 2: Efectes de l'aldosterona sobre les cèl·lules T84 i CCD-18Co
- Secció 3: Efectes de la vasopressina sobre les cèl·lules T84 i CCD-18Co

Els resultats obtinguts han originat les següents comunicacions a congressos en format pòster:

- EGF mediates aldosterone-induced regulatory effects of myofibroblasts on the junctional permeability of cultured colonic epithelial cells.
Moretó, M.; Miró, L.; Maijó, M.; Naftalin, R.J.; Pérez-Bosque, A.
Experimental biology. Washington DC, EUA 2011.
Publicat: The FASEB Journal, 25:1066.3, 2011.
- Efecto de las hormonas del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona en los miofibroblastos CCD-18Co.
Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Maijó, M.; Naftalin, R.J.; Moretó, M.
XXXIII Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Espanya 2010.
- Effects of aldosterone and angiotensin II on the expression of growth factors by T84 epithelial colonic cells.
Miró, L.; Maijó, M.; Pérez-Bosque, A.; Naftalin, R.J.; Moretó, M.
XXXVI Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto, Japó 2009
Publicat: The FASEB Journal 25:1066.3, 2011.
- Regulación endocrina de la permeabilidad en colonocitos T84.
Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Maijó, M., Naftalin, R.J.; Moretó, M.
XXXII Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo, Espanya 2009.
- Co-culture of colonic epithelial T84 and CCD-18Co myofibroblast cell lines as a model to study the regulation of colon functions.
Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Maijó, M.; Naftalin, R.J.; Moretó, M.
22nd meeting of the European Intestinal Transport Group. Pamplona, Espanya 2008.
Publicat: J Physiol Biochem 64:333, 2008.

Secció 1: Caracterització de les línies cel·lulars T84 i CCD-18Co

1. CARACTERITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS

En aquesta secció es mostren els resultats de la caracterització de les cèl·lules T84 i de les cèl·lules CCD-18Co, és a dir si les primeres expressen marcadors característics dels colonòcits i si les segones expressen proteïnes característiques dels miofibroblasts.

1.1. CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES T84

Les cèl·lules T84 presenten una morfologia epitelial tal i com es pot observar en la imatge de contrast de fases (Figura 4.1). Aquestes cèl·lules presenten marcadors epitelials com són diferents proteïnes de les unions estretes, com la claudina IV i la ZO-1.

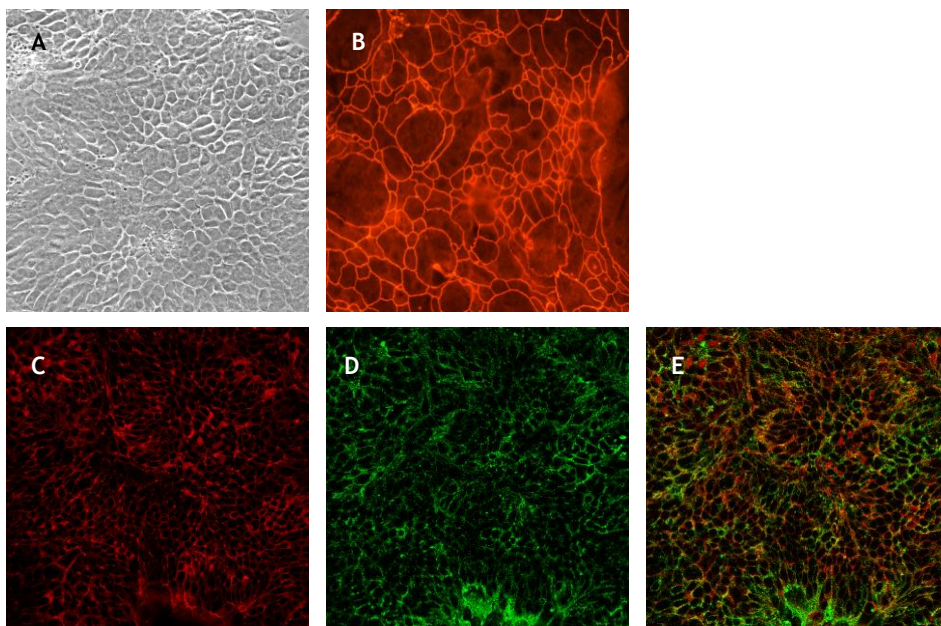


Figura 4.1. Imatges representatives de la immunolocalització de claudina IV i ZO-1 en les cèl·lules T84. A) Contrast de fases, B) ZO-1, C) L'actina, D) La claudina IV i E) Colocalització de la claudina IV en verd i l'actina en vermell, obtenint el color taronja en els llocs que colocalitzen els dos marcatges. Imatges captades a 40x.

Les immunolocalitzacions mostren que la claudina IV està distribuïda per la perifèria de les cèl·lules (Figura 4.1.B.) i que colocalitza amb el cinturó d'actina, tal i com es pot veure a la

figura 4.1.E. El marcatge de la ZO-1 és més definit i uniforme un cop han transcorregut dues setmanes des de la sembra perquè la monocapa de cèl·lules T84 està més diferenciada. L'expressió de proteïnes del complex d'unió com la β -catenina, l'E-cadherina, i la claudina IV també s'ha quantificat amb la tècnica del Western Blot (**Figura 4.2**).

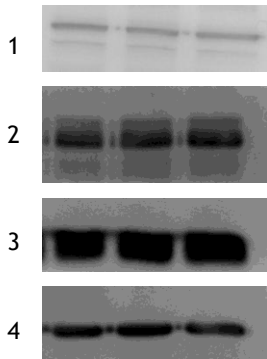


Figura 4.2. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84. Imatges representatives del Western Blot de l'E-cadherina (120 kDa, línia 1), la β -catenina (92 kDa, línia 2), la claudina IV (22 kDa, línia 3) i la GAPDH (37 kDa, línia 4). La primera columna correspon a colonòcits de la condició CTL, la segona i la tercera columnes corresponen a colonòcits que s'han tractat amb aldosterona 10 nM durant 48 h.

Les cèl·lules T84 expressen la subunitat γ de l'ENaC, l'MR i l'AVPR1 (**Figura 4.3**). A més, aquestes cèl·lules expressen factors de creixement característics de les cèl·lules epitelials com el TGF β 1 i l'EGF i els seus receptors.

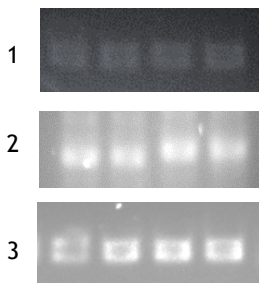


Figura 4.3. Expressió del receptor mineralocorticoide i diferents marcadors específics de les cèl·lules T84. Imatge representativa dels gels d'agarosa en el que s'hi pot veure el producte amplificat de l'MR, 152 bp (1), ENaC, 86 bp (2), i GAPDH, 160 bp (3). El producte amplificat prové de 4 mostres de la mateixa condició.

Un cop les cèl·lules T84 han format una monocapa, presenten propietats dels epitelis com, per exemple, ser capaces d'establir un corrent de curt circuit. Això significa que mantenen un flux net de càrrega positiva des del cantó mucosal al serosal, normalment degut al flux de Na^+ . El fet de que el corrent no sigui inhibible per amilorida, que és un inhibidor específic de l'ENaC significa que l'entrada de Na^+ per aquesta via no és important en aquestes cèl·lules. D'altra banda, l'addició de furosemida o de la bumetanida, ambdós inhibidors del transportador de

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ de la membrana apical, modifica el registre del corrent de curt circuit. La forskolina augmenta la permeabilitat del canal apical de Cl^- (McNamara *et al.*, 1999) donant lloc a un gran augment del corrent. La inhibició de l'intercanviador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ de la membrana basolateral amb furosemida redueix l'entrada de Cl^- i, per tant, contraresta l'efecte de la forskolina, indicant que l'epiteli és plenament funcional (Figura 4.4).

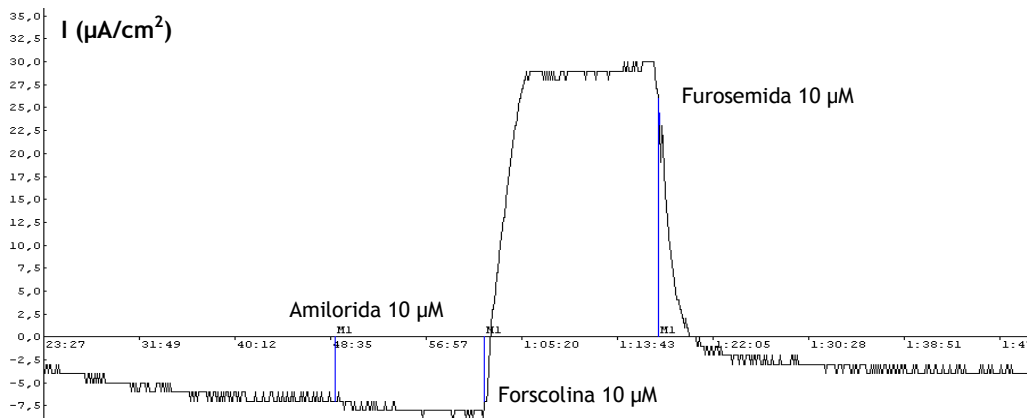


Figura 4.4. Registre representatiu del corrent de curt circuit de cèl·lules T84. Transcorreguts 45 min d'estabilització del cultiu, s'ha addicionat l'amilorida al compartiment apical. Al cap de 10 min es va afegir la forskolina que incrementa el corrent de curt circuit i un cop s'ha mantingut la resposta s'ha afegit la furosemida que disminueix el corrent fins als valors inicials.

1.2. CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES CCD-18Co

Primerament, s'ha estudiat si els CCD-18Co expressen els marcadors específics dels miofibroblasts. Les cèl·lules CCD-18Co presenten morfologia característica de miofibroblast, tal i com es pot observar a la imatge de contrast de fases (Figura 4.5). Aquestes cèl·lules també expressen marcadors molt característics del fenotip de fibroblasts com l'actina associada a múscul llis (α -SMA) o la vimentina (Figura 4.6).

En els CCD-18Co, la vimentina es localitza als filaments intermedis que es troben distribuïts pel citoplasma, mentre que l'actina forma el citoesquelet. El marcatge de l' α -SMA no és uniforme és dir hi ha cèl·lules amb un marcatge més intens que d'altres.

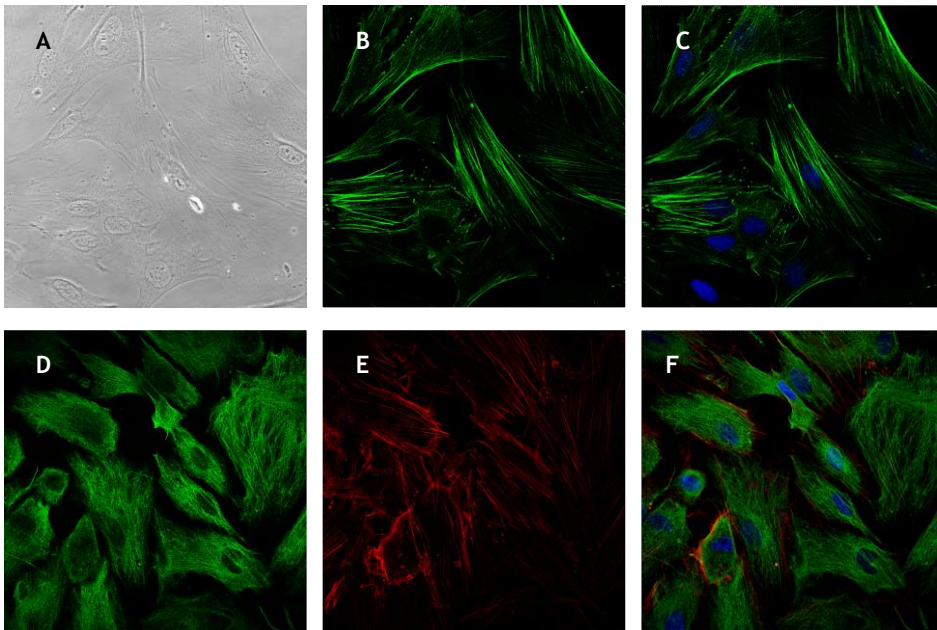


Figura 4.5. Imatges representatives de la immunolocalització de la vimentina, l'actina i l'actina de múscul llis a les cèl·lules CCD-18Co. A) Contrast de fases, B) α -SMA en color verd, C) Colocalització de α -SMA (en verd) i Hoescht (nuclis marcats en blau), D) Vimentina, E) Actina i F) Colocalització de la vimentina (verd), l'actina (en vermell) i Hoescht (marcatge nuclear, en blau). Imatges obtingudes a 63x.

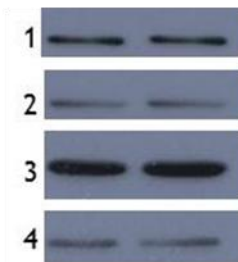


Figura 4.6. Expressió de la cadherina 11, la vimentina i l'actina del múscul llis a cèl·lules CCD-18Co. Imatges representatives del Western Blot de la cadherina 11 (línia 1), la vimentina (línia 2), α -SMA (línia 3) i la β -actina (línia 4). La primera columna correspon a miofibroblasts de la condició CTL i la segona columna a miofibroblasts tractats amb aldosterona 10 nM.

Aquestes cèl·lules també expressen col·lagen IV i els receptors principals de les hormones del nostre estudi l'MR i l'AVPR1. Les cèl·lules CCD-18Co també expressen diferents factors de creixement típics dels fibroblasts, com ara el TGF β 1 i l'EGF i els seus receptors el TGF β R1 i l'EGFR o altres factors com el PDGFA, el PDGFB i el VEGF (Figura 4.7). Aquests trets

característics s'han mantingut entre els passatges 12 i 19, tot i que s'ha trobat una major resposta en els passatges joves respecte els més envellits.

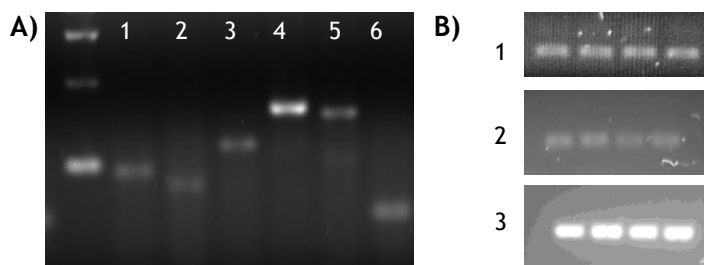


Figura 4.7. Expressió de diferents marcadors específics de les cèl·lules CCD-18Co. A) Imatge representativa d'un gel d'agarosa en el que s'hi pot veure el producte amplificat dels diferents factors de creixement analitzats que expressen els CCD-18Co: PDGFA, 96 bp (1); PDGFB, 84 bp (2); EGF, 118 bp (3); GAPDH, 160 bp (4); TGFB1, 151 bp (5) i VEGFa, 63 bp (6). B) Per PCR el producte amplificat de 4 mostres de la mateixa condició de l'EGFR (línia 1), l'MR (línia 2) i la GAPDH (línia 3).

Secció 2: Efectes de l'aldosterona sobre les cèl·lules T84 i CCD-18Co

2. EFECTES DE L'ALDOSTERONA

En aquesta secció hi ha els resultats de l'efecte de l'aldosterona tant sobre les cèl·lules T84 com sobre les cèl·lules CCD-18Co. També mostra si el medi condicionat (CM, *Conditioned Medium*) de les cèl·lules tractats amb aldosterona és capaç de modificar la resposta de les cèl·lules T84.

2.1. ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES T84

Primerament, s'ha analitzat l'efecte directe de l'aldosterona sobre les cèl·lules T84. S'ha dissenyat un model experimental en que s'ha estudiat l'efecte de tres concentracions d'aldosterona diferents, a 10, a 100 i a 500 nM, durant 24 h o 48 h.

L'efecte de l'aldosterona sobre les proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 s'ha avaluat a les 48 h. La incubació de les cèl·lules T84 amb les diferents concentracions d'aldosterona, no modifica l'expressió de proteïnes del complex d'unió com la β -catenina i la claudina IV en cap de les concentracions estudiades (Figura 4.8).

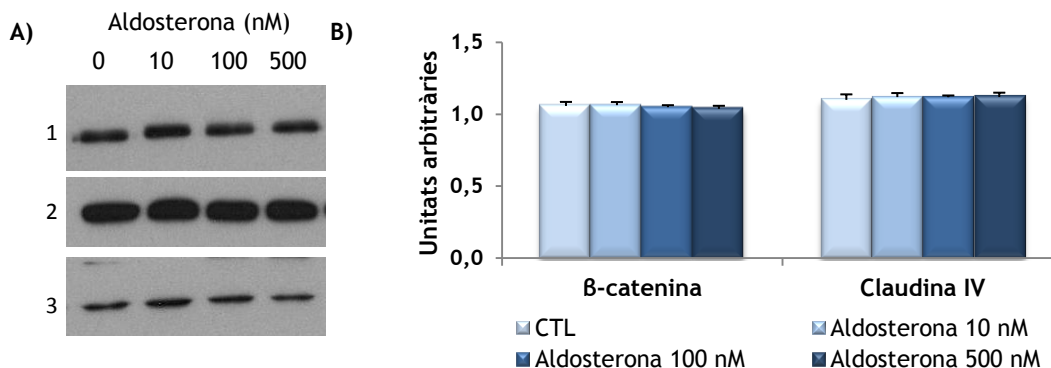


Figura 4.8. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de proteïnes del complex d'unió de cèl·lules T84. Les proteïnes s'han analitzat després de les 48 h d'incubació amb tres concentracions d'aldosterona (10 nM, ALDO 10; 100 nM, ALDO 100; 500 nM, ALDO 500 nM). A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV 48 h després d'haver aplicat l'aldosterona a diferents concentracions sobre les cèl·lules T84. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

L'estudi de l'expressió de l'MR s'ha realitzat a les 24 h d'haver addicionat l'aldosterona. S'ha analitzat si l'expressió de l'MR es modifica en funció de la concentració d'aldosterona i cap de les concentracions analitzades altera l'expressió de l'MR (Figura 4.9).

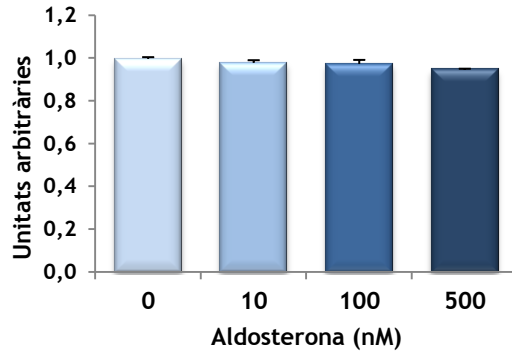


Figura 4.9. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de l'MR de les cèl·lules T84. Expressió de l'mRNA de l'MR de les cèl·lules T84 després de 48 h del tractament amb aldosterona. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

S'ha aplicat el tractament hormonal amb diferents concentracions d'aldosterona (10, 100 i 500 nM) durant 48 h per veure s'hi hi ha alguna modificació en l'expressió del mRNA de la subunitat γ de l'ENaC. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.10, on es pot veure que el tractament hormonal no canvia l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC.

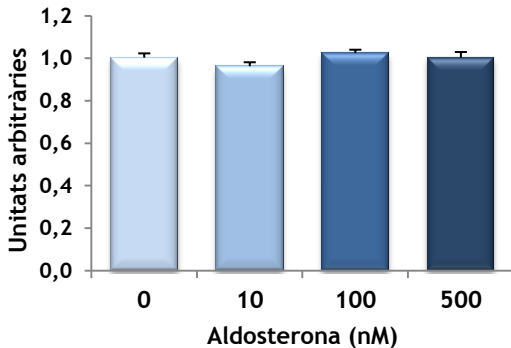


Figura 4.10. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84. Expressió de l'mRNA de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84 després de 48 h del tractament amb aldosterona. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

Una vegada s'han caracteritzat les cèl·lules T84, s'ha estudiat si diferents concentracions d'aldosterona podia modificar l'expressió d'alguns factors de creixement com l'EGF i el TGF β i els seus receptors.

El tractament amb aldosterona sobre els colonòcits no modifica l'expressió de l'EGF ni la del TGF β 1 (Figura 4.11). Posteriorment, s'ha determinat l'expressió dels receptors d'aquests factors de creixement i, tant sols, augmenta significativament l'expressió del TGF β R1 a la condició d'aldosterona 10 nM, tal i com es pot veure a la figura 4.12.

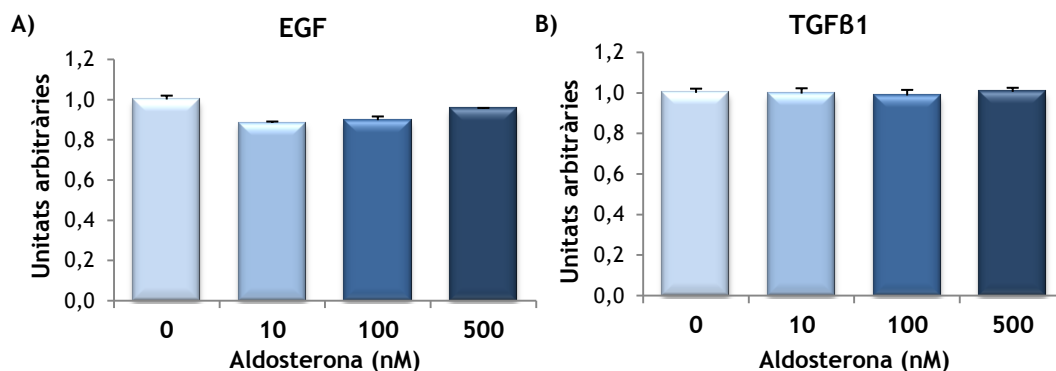


Figura 4.11. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF i el TGF β 1 de les cèl·lules T84. Expressió de l'mRNA de l'EGF (A) i del TGF β 1 (B) a les 48 h de la incubació amb aldosterona (10, 100 i 500 nM). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 5-6 mostres.

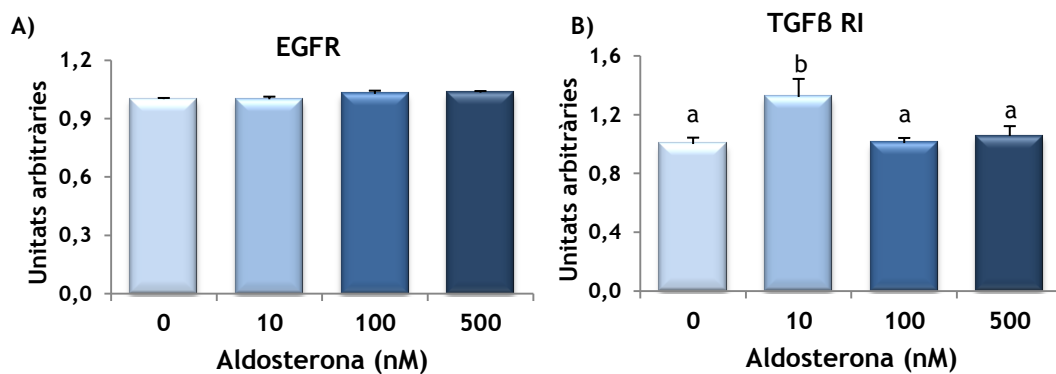


Figura 4.12. Efecte de diferents concentracions d'aldosterona sobre l'expressió dels receptors de l'EGF i del TGF β R1 de les cèl·lules T84. Expressió de l'mRNA de l'EGFR (A) i del TGF β R1 (B) a les 48 h de l'administració d'aldosterona (10, 100 i 500 nM). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 5-6 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

2.2. ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES CCD-18Co

Davant la poca resposta de les cèl·lules T84 a l'aldosterona, s'ha estudiat si l'addició d'aquesta hormona provoca canvis en variables com la proliferació cel·lular, l'expressió de proteïnes d'adhesió o l'expressió de diferents factors de creixement de les cèl·lules CCD-18Co. El tractament amb aldosterona s'ha realitzat a una concentració final de 100 nM.

2.2.1. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

El tractament amb l'aldosterona 100 nM sobre les cèl·lules CCD-18Co durant 24 h estimula la proliferació cel·lular un 70% respecte la condició CTL ($P < 0,05$; **Figura 4.14**). Aquest efecte és bloquejat per una pre-incubació amb l'espironolactona ($P < 0,05$; condició ALDO+SPI). La incubació de l'espironolactona sola no modifica la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co (resultats no mostrats).

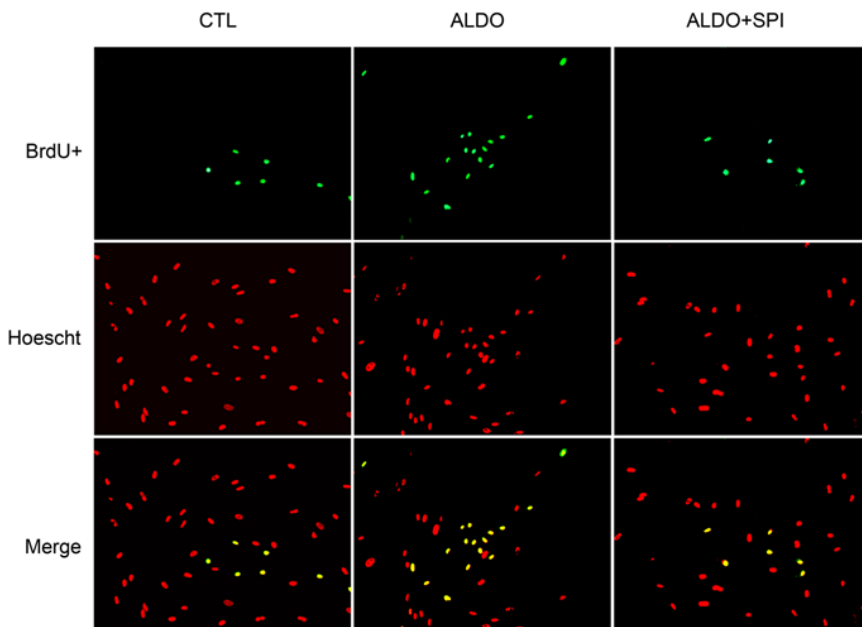


Figura 4.13. Efecte de l'aldosterona sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Imatges representatives de la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després del tractament amb aldosterona durant 24 h. A la primera fila, en color verd, es mostren les cèl·lules que han proliferat; en la fila del centre, en color vermell, es mostren les cèl·lules totals; i a la darrera fila, en groc, s'observa la colocalització de les cèl·lules que han proliferat i de les cèl·lules totals.

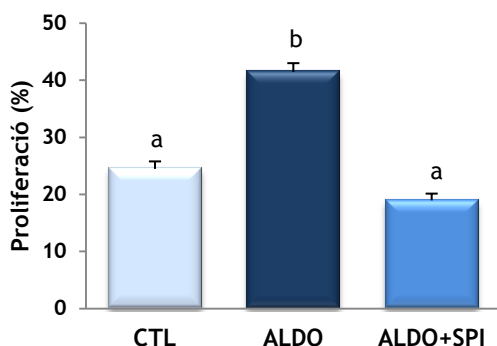


Figura 4.14. Quantificació de l'efecte de l'aldosterona sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Quantificació de la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co tractades amb aldosterona 100 nM durant 24 h. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

2.2.2. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES D'ADHESIÓ

El tractament amb l'aldosterona durant 24 h no canvia l'expressió de la cadherina 11 (Figura 4.15).

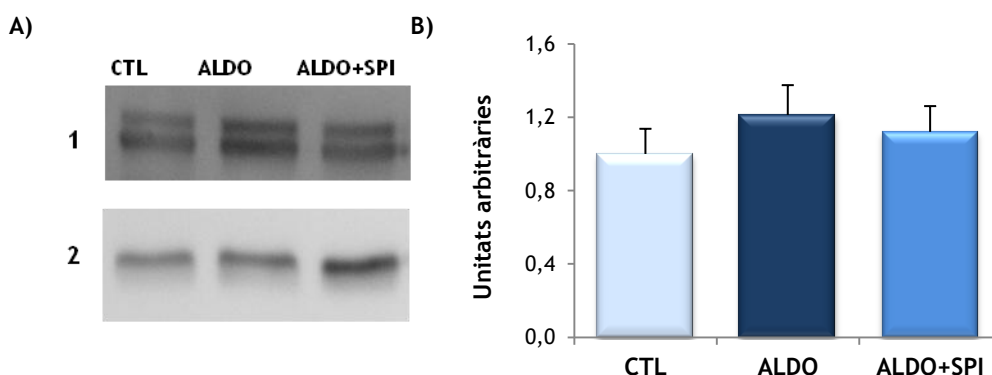


Figura 4.15. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de la cadherina 11 de les cèl·lules CCD-18Co. Les cèl·lules s'han incubat amb aldosterona (100 nM) durant 24 h. A) Imatges representatives del Western Blot de la cadherina 11 (110 kDa, línia 1) i la GAPDH (37 kDa, línia 2). Les condicions són: CTL, ALDO i ALDO+SPI. B) Quantificació de l'expressió de la cadherina 11 de les cèl·lules CCD-18Co després de 24 h d'haver aplicat l'aldosterona 100 nM. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 7-8 mostres.

2.2.3. EXPRESSIÓ GÈNICA DE L'EGF, EL VEGFa I EL TGFβ1

S'ha analitzat l'expressió de diferents factors de creixement que podrien estar implicats en la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Els factors de creixement estudiats han estat: EGF, VEGF i TGFβ1. A la **figura 4.16** hi ha els resultats obtinguts de la quantificació d'aquests factors de creixement per PCR a temps real. L'aldosterona incrementa significativament l'expressió de l'EGF un 30% ($P < 0,05$). La pre-incubació amb espironolactona prevé significativament l'efecte

de l'hormona i obté valors similars als de la condició CTL ($P < 0,05$). D'altra banda, el tractament amb aldosterona no altera l'expressió del VEGF ni del TGF β 1. L'espironolactona sola no modifica l'expressió dels factors de creixement estudiats.

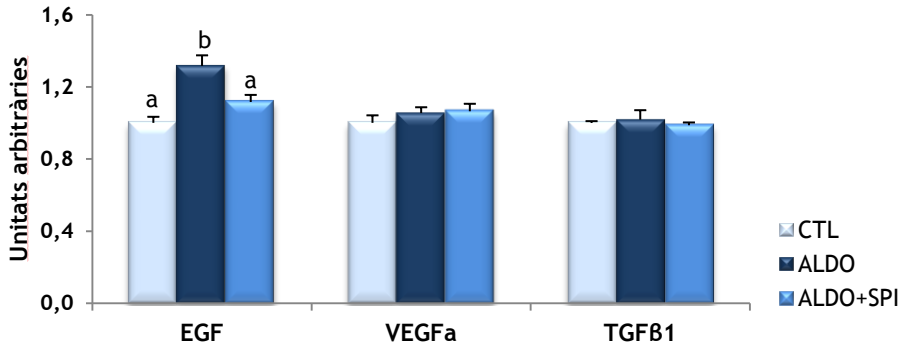


Figura 4.16. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF, el VEGFa i el TGF β 1 de les cèl·lules CCD-18Co. S'ha determinat l'mRNA d'aquests factors a les cèl·lules CCD-18Co que s'han incubat amb aldosterona 100 nM durant 18 h. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

El tractament amb aldosterona no modifica l'expressió de l'MR, ni la de l'EGFR o la del TGF β R1 (Figura 4.17).

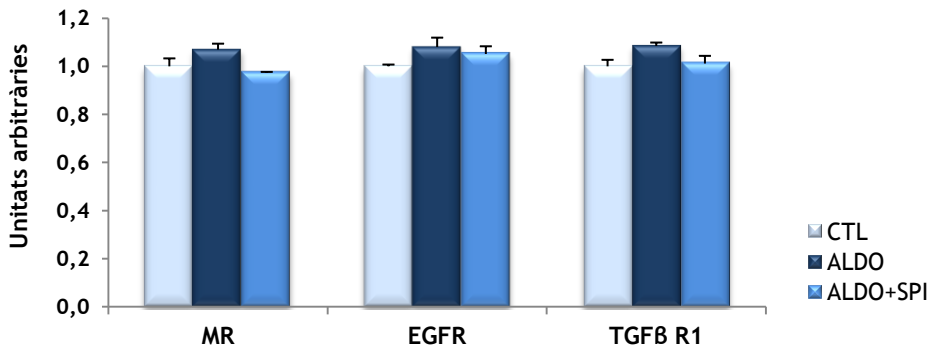


Figura 4.17. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'MR, l'EGFR i el TGF β R1 de les cèl·lules CCD-18Co. S'ha determinat l'mRNA d'aquests receptors a les cèl·lules CCD-18Co que s'han incubat amb aldosterona 100 nM durant 18 h. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

2.2.4. DETERMINACIÓ DE L'EGF AL MEDI DE CULTIU

En condicions basals (CTL), al medi de cultiu de les cèl·lules CCD-18Co, la concentració d'EGF és de $38,6 \pm 1,53$ pg/mL (Figura 4.18) i el tractament amb l'aldosterona durant 24 h l'incrementa un 30% ($P < 0,05$). Aquest increment no s'observa quan els CCD-18Co són incubats prèviament amb l'espironolactona (condició ALDO+SPI), i mostren valors similars als de la condició CTL.

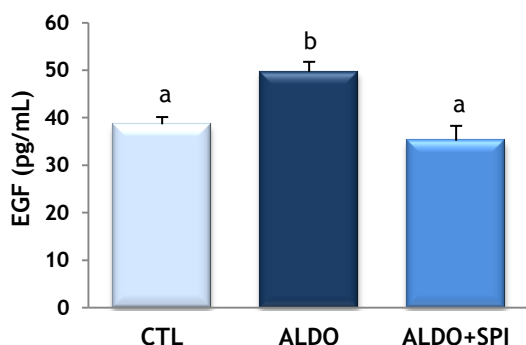


Figura 4.18. Efecte de l'aldosterona sobre la concentració d'EGF al medi de cultiu de les cèl·lules CCD-18Co. S'ha determinat la concentració d'EGF al medi de cultiu dels CCD-18Co que s'han incubat amb aldosterona 100 nM durant 24 h. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

2.2.5. ADDICIÓ DE L'EGF DE FORMA EXÒGENA

Tal com s'ha vist en l'apartat anterior l'aldosterona incrementa l'expressió i concentració de l'EGF, i per tant s'ha estudiat si l'addició exògena d'aquest factor modifica la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. L'EGF estimula la proliferació cel·lular de forma similar a l'obtinguda quan els CCD-18Co són tractats amb l'aldosterona. Aquest increment de la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co de la condició EGF és gairebé el doble que l'obtinguda en la condició CTL ($P < 0,05$; Figura 4.19).

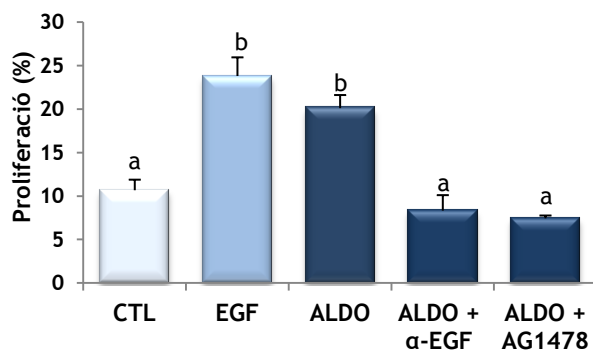


Figura 4.19. Efecte de l'EGF sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Les cèl·lules s'han incubat amb aldosterona 100 nM o EGF 50 ng/mL durant 24 h. L'anticòs α -EGF (0,5 μ g/mL) i l'inhibidor d'EGFR (AG1478, 5 μ M), s'han afegit 45 min abans de l'addició de l'aldosterona. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

La pre-incubació dels CCD-18Co amb l'anticòs α -EGF ha estat capaç de neutralitzar la proliferació cel·lular induïda pel tractament amb aldosterona. La condició ALDO+ α -EGF redueix la resposta proliferativa de forma similar a l'observada a la condició CTL ($P<0,05$). Quan els CCD-18Co són pre-incubats amb l'inhibidor de l'EGFR (AG1478), la proliferació cel·lular s'inhibeix respecte la condició ALDO ($P<0,05$). Quan els CCD-18Co són incubats amb l'anticòs neutralitzant o amb l'AG1478 sense afegir-hi l'aldosterona proliferen de forma similar a la condició CTL (resultats no mostrats).

2.2.6. VIES D'ACCIÓ DE L'ALDOSTERONA

L'aldosterona pot estimular la proliferació cel·lular a través de diferents vies d'acció com són la via Ras/Raf/MAPK i la via PI3K/AKT. S'ha estudiat si l'aldosterona activa aquestes vies a les cèl·lules CCD-18Co. La pre-incubació de les cèl·lules amb PD98059 (inhibidor de MEK1) o amb LY294002 (inhibidor de PI3K) bloqueja la resposta de l'aldosterona de forma significativa ($P<0,05$) (Figura 4.20). La incubació de les cèl·lules CCD-18Co només amb els inhibidors PD98059 i LY294002 no modifica la taxa de proliferació cel·lular (resultats no mostrats).

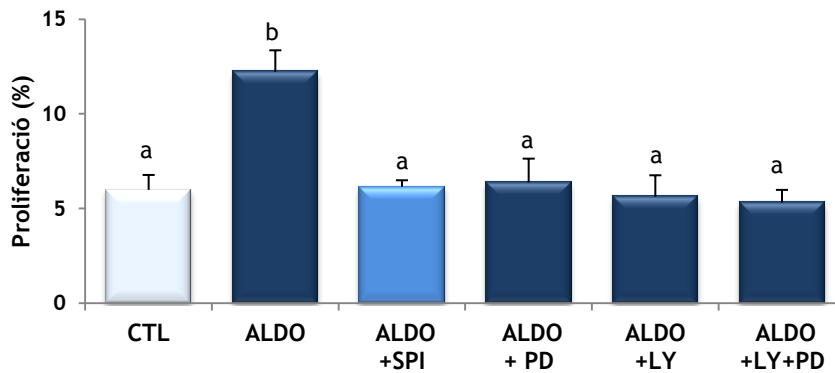


Figura 4.20. Proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després de 24 h del tractament amb aldosterona i els inhibidors de les vies Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT. Les cèl·lules CCD-18Co han estat pre-incubats amb un inhibidor selectiu de MEK1 (PD98059, 10 μ M) i amb un inhibidor de PI3K (LY294002, 10 μ M) 45 min abans de l'addició de l'aldosterona 100 nM. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P<0,05$.

2.3. EFECTES DEL MEDI CONDICIONAT SOBRE CÈL·LULES T84

Atès la poca resposta de les cèl·lules T84 davant l'addició directa de l'hormona s'ha analitzat els efectes del CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubats amb aldosterona podia modificar la proliferació i la permeabilitat de les cèl·lules T84.

2.3.1. PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES T84 TRACTADES AMB EL MEDI CONDICIONAT

El CM provinent dels CCD-18Co tractats amb aldosterona (CM-ALDO) estimula la proliferació de les cèl·lules T84 un 40% ($P < 0,05$; **Figura 4.21**) respecte les cèl·lules T84 tractades amb CM provinent dels CCD-18Co control (CM-CTL). Aquest efecte és inhibit quan les cèl·lules T84 són incubades amb CM dels CCD-18Co tractats amb l'aldosterona i l'espironolactona (condició ALDO+SPI), ja que presenten una taxa proliferativa similar a la dels incubats amb el CM de la condició CTL ($P < 0,05$).

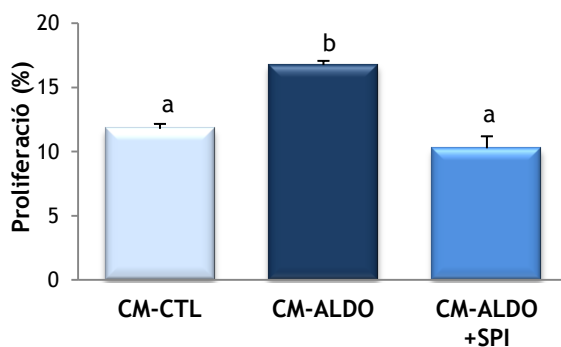


Figura 4.21. Efectes del medi CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona i l'espironolactona sobre la proliferació de les cèl·lules T84. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM provinent de cèl·lules CCD-18Co de les condicions CTL (CM-CTL), ALDO (CM-ALDO) o SPI (CM-ALDO+SPI). Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

El CM procedent dels CCD-18Co no tractats (CTL) se l'hi ha afegit de forma exògena diferents concentracions d'EGF a 10, 20, 50 i 100 ng/mL. Els resultats obtinguts mostren una correlació entre la concentració d'EGF i la taxa proliferativa de les cèl·lules T84 ($P < 0,05$, $R^2 = 0,9819$; **Figura 4.22**), és a dir una major concentració d'EGF indueix una major proliferació de les cèl·lules T84.

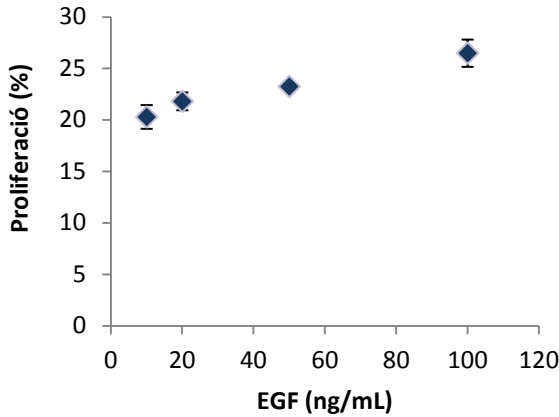


Figura 4.22. Correlació entre la proliferació de les cèl·lules T84 i la concentració de l'EGF. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM-CTL amb diferents concentracions d'EGF. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres..

Per comprovar si l'EGF és el responsable dels efectes observats del CM sobre les cèl·lules T84 s'ha modificat el CM procedent dels CCD-18Co, on s'hi ha afegit o bé l'EGF de forma exògena o bé diferents inhibidors del receptor. L'addició de l'EGF estimula la proliferació de les cèl·lules T84 de forma similar a les cèl·lules tractades amb CM de cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona (condició CM-ALDO). En ambdós casos, l'increment de la proliferació és del 60% ($P < 0,05$; **Figura 4.23**). Quan les cèl·lules s'han incubat amb CM provinent dels CCD-18Co tractats amb aldosterona però al que se li ha afegit o bé l'anticòs neutralitzant de l'EGF (α -EGF) o bé l'inhibidor de l'EGFR (AG1478), la proliferació cel·lular té valors similars als observats a les cèl·lules T84 incubades amb el CM-CTL ($P < 0,05$).

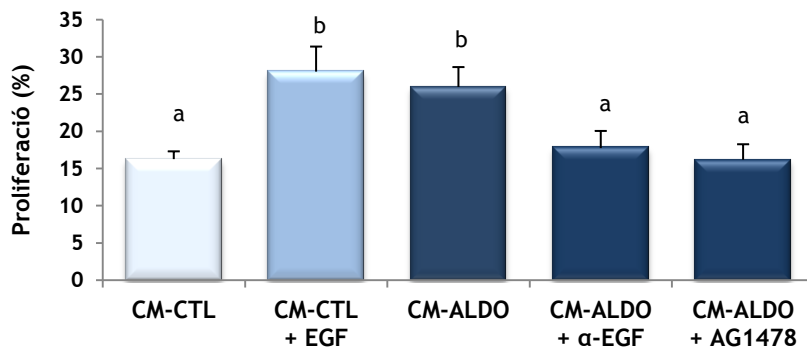


Figura 4.23. Efecte de l'anticòs α -EGF i l'inhibidor de l'EGFR al CM sobre la proliferació de les cèl·lules T84. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM-CTL amb EGF (50 ng/mL) o amb el CM-ALDO (que prové de cèl·lules CCD-18Co tractades amb aldosterona 100 nM) al que se li ha afegit l' α -EGF (0,5 μ g/mL) i l'inhibidor de l'EGFR (AG1478, 5 μ M). Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.1.1. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DEL COMPLEX D'UNIÓ

L'efecte de CM procedent dels CCD-18Co tractats amb l'aldosterona (CM-ALDO) sobre proteïnes del complex d'unió s'ha estudiat a les 24 h i a les 48 h. A les 24 h no hi ha gaires efectes, només hi ha una certa tendència a incrementar l'expressió de la β -catenina (Figura 4.24). En canvi, l'efecte a les 48 h és més evident, ja que les cèl·lules T84 incrementen l'expressió de la β -catenina i de la claudina IV un 30% i un 25%, respectivament, ($P < 0,05$ ambdues; Figura 4.25). Aquest efecte no s'observa quan el CM prové dels CCD-18Co tractats amb ALDO+SPI ($P < 0,05$). El CM procedent de cèl·lules CCD-18Co tractats amb l'espironolactona sola (CM-SPI) no modifica l'expressió de la β -catenina i la claudina IV ni a les 24 h ni a les 48 h (resultats no mostrats).

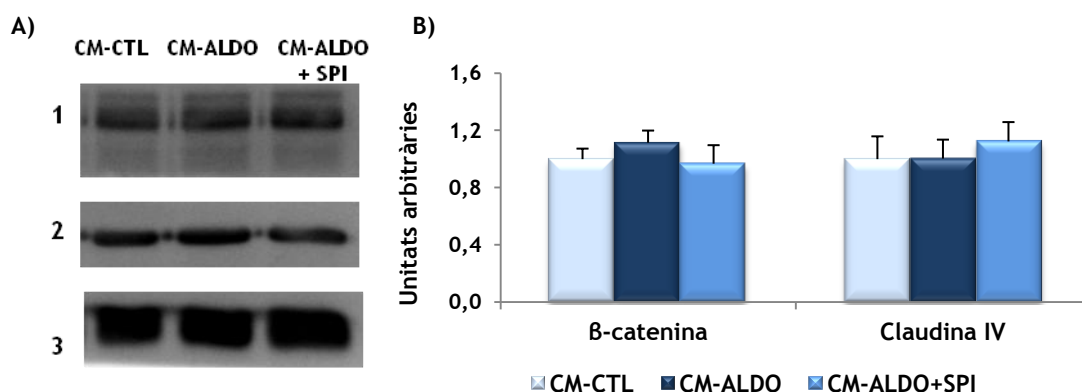


Figura 4.24. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 24 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona. A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). Les condicions són: CM-CTL (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co CTL), CM-ALDO (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb ALDO 100 nM) i CM-ALDO+SPI (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb ALDO 100 nM i l'espironolactona). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV després de 48 h d'haver aplicat l'aldosterona a les cèl·lules T84. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

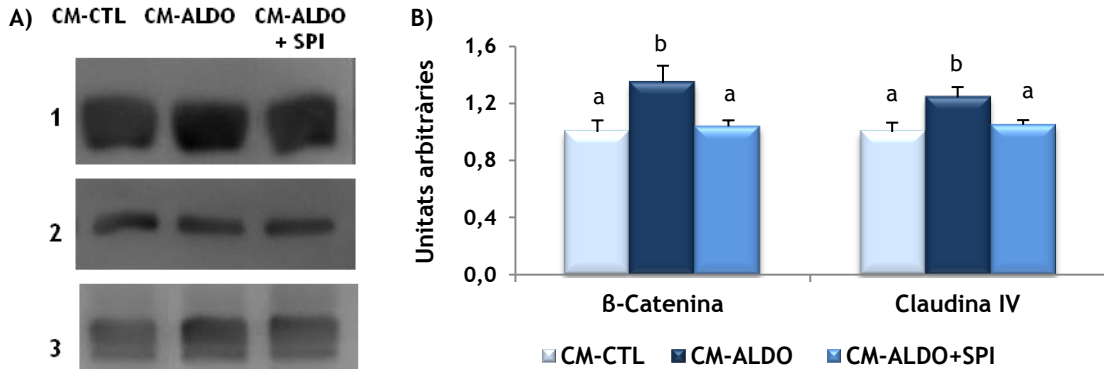


Figura 4.25. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 48 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb aldosterona. A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). Les condicions són: CM-CTL (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co CTL), CM-ALDO (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb ALDO 100 nM) i CM-ALDO+SPI (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb ALDO 100 nM i l'espironolactona). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV després de 48 h d'haver aplicat l'aldosterona a les cèl·lules T84. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

2.4. ACCIÓ IN VIVO DE L'ALDOSTERONA

2.4.1. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL

A la taula 4.1 es mostren els pesos del primer dia LS per cada un dels grups, el pes el dia del sacrifici i l'increment de pes dels animals dels tres dies sotmesos a la dieta LS. No s'observen variacions del pes corporal en els animals sotmesos durant 3 dies a una dieta amb un contingut baix de Na^+ .

Grups	Pes inicial (g)	Pes final (g)	Increment de pes (g)
HS	228,5 ± 4,97	232,2 ± 3,71	3,75 ± 1,38
LS	231,0 ± 4,45	236,5 ± 5,78	5,50 ± 2,96
LS+SPI	237,0 ± 4,38	241,0 ± 3,59	4,75 ± 2,06

Taula 4.1. Evolució del pes corporal dels animals en un model d'hiperaldosteronisme secundari. Hi ha el pes inicial del primer dia LS, el pes del dia del sacrifici i l'increment de pes dels tres dies amb dieta LS. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 4 animals

2.4.2. EXPRESSIÓ GÈNICA DE L'EGF EN MUCOSA DE CÒLON

El canvi a una dieta amb baix contingut en Na⁺ no modifica l'expressió de l'mRNA de l'EGF a la mucosa de còlon a les 72 h no canvia en el model d'hiperaldosteronisme secundari. El grup LS incrementa lleugerament la seva expressió tot i no ser estadísticament significatiu (Figura 4.26).

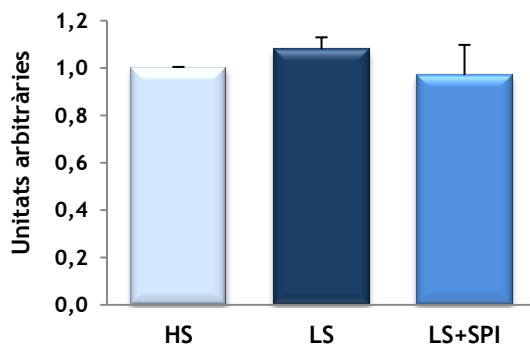


Figura 4.26. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de l'EGF en la mucosa de còlon en el model d'hiperaldosteronisme secundari. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 4 mostres.

2.4.3. EXPRESSIÓ DE L'EGFR EN MUCOSA DE CÒLON

Una vegada hem determinat que l'efecte de l'aldosterona està mediat per l'EGF, s'ha procedit a estudiar si també incrementa en un model d'hiperaldosteronisme secundari en rata. Aquest model d'hiperaldosteronisme es caracteritza per un increment important de la concentració sèrica d'aquesta hormona.

L'estudi de l'expressió de l'EGFR a la mucosa de còlon al cap de 72 h d'haver iniciat el tractament amb una dieta amb baix contingut de Na⁺ no modifica l'expressió del receptor a la mucosa de còlon (Figura 4.27).

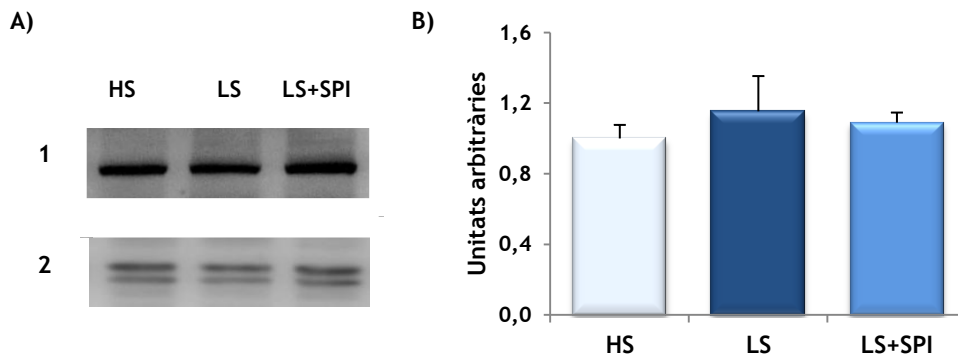


Figura 4.27. Expressió de l'EGFR a la mucosa de còlon en un model d'hiperaldosteronisme secundari. A) Imatges representatives del Western Blot de l'EGFR (170 kDa, línia 1) i la GAPDH (37 kDa, línia 2). Les condicions són HS, LS i LS+SPI. B) Quantificació de l'expressió de l'EGFR després de 72 h de rebre la dieta LS. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 4 mostres.

D'altra banda, la quantificació de la fosforilació de l'EGFR en la mucosa de còlon, 72 h després d'haver iniciat el tractament amb una dieta LS incrementa significativament la fosforilació del receptor un 23% respecte els animals que han seguit una dieta HS. En canvi, els animals que han rebut l'espironolactona atenua la fosforilació del receptor aconseguint valors similars als del grup HS ($P < 0,05$) (Figura 4.28).

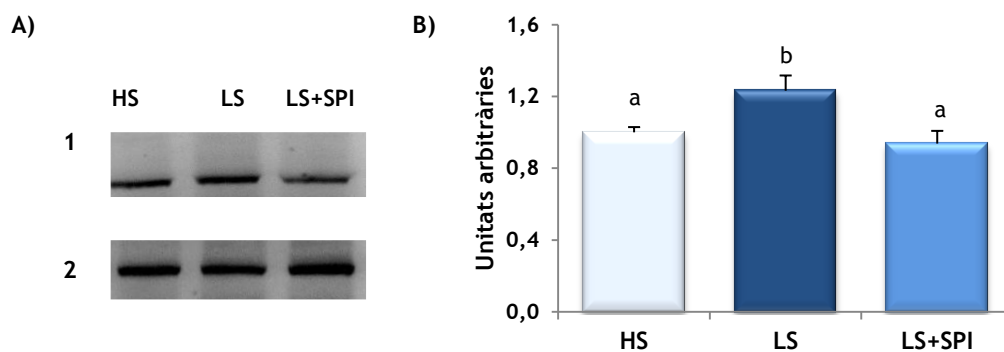


Figura 4.28. Efecte de l'aldosterona sobre l'expressió de la fosforilació de l'EGFR a la mucosa de còlon en un model d'hiperaldosteronisme secundari. A) Imatges de Western Blot de l'P-EGFR (170 kDa, línia 1) i el de l'EGFR (170 kDa, línia 2). Les condicions són HS, LS i LS+SPI. B) Quantificació de l'expressió de la fosforilació de l'EGFR després de 72 h de rebre la dieta LS. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 4 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

Secció 3: Efectes de la vasopressina sobre les cèl·lules T84 i CCD-18Co

3. EFECTES DE LA VASOPRESSINA

En aquesta secció es mostren els efectes de la vasopressina tant sobre les cèl·lules T84 com les cèl·lules CCD-18Co. A més, també hi ha els efectes del CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb vasopressina sobre la proliferació i l'expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84.

3.1. ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES T84

Primerament, s'ha avaluat l'efecte directe de la vasopressina sobre les cèl·lules T84. S'ha dissenyat un model experimental en que s'ha estudiat l'efecte de dues concentracions de vasopressina diferents, a 1 i a 100 nM, durant 24 h o 48 h.

La incubació de les cèl·lules T84 amb vasopressina durant 48 h no modifica l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC en cap de les concentracions estudiades (Figura 4.29).

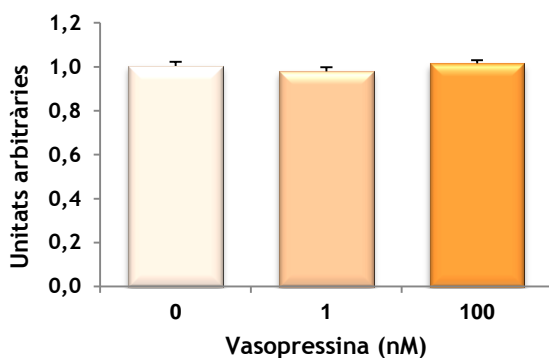


Figura 4.29. Efecte de diferents concentracions de vasopressina sobre l'expressió de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84. Expressió de l'mRNA de la subunitat γ de l'ENaC de les cèl·lules T84 després de 48 h del tractament amb vasopressina (1 nM, AVP 1; 100 nM, AVP 100). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

L'efecte de la vasopressina sobre les proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 s'ha estudiat a les 48 h. Cap de les dues concentracions de vasopressina estudiades modifica ni l'expressió de la β -catenina ni la de la claudina IV (Figura 4.30).

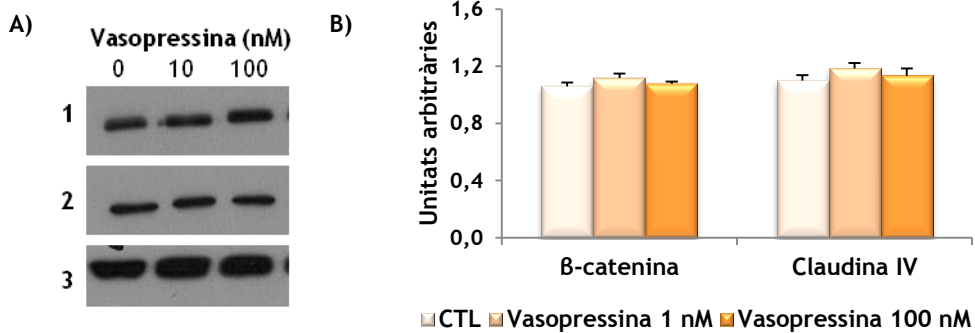


Figura 4.30. Efecte de diferents concentracions de vasopressina sobre l'expressió de proteïnes del complex d'unió de cèl·lules T84. Les proteïnes s'han analitzat després de les 48 h d'incubació amb dues concentracions de vasopressina (1 nM, AVP 1; 100 nM, AVP 100). A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

L'estudi de la proliferació s'ha realitzat a les 24 h d'haver addicionat la vasopressina a una concentració final de 10 nM. La incubació amb vasopressina sola o amb l'hormona més la mescla d'inhibidors no modifica la proliferació de les cèl·lules T84 (**Figura 4.31**). La incubació amb els inhibidors dels receptors de la vasopressina sense afegir-hi l'hormona no modifica la proliferació de les cèl·lules T84 (resultats no mostrats).

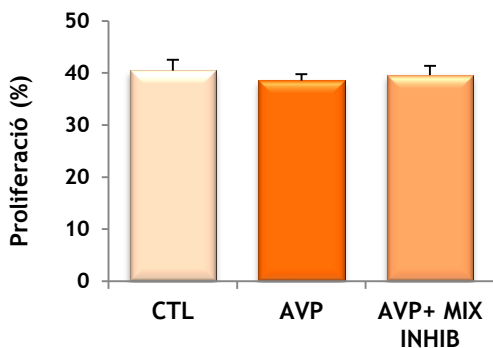


Figura 4.31. Efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules T84. S'ha incubat la vasopressina (10nM) i/o els inhibidors dels seus receptors durant 24 h. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

3.2. ACCIÓ SOBRE LES CÈL·LULES CCD-18Co

Atès que les cèl·lules T84 no han respòs a la vasopressina s'ha analitzat l'acció d'aquesta hormona sobre les cèl·lules CCD-18Co. En aquestes cèl·lules CCD-18Co s'ha estudiat canvis de la proliferació cel·lular, expressió de proteïnes d'adhesió i modificació de l'expressió de diferents factors de creixement. La concentració final de la vasopressina sobre les cèl·lules CCD-18Co ha estat de 10 nM.

3.2.1. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

L'addició de la vasopressina 10 nM durant 24 h augmenta la proliferació cel·lular de les cèl·lules CCD-18Co al voltant del 60% respecte la condició CTL ($P < 0,05$; **Figura 4.33**). En canvi, la pre-incubació amb els inhibidors *mannin compound* i tolvaptan bloqueja la proliferació causada per la vasopressina ($P < 0,05$; condició AVP+MIX INHIB). La incubació dels dos inhibidors, *mannin compound* i tolvaptan (condició MIX INHIB), sobre les cèl·lules CCD-18Co no altera la proliferació (resultats no mostrats).

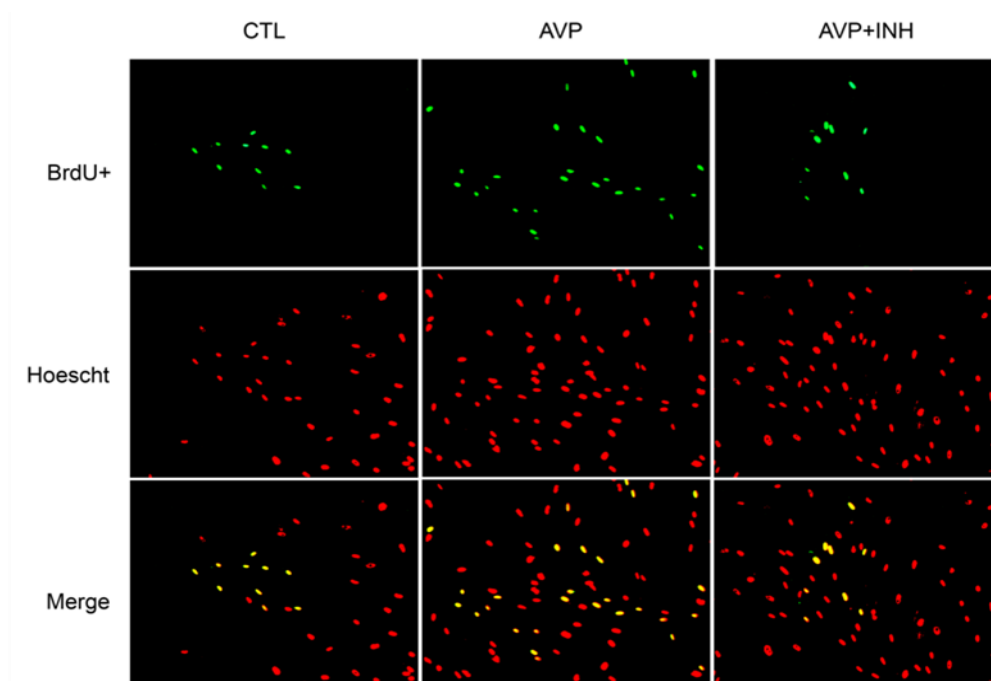


Figura 4.32. Efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Imatges representatives de la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després del tractament amb vasopressina (10 nM) durant 24 h. A la primera fila, en color verd, es mostren les cèl·lules que han proliferat; en la fila del centre, en color vermell, es mostren les cèl·lules totals; i a la darrera fila, en groc, s'observa la colocalització de les cèl·lules que han proliferat i de les cèl·lules totals.

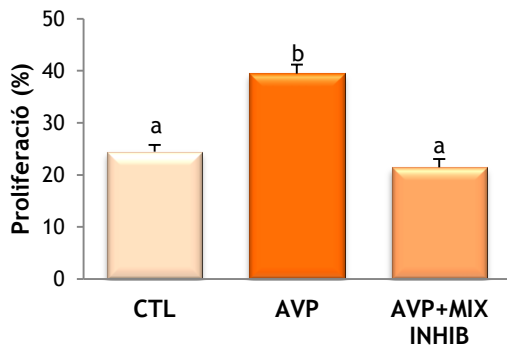


Figura 4.33. Quantificació de l'efecte de la vasopressina sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Quantificació de la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co tractades amb vasopressina 10 nM durant 24 h. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.2.2. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES D'ADHESIÓ

El tractament amb vasopressina durant 24 h no canvia l'expressió de la cadherina 11 als CCD-18Co (Figura 4.34).

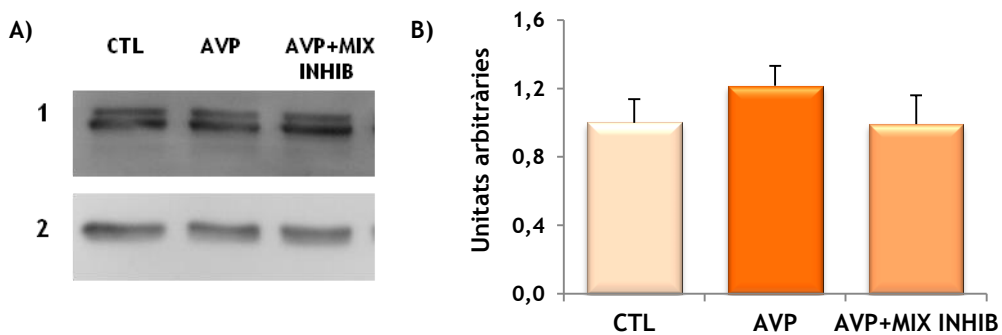


Figura 4.34. Efecte de la vasopressina sobre l'expressió de la cadherina 11 de les cèl·lules CCD-18Co. Les cèl·lules s'han incubat amb vasopressina (10 nM) durant 24 h. A) Imatges representatives del Western Blot de la cadherina 11 (110 kDa, línia 1) i la GAPDH (37 kDa, línia 2). Les condicions són: CTL, AVP i AVP+MIX INHIB. B) Quantificació de l'expressió de la cadherina 11 després de 24 h d'haver aplicat la vasopressina 10 nM a les cèl·lules CCD-18Co. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

3.2.3. EXPRESSIÓ GÈNICA DEL PDGFA, EL PDGFB I L'EGF

S'ha estudiat l'expressió de diferents factors de creixement que podrien estar implicats en la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Els factors de creixement estudiats han estat: PDGFA, PDGFB i EGF. El tractament amb la vasopressina incrementa l'expressió del PDGFA un 20%

($P < 0,05$; **Figura 4.35**). En canvi, quan els CCD-18Co són pre-incubats amb els inhibidors dels dos receptors de la vasopressina, l'expressió del PDGFA és similar a l'observat a les cèl·lules de la condició CTL ($P < 0,05$; condició AVP+MIX INHIB). En canvi, la vasopressina no afecta l'expressió del PDGFB ni la de l'EGF.

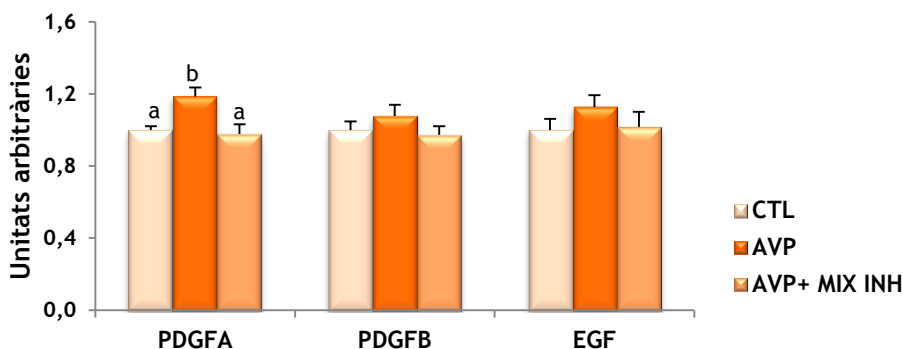


Figura 4.35. Efecte de la vasopressina sobre l'expressió del PDGFA, el PDGFB i l'EGF de les cèl·lules CCD-18Co. S'ha determinat l'mRNA d'aquests factors a les cèl·lules CCD-18Co que s'han incubat amb vasopressina 10 nM durant 18 h. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.1.1. ADDICIÓ DEL PDGFA DE FORMA EXÒGENA

Vist que el tractament amb vasopressina estimula les cèl·lules CCD-18Co a les 24 h i modifica l'expressió del PDGFA, s'ha analitzat l'addició d'aquest factor en el medi de cultiu. Així doncs, l'addició exògena del PDGFA sobre les cèl·lules CCD-18Co n'incrementa la proliferació cel·lular fins a valors de $26,23 \pm 1,80$ (condició PDGFA) mentre que els CCD-18Co no tractats la proliferació cel·lular és de $17,53 \pm 0,97$ (condició CTL; $P < 0,05$; **Figura 4.36**). D'altra banda, si les cèl·lules CCD-18Co són pre-incubats amb l'anticòs neutralitzant del PDGFA (α -PDGFA) o bé amb l'inhibidor del receptor del PDGF (AG1296) juntament amb la vasopressina, la proliferació cel·lular és similar a la de la condició CTL. Ara bé, la incubació de l' α -PDGFA o l'AG1296 sobre les cèl·lules CCD-18Co sense la presència de la vasopressina no modifica la proliferació cel·lular i s'obtenen valors similars als de la condició CTL (resultats no mostrats).

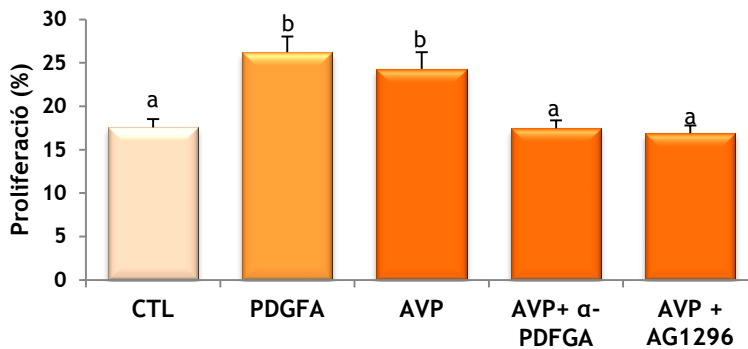


Figura 4.36. Efecte del PDGFA sobre la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Les cèl·lules s’han incubat amb vasopressina 10 nM o PDGFA 10 ng/mL durant 24 h. Els inhibidors, α -PDGFA (0,1 μ g/mL) i AG1296 (5 μ M), s’han afegit 45 min abans de l’addició de la vasopressina. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.2.4. VIES D’ACCIÓ DE LA VASOPRESSINA

Per estudiar quines vies poden estar implicades en la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co tractades amb la vasopressina, s’han pre-incubat les cèl·lules amb un inhibidor selectiu de la MEK1 (PD98059) i amb un inhibidor de la PI3K (LY294002) abans d’afegir-hi la vasopressina. Ambdós inhibidors bloquegen la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co en presència de la vasopressina ($P < 0,05$ en ambdós casos; **Figura 4.37**). La incubació de les cèl·lules CCD-18Co amb els inhibidors sols presenten una proliferació cel·lular similar a l’observada en les de la condició CTL (resultats no mostrats).

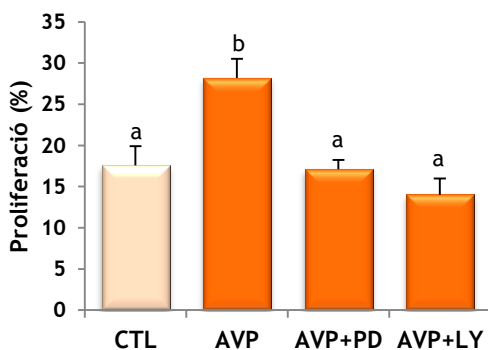


Figura 4.37. Proliferació de les cèl·lules CCD-18Co després de 24 h del tractament amb vasopressina i els inhibidors de les vies Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT. Les cèl·lules CCD-18Co han estat pre-incubats amb un inhibidor selectiu de MEK1 (PD98059, 10 μ M) i amb un inhibidor de PI3K (LY294002, 10 μ M) 45 min abans de l’addició de la vasopressina 10 nM. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.2. EFECTES DEL MEDI CONDICIONAT SOBRE CÈL·LULES T84

Tot i que les cèl·lules T84 no han respost al tractament directe amb vasopressina s'ha estudiat els efectes del CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubats amb vasopressina sobre les cèl·lules T84. A continuació es mostren els resultats de la proliferació de les cèl·lules T84 i les proteïnes del complex d'unió.

3.2.1. PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES T84 TRACTADES AMB EL MEDI CONDICIONAT

El CM provinent dels CCD-18Co tractats amb la vasopressina (CM-AVP) augmenta la proliferació de les cèl·lules T84 un 46% ($P < 0,05$; **Figura 4.38**) i aquest efecte és inhibit quan el CM prové de cèl·lules CCD-18Co incubades amb la vasopressina i els inhibidors dels seus receptors ($P < 0,05$).

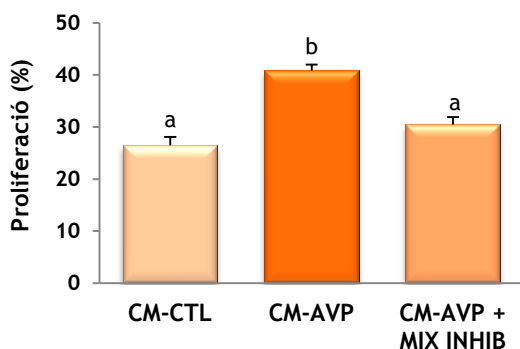


Figura 4.38. Efectes del medi CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina i els inhibidors dels seus receptors sobre la proliferació de les cèl·lules T84. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM provinent de cèl·lules CCD-18Co de les condicions CTL (CM-CTL), AVP (CM-AVP) o AVP+MIX INHIB (CM-AVP+MIX INHIB). Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

Per saber si l'efecte del CM-AVP és degut a l'increment de PDGFA, primerament s'ha afegit PDGFA a diferents concentracions al CM-CTL provinent de les cèl·lules CCD-18Co de la condició CTL. La incubació de les cèl·lules T84 durant 24 h amb aquest CM modificat incrementa la proliferació cel·lular depenent de la concentració de PDGFA exogen ($P < 0,05$, $R = 0,9784$) (**Figura 4.39**).

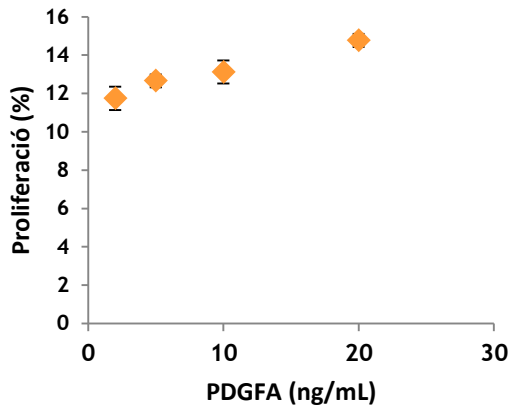


Figura 4.39. Correlació entre la proliferació de les cèl·lules T84 i la concentració del PDGFA. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM-CTL amb diferents concentracions de PDGFA. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

Per comprovar que el PDGFA és el responsable dels efectes observats en les cèl·lules T84 s'ha modificat el CM procedent de les cèl·lules CCD-18Co tractats amb vasopressina. L'addició del PDGFA estimula significativament la proliferació cel·lular de les cèl·lules T84 de forma similar a la vasopressina ($P < 0,05$; Figura 4.40). En canvi, l'addició de l'anticòs neutralitzant del PDGFA (α -PDGFA) o l'inhibidor del PDGFR (AG1296) al CM-AVP inhibeix l'efecte del CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co tractades amb vasopressina ($P < 0,05$ ambdós casos).

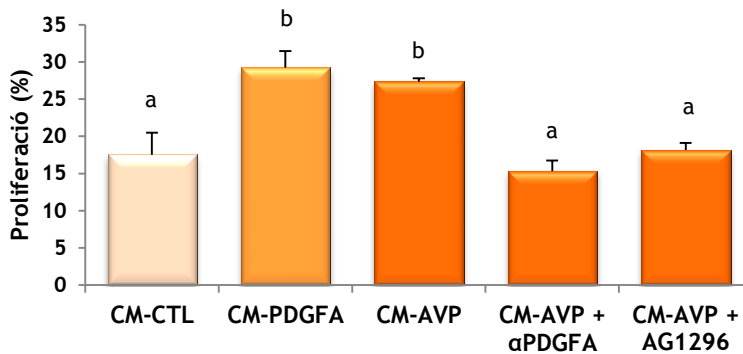


Figura 4.40. Efecte de l'anticòs α -PDGFA i l'inhibidor del PDGFR al CM sobre la proliferació de les cèl·lules T84. Les cèl·lules T84 s'han incubat durant 24 h amb el CM-CTL amb PDGFA (10 ng/mL) o amb el CM-AVP (que prové de cèl·lules CCD-18-Co tractades amb vasopressina 10 nM) al que se li ha afegit l' α -PDGFA (0,1 μ g/mL) i l'inhibidor del PDGFR (AG1296, 5 μ M). Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres. Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives, $P < 0,05$.

3.2.2. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DEL COMPLEX D'UNIÓ

La incubació de les cèl·lules T84 amb el CM provinent de les cèl·lules CCD-18Co tractades amb vasopressina (CM-AVP) no modifica l'expressió de proteïnes del complex d'unió (Figura 4.41). En canvi, la incubació de les cèl·lules T84 durant 48 h amb el CM-AVP incrementa l'expressió de la claudina IV i la β -catenina al voltant del 25% ($P < 0,05$ en ambdues proteïnes; Figura 4.42). Aquest efecte no s'observa quan les cèl·lules T84 són tractades amb el CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb la vasopressina i els inhibidors dels seus receptors.

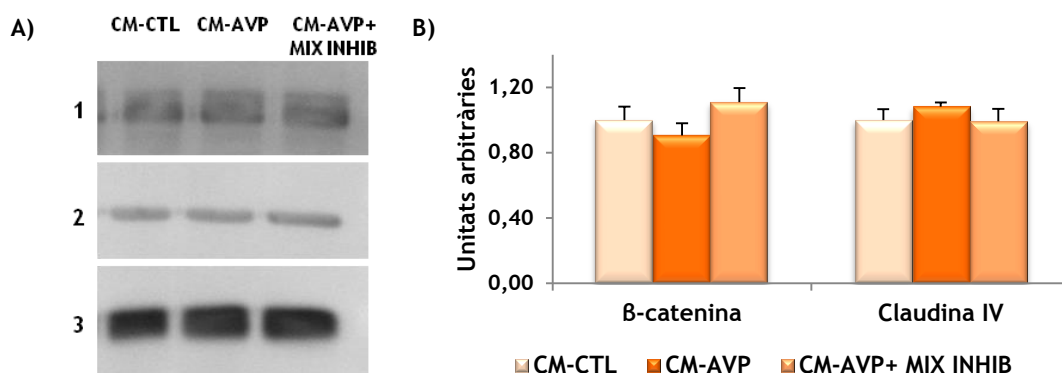


Figura 4.41. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 24 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina. A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). Les condicions són: CM-CTL (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co CTL), CM-AVP (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb AVP 10 nM) i CM-AVP+MIX INHIB (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb AVP 10 nM i els inhibidors dels seus receptors). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV després de 24 h d'haver aplicat els diferents CM a les cèl·lules T84. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

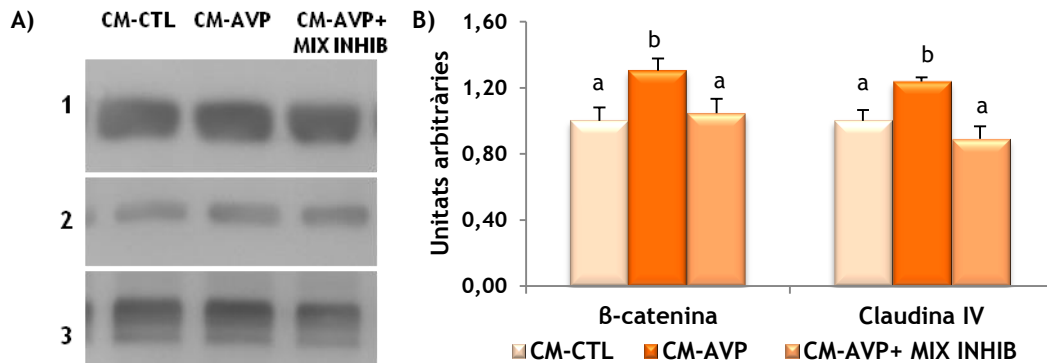


Figura 4.42. Expressió de proteïnes del complex d'unió de les cèl·lules T84 tractades durant 48 h amb CM provinent de cèl·lules CCD-18Co incubades amb vasopressina. A) Imatges representatives del Western Blot de la β -catenina (92 kDa, línia 1), la claudina IV (22 kDa, línia 2) i la GAPDH (37 kDa, línia 3). Les condicions són: CM-CTL (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co CTL), CM-AVP (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb AVP 10 nM) i CM-AVP+MIX INHIB (CM provinent de cèl·lules CCD-18Co tractades amb AVP 10 nM i els inhibidors dels seus receptors). B) Quantificació de l'expressió de la β -catenina i claudina IV després de 48 h d'haver aplicat els diferents CM a les cèl·lules T84. Els resultats són representatius de 3 experiments diferents i estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de 7-8 mostres.

3.3. ACCIÓ *IN VIVO* DE LA VASOPRESSINA

3.3.1. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL

Una vegada hem determinat que l'efecte de la vasopressina està mediat pel PDGFA, s'ha procedit a estudiar si també incrementa en un model de deshidratació en rata. Aquest model de deshidratació es caracteritza per un increment important de la concentració sèrica d'aquesta hormona.

S'ha realitzat un control de pes dels animals diari des del dia que se'ls fa el canvi a dieta amb baix contingut de Na^+ fins al dia del sacrifici. La taula 4.2 mostra els pesos del primer dia LS per cada un dels grups, el pes al dia del sacrifici i els canvis de pes dels animals a 3 dies amb LS. El pes inicial és similar en tots els grups i tal i com es veu a la taula, la deshidratació comporta una pèrdua de pes en tots els grups.

Grups	Pes inicial (g)	Pes final (g)	Canvi de pes (g)
HSD	231,7 ± 2,59	222,5 ± 1,19 a	-9,2 ± 1,49 a
LSD	237,7 ± 5,15	226,7 ± 3,90 a	-11,0 ± 2,86 a
LSD+CAP	233,7 ± 3,61	213,0 ± 3,24 b	-20,7 ± 1,31 b
LSD+CAP+ MIX	225,0 ± 0,59	209,5 ± 3,50 b	-15,5 ± 2,99 a,b

Taula 4.2. Evolució del pes corporal dels animals en un model de deshidratació. Hi ha el pes inicial del primer dia LS, el pes del dia del sacrifici i l'increment de pes dels tres dies amb dieta LS. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 4 animals.

3.3.2. EXPRESSIÓ GÈNICA DEL PDGFA EN MUCOSA DE CÒLON

En els animals sotmesos al model de deshidratació no s'ha modificat l'expressió de l'mRNA del PDGFA en la mucosa de còlon a les 24 h d'haver iniciat la deshidratació en cap de les condicions estudiades (Figura 4.43).

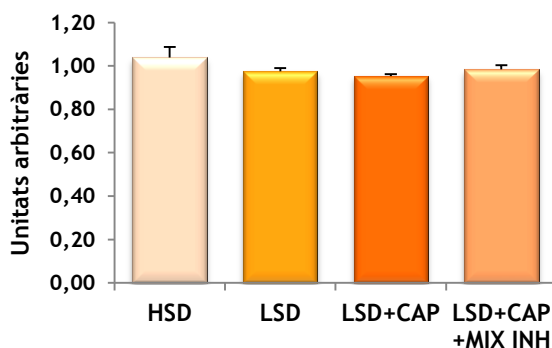


Figura 4.43. Expressió del PDGFA a la mucosa de còlon de rates sotmeses a una deshidratació. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 4 animals.