

---

**EFFECTES DELS INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA EN  
CÈL·LULES HEPÀTIQUES I EL SEU PAPER EN LA  
INFLAMACIÓ I FIBROSI HEPÀTICA EXPERIMENTAL**

Anna Planagumà Ferrer

---

***Material i mètodes***

---



## 3 MATERIAL I MÈTODES

---

A continuació es detallen els materials i mètodes de les tècniques utilitzades que no han quedat del tot detallats en la secció de *material i mètodes* dels articles.

### 3.1 AÏLLAMENT DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES

Els hepatòcits, les cèl·lules de Kupffer (KCs) i les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSCs) es van aïllar de rates *Wistar* mascle segons el mètode de perfusió *in situ* amb col·lagenasa descrit per *Berry i Friend* [310] i *Seglen* [311], i modificat posteriorment per *Titos et al.* [164].

#### Material

- Bomba peristàltica de perfusió Masterflex model 7518-00 (*Cole Parmer*)
- Bany termostàtic (*Unitronic OR*)
- Centrífuga refrigerada model 3K15 (*Sigma Laborzentrifugen*)
- Incubador de CO<sub>2</sub> (*Nuaire US Autoflow*)
- Material de cirurgia estèril: estisores, pinces (*Aesculap*) i seda trenada 2/0 (*Sutures Aragó*)
- Filtres cel·lulars de nylon de 100 mm, tubs de 50 ml de polipropilè, tubs de 15 ml de poliestirè (*Falcon*)
- Filtres de xeringa de 0.22µm (*Millex, Millipore*)
- Unitats de filtració Stericup de 0.22µm (*Millipore*)
- Plaques de cultiu estèrils de 60 i 100 mm (*Corning*<sup>®</sup>)
- Lab-Tek<sup>®</sup> Chamber slide Permanoux (*Nalge Nunc International*)
- Hanks sense calci ni magnesi (HBSS<sup>-</sup>), DPBS sense calci i magnesi (DPBS<sup>-</sup>) i amb calci i magnesi (DPBS<sup>++</sup>) (*BioWhittaker*)
- HEPES (*Merck*)
- EGTA i albúmina sèrica bovina (*Sigma*)
- CaCl<sub>2</sub>, DNasa I i colagenasa A (*Roche*)
- Percoll (*Amersham Biosciences*)
- E de Williams (*Sigma*)
- DPBS (10x), RPMI 1640, L-glutamina, Penicilina/streptomycina i FCS (*Gibco*)

Medis de perfusió. Es preparen dues solucions mares que es barrejaran a l'hora de preparar els medis finals de perfusió:

- Solució A: 10mM HEPES + 1mM EGTA en HBSS<sup>-</sup>

- Solució B: 10 mM HEPES + 2 mM CaCl<sub>2</sub> en HBSS<sup>-</sup>

Es preparen 200 ml de cada solució concentrada 10x i 5x respectivament:

- Solució A 10x: 4.76 g HEPES + 0.76 g EGTA

- Solució B 5x: 2.38 g HEPES + 0.96 g CaCl<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O

Medis finals de perfusió:

- Medi 1 (Medi de rentat): 30 ml solució A 10x + 270 ml HBSS<sup>-</sup> (pH 7.4 i filtrar).

- Medi 2 (0.5% BSA): 12.5 ml solució A 10x + 112.5 ml HBSS<sup>-</sup> + 0.625 g BSA (pH 7.4 i filtrar).

- Medi 3 (col·lagenasa): 25 ml solució B 5x + 100 ml HBSS<sup>-</sup> + 0.625 g col·lagenasa (pH 7.4 i filtrar). Si el fetge és cirròtic s'incrementarà un 20% la quantitat de col·lagenasa.

- Medi 4 (Dnasa): 20 ml solució B 5x + 80 ml HBSS<sup>-</sup> + 0.5 g BSA + 0.001 g Dnasa (pH 7.4 i filtrar).

- Medi 5 (1% BSA): 40 ml solució B 5x + 160 ml HBSS<sup>-</sup> + 2g BSA (pH 7.4 i filtrar).

Gradient de Percoll (cal mantenir tots els gradients a 4°C)

100% percoll: 90 ml percoll + 10 ml PBS<sup>++</sup> 10x

60% percoll: 60 ml percoll 100% + 40 ml PBS<sup>-</sup> 1x

50% percoll: 30 ml percoll 100% + 30 ml PB<sup>-</sup> 1x

25% percoll: 20 ml percoll 100% + 30 ml PBS<sup>-</sup> 1x

Abans de la perfusió es col·loquen els medis al bany termostàtic a 37°. Mentrestant s'atemperen els medis s'anestesia la rata amb una injecció intramuscular de ketamina (50mg/kg pes corporal). Es col·loca l'animal al damunt de la taula d'operacions i es fixen les extremitats. Es situa un tub de 50 ml a sota la columna vertebral de l'animal amb la intenció de deixar més visible la vena porta per tal de poder-la canular amb més facilitat. Es secciona l'abdomen longitudinalment fins arribar al tòrax. Seguidament es desplaça l'intestí cap a la dreta de la cavitat abdominal utilitzant palets de cotó estèrils. Es localitza la vena porta i es prepara un nus (sense tancar-lo) amb el fil de sutura (2/0) per sobre la bifurcació de la vena mesentèrica superior. Tot seguit es fa un altre nus per sota de la bifurcació tancant així el flux de sang intestinal al fetge. Es localitza la porció abdominal de la vena cava inferior (a nivell dels ronyons) i es prepara un altre nus (sense tancar-lo). A continuació s'introdueix la cànula per la vena porta, fent una incisió a la vena amb una agulla de 23G abans d'introduir el catèter de polietilè (0.58 mm ID, 0.96 mm OD) associat al circuit de perfusió. Es tanca el nus preparat a la vena porta el qual subjectarà el catèter i el fixarà a la vena (**Figura 26**).



**Figura 26.** Canulació de la vena porta de rata.

Es fan passar 0.9 ml d'heparina (1000 UI/ml) pel catèter i es comença la perfusió no recirculant amb el medi de rentat (Medi 1) durant 10 minuts. La velocitat de perfusió es determina a 14 ml/min. Es realitza una incisió a nivell de la porció abdominal de la vena cava inferior per tal que la pressió del sistema no augmenti i no malmeti el fetge. Ràpidament s'obre el tòrax i s'introdueix un altre catèter a través de l'aurícula dreta en la porció toràcica de la vena cava inferior. Cal fixar el catèter amb un doble nus. Finalment es tenca el sistema de perfusió a nivell de la porció abdominal de la vena cava inferior, on abans havíem preparat la seda pel nus. Cal tancar per sobre de la incisió practicada amb l'agulla. S'aplica una perfusió no recirculant amb el medi del 0.5% BSA (Medi 2) durant 5 minuts seguit d'una perfusió recirculant amb el medi de col·lagenasa (Medi 3) de 10 a 15 minuts. Un cop el fetge ja té un aspecte més flonjo a causa de la digestió de la col·lagenasa, s'escindeix, es treu de la cavitat abdominal i es col·loca en una placa de Petri estèril amb el medi de Dnasa (Medi 4). Cal realitzar, a partir d'aquest moment, tot el procés a sota campana de flux laminar en condicions estèrils. Es troceja el fetge eliminant tots els vasos possibles i la càpsula de Glisson. Es passa l'homogenat amb el medi de Dnasa (Medi 4) a un erlenmeyer estèril i s'incuba en un bany termostàtic a 37°C amb agitació durant 10 min. Es filtra l'homogenat hepàtic a través dels filtres de nylon de 100  $\mu\text{m}$  amb l'ajuda del medi fred de BSA a l'1% (Medi 5). Es recull el filtrat en quatre tubs de 50 ml estèrils. Cal tenir en compte de realitzar tot el procés a 4°C. Un cop tenim els 4 tubs plens es centrifuga el filtrat a 100 g (rotor basculant) a 4°C durant 5 minuts.

Mirant al tub s'observen fàcilment les dues fraccions:

- el pellet: que conté bàsicament hepatòcits.
- el sobrenadant que conté bàsicament cèl.lules no parenquimals (NPC1).

### 3.1.1 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ D'HEPATÒCITS

Es resuspèn el pellet obtingut en l'apartat anterior amb DPBS<sup>-</sup> i es centrifuga a 100 g a 4°C durant 5 minuts. Es guarda el sobrenadant enriquit amb cèl·lules no parenquimals (NPC2) a 4°C. Es resuspèn el pellet d'hepatòcits amb DPBS<sup>-</sup> i seguidament es centrifuga a 100 g a 4°C durant 5 minuts. Es descarta el sobrenadant i es resuspèn els pellets amb 25 ml de DPBS<sup>-</sup>. Tot seguit s'apliquen 2 ml de la suspensió a sobre un coixí de 7.5 ml de percoll al 60% en tubs de 15 ml de poliestirè. Es centrifuga a 400 g a 4°C durant 10 minuts. Es descarta el sobrenadant, es resuspèn el pellet amb DPBS<sup>-</sup> i es centrifuga a 100 g a 4°C durant 5 minuts (dues vegades). Seguidament es procedeix al comptatge (veure apartat 3.2.ii decultius cel·lulars) de les cèl·lules i es cultiven en plaques de Petri estèrils prèviament recobertes amb col·lagen R en medi E de Williams suplementat (\*). Les cèl·lules es deixen a l'incubador unes 4 hores, temps suficient perquè la majoria de cèl·lules s'adhereixin al col·lagen i a continuació s'aspira el medi de cultiu i es renta suaument amb DPBS<sup>++</sup> (dues vegades). Finalment afegim medi E de Williams fresc i incubem tota la nit a l'incubador en atmosfera de CO<sub>2</sub>.

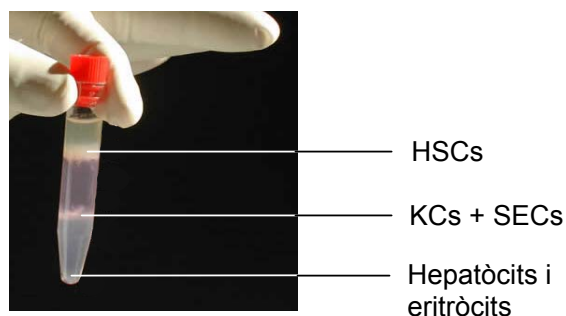
#### (\*Recobriments de plaques amb col·lagen)

Es preparen en condicions estèrils 30 ml de col·lagen R (Serva) al 0.03% en DPBS<sup>++</sup> i a sota campana s'obren les plaques de Petri i s'afegeixen 2 ml de col·lagen 0.03% (P-60) o 3 ml (P-100). Es reparteix bé la solució de col·lagen per tota la placa. S'incuba a 37°C durant 1 hora. Es treu el col·lagen i s'afegeix DPBS<sup>++</sup> a la placa de cultiu per evitar que s'assequi el col·lagen. Si les plaques no s'utilitzen immediatament es guarden a 4°C.

### 3.1.2 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES DE KUPFFER

El primer que cal fer és rentar d'hepatòcits la suspensió de cèl·lules no parenquimals centrifugant els sobrenadants de cèl·lules no parenquimals (NPC1 i NPC2) a 100 g a 4°C, 5 min (mínim 5 vegades). Es centrifuguen els sobrenadants de NPC a 800 g a 4°C durant 10 min i tot seguit es descarten els sobrenadants i s'ajunten tots els pellets cel·lulars en un tub de polipropilè de 50 ml. Es dilueix el pellet de NPC amb 40 ml de DPBS<sup>-</sup> fred.

Cal preparar amb antelació el gradient de percoll: 50% / 25% en 12 tubs de poliestirè de 15 ml afegint amb molt de compte a sobre de 5 ml de percoll del 50%, 6.6 ml de percoll del 25%. Una vegada tenim el gradient preparat, afegim 3.3 ml de NPCs a sobre el percoll del 25% i es centrifuguen els tubs a 800 g durant 25 minuts a 4°C en una centrífuga de capçals basculants, amb acceleració i desacceleració zero. Les cèl·lules hepàtiques queden distribuïdes en diferents anells al llarg del gradient de percoll (**Figura 27**).



**Figura 27.** Cèl·lules hepàtiques al llarg del gradient de percoll.

El primer anell que trobem és el de HSCs el qual l'aspirem amb una pipeta Pasteur de plàstic estèril. Recollim l'anell que ve a continuació el qual en realitat està format per dos anells, el de les SECs i el de les KCs, en tubs de 50 ml. S'han de recollir els dos anells junts a causa de que tenen densitats similars. S'afegeix DPBS<sup>-</sup> fred fins a 50 ml i es centrifuga a 800 g durant 10 minuts a 4°C. A continuació descartem el sobrenadant i es resuspèn el pellet amb aproximadament 6 ml de medi de cultiu RPMI 1640 sense FBS. Finalment es compten les cèl·lules amb la cambra de Neubauer. Cal tenir en compte que el número total de cèl·lules serà la suma de SECs més KCs. Es cultiven les cèl·lules a sobre de plaques de plàstic en medi RPMI 1640 sense FBS durant 1 hora a 37°C, després es renten les plaques amb DPBS<sup>-</sup> (quatre vegades) per tal d'eliminar les cèl·lules que no s'han enganxat i per tant descartar les que no són KCs. S'incuben les cèl·lules amb medi fresc suplementat (veure apartat medis de cultiu 3.2.1) a l'incubador en atmosfera de CO<sub>2</sub>. Per acabar cal caracteritzar les cèl·lules de Kupffer mitjançant la tinció de l'activitat esterasa no específica (mètode del  $\alpha$ -naftol) (Servei d'Hematopatologia de l'Hospital Clínic) i mitjançant el marcatge amb l'anticòs de macròfags residents ED-2.

### 3.1.3 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES ESTRELLADES

Com que l'aïllament de les HSCs difereix una mica de l'aïllament de les KCs i dels hepatòcits a continuació s'especifica el material utilitzat i la tècnica.

#### Material

- Bomba peristàltica de perfusió Masterflex model 7518-00 (*Cole Parmer*)
- Bany termostàtic (*Unitronic OR*)
- Centrífuga refrigerada model 3K15 (*Sigma Laborzentrifugen*)
- Incubador de CO<sub>2</sub> (*Nuair US Autoflow*)



- Material de cirurgia estèril: estisores, pinces (*Aesculap*) i seda trenada 2/0 (*Sutures Aragó*)
- Filtres cel·lulars de nylon de 100 µm, tubs de 50 ml de polipropilè, tubs de 15 ml de poliestirè (*Falcon*)
- Unitats de filtració Stericup de 0.22 µm (*Millipore*)
- Plaques de cultiu estèrils de 60 mm (*Corning*<sup>®</sup>)
- Lab-Tek<sup>®</sup> Chamber slide Permanoux (*Nalge Nunc International*)
- HBSS<sup>-</sup>, DPBS<sup>-</sup> (*BioWhittaker*)
- Gey's balanced salt solution (GBSS) (*Sigma*)
- Iscove's modified Dulbecco's medium (*Biological industries*)
- Col·lagenasa (tipus A), pronasa, DNasa (*Roche*)
- L-glutamina, penicilina/streptomocina, FCS (*Gibco*), piruvat sòdic i aas no-essencials (*Gibco*)
- Nycodenz (*Sigma*)

Rates *Wistar* mascle es perforonen segons el mètode de perfusió *in situ* amb pronasa i col·lagenasa. El mètode consisteix en perfondre els fetges amb HBSS sense Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> a través de la vena porta durant 20 minuts a un fluxe de 14 ml/min a 37°C. Es passa GBSS amb 0.003% DNasa, 0.02% col·lagenasa durant 10 minuts (tipus A) i 0.2% pronasa. A continuació s'escindeix i es troceja el fetge, agitant a 37°C durant 10 minuts amb GBSS amb 0.003% DNasa, 0.006% collagenasa i 0.02% pronasa. Les cèl·lules es dispersen passant-les pels filtres de nylon (100 µm). Tot seguit es centrifuga la suspensió cel·lular a 1000 g durant 10 minuts a temperatura ambient. Es resuspen el pellet, que conté principalment cèl·lules no-parenquimals, amb GBSS i es centrifuga a 1000 g durant 10 minuts a temperatura ambient. Es resuspen de nou el pellet en GBSS i es centrifuga a 1000 g durant 15 minuts a través del gradient de Nycodenz al 14% a temperatura ambient. Es Plaqueja l'interfase del gradient, que conté HSC, en plaques de cultiu de 60 mm i s'incuba a 37°C en medi Iscove's en un incubador humidificat al 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Cal mantenir els cultius d'HSCs fins al pròxim passe (durant 4-6 dies), fins que mostren característiques morfològiques pròpies d'HSC activades en cultiu.

### **3.2 CULTIUS CEL·LULARS**

#### **i. Normes generals**

La manipulació de les cèl·lules en cultiu ha de seguir unes normes molt estrictes de neteja. Es treballa sempre a dins de campana de flux vertical que es neteja amb etanol del 70% abans de començar a treballar. La utilització de flama a dins de la campana és opcional. Per evitar

contaminacions no s'han de passar les mans ni qualsevol objecte no estèril per sobre el material estèril. Els medis de cultiu, les solucions i tots els materials que entren en contacte amb les cèl·lules han d'estar esterilitzats, o bé per filtració amb filtres de 0.22 µm de diàmetre de porus o per altres mètodes com l'autoclau, la irradiació, etc. Aquestes condicions només es mantenen quan les botelles s'obren i es tanquen a dins la campana. A més, aquestes solucions s'atemperen a 37°C abans de ser utilitzades. Les restes biològiques es tracten amb lleixiu al 30% i els materials utilitzats s'autoclaven. Una vegada finalitzat el treball a dins la campana es neteja la superfície amb etanol al 70% i es redueix el flux a les condicions de manteniment.

## ii. Comptatge de cèl·lules

La cambra de Neubauer és una cambra de recompte adaptada al microscopi de camp clar o al de contrast de fases. Per determinar la viabilitat cel·lular s'utilitza la tinció de les cèl·lules amb blau de tripà. El blau de tripà és un colòide que s'introdueix a l'interior de les cèl·lules que presenten trencaments en la membrana. Per preparar 100 ml de solució, es necessiten 0.4 g de blau de tripà (Sigma), 0.81 g de NaCl i 0.66 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Aquesta solució s'ajusta a un pH de 7,3 amb NaOH 1N. Les cèl·lules mortes incorporen el colorant (el citoplasma i el nucli es tenyeixen de blau) y les cèl·lules intactes no.

### 3.2.1 MEDIS DE CULTIU

A continuació es detallen els components dels diferents medis de cultiu utilitzats en les incubacions dels diferents tipus cel·lulars:

- Cultiu primari d'hepatòcits de rata: medi E de Williams suplementat amb el 10% (v/v) de sèrum fetal boví inactivat (FCS), 2 mM L-Glutamina, 50 UI/ml Penicil·lina / 50 µg/ml estreptomicina, 1 µM insulina, 15 mM HEPES.
- Cultiu primari de KCs: medi RPMI 1640 suplementat amb el 10% (v/v) de FCS, i 50 UI/ml Penicil·lina / 50 µg/ml estreptomicina.
- Cultiu de la línia cel·lular de macròfags pulmonars de rata CRL-2192: medi RPMI 1640 suplementat amb el 15% (v/v) de FCS, 2 mM L-Glut i 50 UI/ml penicil·lina / 50 µg/ml estreptomicina.

- Cultiu de la línia cel·lular de monòcits humans THP-1: medi RPMI 1640 suplementat amb el 10% (v/v) de FCS, 2 mM L-Glut i 100 UI/ml penicil·lina / 100 µg/ml estreptomina.
- Cultiu primari d'HSCs: Iscove's modified Dulbecco's medium suplementat amb FCS al 10%, 2 mM L-Glut, penicil·lina (50 U/ml), streptomina (50 µg/ml), insulina (100 IU/ml), 0.1 mM aas no essencials i 0.1 mM piruvat sodic.
- Cultiu de la línia cel·lular COS-7: medi DMEM suplementat amb el 10% (v/v) de FCS, 2 mM L-Glut i 50 UI/ml penicil·lina / 50 µg/ml estreptomina.

### 3.2.2 INCUBACIONS CEL·LULARS

#### 3.2.2.1 CRL-2192

##### Incubació A

Es fa créixer la línia cel·lular de macròfags de rata, CRL-2192, ( $1 \times 10^6$  cèl·lules/ml) en plaques de 24 pous. Es deixen les cèl·lules en medi sense sèrum (SFIF) durant una hora prèviament a la incubació amb eicosanoids i antiinflamatoris. A continuació s'exposen les cèl·lules a vehicle (0.1% etanol), a concentracions creixents d'ASA (0.1-5 mM), LXA<sub>4</sub>, (100 nM), PGE<sub>2</sub> (300 nM) i LXA<sub>4</sub> (100 nM) en combinació amb PGE<sub>2</sub> (300 nM) durant 20 minuts a 37°C. Una vegada acabades les incubacions es congelen els sobrenadants de les CRL-2192 a -20°C.

Es determinarà la concentració de LTB<sub>4</sub> per EIA i l'activitat de la 5-LO per HPLC. Per la determinació de l'activitat de la 5-LO la reacció d'incubació es para amb 2 volums de metanol fred i abans de l'incubació amb ASA les cèl·lules s'estimulen amb la proteïna estimuladora de macròfags (MSP) a 1 nM durant 24 hores.

##### Incubació B

Es plaquegen  $1 \times 10^5$  cèl·lules/pou en plaques de 24 pous amb 1 ml de medi RPMI 1640 complet a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. S'incuben les cèl·lules en medi SFIF durant 1 hora i seguidament s'incuben en presència de vehicle (0.5% etanol) o concentracions creixents de l'inhibidor selectiu de COX-2, SC-236, (10, 15 i 25 µM) durant 6-24 hores a 37°C. Posteriorment es determinarà el creixement cel·lular per MTT.

##### Incubació C

Es plaquegen les CRL-2192 en portes de 8 pous (8-well Lab-Tek® Chamber Slides™) amb 100 µl de medi RPMI 1640 complet a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Es deixen les cèl·lules

en medi SFIF durant 1 hora i seguidament s'incuben en presència de vehicle (0.5% etanol), 1% ethanol, concentracions creixents d'SC-236 (25 i 50  $\mu\text{M}$ ), 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) i SC-236 (25  $\mu\text{M}$ ) en combinació amb 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) durant 6 hores per la determinació d'apoptosi.

### 3.2.2.2 Cèl.lules de Kupffer

#### Incubació A

Un cop aïllades les KCs de rata es plaquegen en plaques de 48 pous i s'incuben tota la nit en medi amb sèrum. Al dia següent es deixen una hora en medi SFIF i s'exposen a continuació a vehicle (0.1% etanol), a ASA (1 i 5 mM), a l'inhibidor selectiu de COX-1, SC-560, 3  $\mu\text{M}$  i a l'inhibidor selectiu de COX-2, celecoxib, 3  $\mu\text{M}$  durant 20 minuts a 37°C. S'estimulen posteriorment amb 2  $\mu\text{M}$  de ionòfor de Ca<sup>2+</sup> (A23187 Sigma) durant 20 minuts a 37°C. Es congelen els sobrenadants de les cèl.lules de Kupffer a -20°C i es determina la concentració de PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> i 15-epi-LXA<sub>4</sub> per enzim- immunoassaig específic.

#### Incubació B

Es plaquegen les KCs aïllades de rata en portes de 8 pous (8-well Lab-Tek® Chamber Slides™) amb 100  $\mu\text{l}$  de medi RPMI 1640 complet a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> i es deixen tota la nit. Al dia següent es canvia el medi a SFIF una hora abans de les incubacions amb vehicle (0.5% etanol), 1% ethanol, concentracions creixents d'SC-236 (25 i 50  $\mu\text{M}$ ), 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) i SC-236 (25  $\mu\text{M}$ ) en combinació amb 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ). S'incuben els inhibidors i els eicosanoids durant 6 hores per l'estudi d'apoptosi.

### 3.2.2.3 Hepatòcits

Els hepatòcits aïllats de rata (3-12x10<sup>6</sup> cèl.lules/ml) es fan créixer en plaques de Petri de 100 mm recobertes de col·lagen amb medi complet (amb sèrum). S'incuben durant 1 hora les cèl.lules amb medi SFIF i a continuació s'exposen les cèl.lules a vehicle (0.1% etanol), ASA (1 mM), LTB<sub>4</sub> (1  $\mu\text{M}$ ), 15-epi-LXA<sub>4</sub>-metilèster (1  $\mu\text{M}$ ), Wy-14643 (0.1  $\mu\text{M}$ ), PGE<sub>2</sub> (0.3  $\mu\text{M}$ ), PGE<sub>2</sub> (0.3 mM) en associació amb LTB<sub>4</sub> (1  $\mu\text{M}$ ), SC-560 (3  $\mu\text{M}$ ) o celecoxib (3  $\mu\text{M}$ ) en medi sense sèrum durant 24 hores a 37°C. Finalment es recull el sobrenadant i es congela a -20°C fins a la

posterior anàlisi de l'expressió de la proteïna del PPAR $\alpha$  per Western blot i de la concentració de CINC-1 per EIA.

#### **3.2.2.4 THP-1**

Es creix la línia cel·lular de monòcits humans, THP-1, ( $2 \times 10^6$  cèl.lules/ml) en flascons de cultius de 75 cm<sup>2</sup>. Després de la incubació en medi SFIF, s'exposen les cèl.lules a vehicle (0.1% etanol) i ASA (1 mM) durant 24 h a 37°C. Després es recull el sobrenadant i es congela a -20°C fins a la posterior anàlisi de l'expressió de la proteïna del PPAR $\alpha$  per Western blot.

#### **3.2.2.5 Cèl·lules hepàtiques estrellades**

##### Incubació A

Després de l'aïllament d'HSCs es plaquegen en plaques de 24 pous ( $5 \times 10^4$  cèl·lules/pou) amb 1 ml de medi Iscove's complet. Es deixen tota la nit amb medi amb sèrum i al dia següent s'incuben en medi SFIF durant 1 hora i seguidament en presència de vehicle (0.5% etanol), concentracions creixents d'SC-236 (10, 15 25  $\mu$ M) i rosiglitazone (5  $\mu$ M) sol o en combinació amb SC-236 (10 i 25  $\mu$ M) durant 6-24 hores a 37°C per la determinació del creixement cel·lular per MTT.

##### Incubació B

Es plaquegen les HSCs recent aïllades en portes de 8 pous (8-well Lab-Tek Chamber Slides) a una densitat de  $5 \times 10^4$  cèl·lules/pou. S'incuben en medi SFIF durant 1 hora i seguidament s'incuben en presència de vehicle (0.5% etanol), SC-236 (25  $\mu$ M), 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) i SC-236 (25  $\mu$ M) en combinació amb 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) durant 6 hores a 37°C per la determinació d'apoptosi.

### **3.3 RNA**

Quan es treballa amb RNA tant el material com els reactius que s'utilitzen cal que estiguin lliures de RNases. Per preparar tots els reactius també cal utilitzar aigua tractada amb dietilpirocarbonat (DEPC; afegir 1ml DEPC a 1 litre d'aigua destil·lada i agitar unes 8 hores).

### 3.3.1 EXTRACCIÓ PER TRIZOL

A continuació s'especifica el mètode d'extracció de RNA per Trizol en cultius cel·lulars en monocapa.

#### Material

TRIZol Reagent (*Gibco #15596-018*)

Cloroform (*Merck*)

Isopropil alcohol (*Merck*)

Etanol 75%

Aigua lliure de RNAses (aigua DEPC)

Primerament, es renten les cèl·lules amb DPBS<sup>-</sup> per eliminar les restes de medi. A continuació es lisen les cèl·lules amb 1 ml de TRIZol per placa. S'incuben els lisats a temperatura ambient durant 5 minuts i tot seguit s'afegeix 0.2 ml de cloroform per ml de TRIZol. S'agiten vigorosament els tubs durant 15 segons i s'incuben a temperatura ambient durant 3 minuts. Es centrifuga a 12000 g durant 15 minuts a 4°C i a continuació es transfereix la part superior (aquosa) a un tub nou al qual s'afegiran 0.5 ml d'isopropil alcohol per ml de TRIZol per precipitar el RNA. S'incuben les cèl·lules a temperatura ambient durant 10 minuts i es centrifuguen a 12000 g durant 10 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenadant i es renta el pellet de RNA amb 1 ml d'etanol al 75% per ml de TRIZol. Es barreja la mostra (vòrtex) i seguidament es centrifuga a 7500 g durant 5 minuts a 4°C. S'asseca el pellet de RNA a l'aire i un cop sec es dissol el RNA amb aigua DEPC. Es pot incubar el RNA extret a 60°C durant 10 minuts. Congelar el RNA a -80°C si no s'utilitza immediatament.

### 3.3.2 VALORACIÓ DE RNA

#### Material

- Espectre (*Uvikon 922 Kontron instruments* o *Ultrospec Pro 3300 Amersham Biosciences*)
- Cubetes de quars de 2 mm de pas de llum (*Hellma*)

#### Tampó

- TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)

Es dilueixen les mostres de RNA (1/70) amb tampó TE i es valoren les mostres de RNA en un aspectre a una absorbància de 260 nm de longitud d'ona. S'utilitza com a blanc el mateix tampó TE. Per la valoració s'utilitzen les cubetes de quars de 2 mm de pas de llum.

La concentració de RNA es calcula amb la fórmula següent :

$$\text{Concentració de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 70 \text{ (dilució)} \times 40 \text{ (1 unitat } A_{260} = 40 \mu\text{g/ml)}}{10^3}$$

La determinació de la puresa de el RNA s'obté mesurant el quocient entre l'absorbància a 260 nm i l'absorbància a 280 nm. El RNA pur té un quocient entre 1.9 i 2.1 en un tampó 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.

### 3.3.3 REACCIÓ DE RETROTRANSCRIPCIÓ (RT)

#### Material

- Transcriptasa inversa (AMV) (# M5101, Promega)
- Tampó de RT 5x (#M515A, Promega)
- Barreja de desoxinucleòtids trifosfat (dNTP) per PCR, 10 mM cadascun (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (subministrat amb l'enzim, Promega)
- Oligo dT<sub>15</sub> (500 μg/ml) (sintetitzats en la Unitat de DNA de l'Hospital Clínic)
- Inhibidor de RNases (40 u/μl) (Promega)
- Aigua DEPC.

A continuació s'especifiquen els volums per cada tub utilitzats en la reacció de RT:

- 4 μl tampó d'RT 5x
- 2 μl dNTPs
- 0.5 μl d'inhibidor de RNases
- 1 μl Oligo dT<sub>15</sub>
- 1.5 μl transcriptasa inversa (AMV).
- 2 μg de RNA

S'arriba fins a un volum de 20 μl amb H<sub>2</sub>O DEPC.

El programa del termociclador és el següent:

- 42°C, 45 min (reacció de RT)
- 95°C, 5 min (desnaturalització final)
- 4°C (final)

Es guarden les RTs a 4°C fins a la seva posterior utilització en la PCR.

### 3.3.4 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

#### 3.3.4.1 PCR convencional

Cal anar amb molt de compte amb les contaminacions i és aconsellable utilitzar diferents pipetes per preparar la reacció d'amplificació i per pipetejar els productes ja amplificats, de la mateixa manera que també és aconsellable utilitzar diferents habitacions per la preparació de la RT i per fer córrer els productes ja amplificats de la PCR.

#### Material

- *Taq polimerasa* (#18038-026, Invitrogen)
  - Tampó de PCR (10x, sense MgCl<sub>2</sub>).
  - dNTPs 2 mM (Promega)
  - MgCl<sub>2</sub> 50 mM
  - Aigua destil·lada
  - Encebadors\* 20 μM
  - Oli mineral (Sigma)
- \* Veure taula 1 dels encebadors utilitzats

#### Valoració dels encebadors

Cal resuspendre les mares dels encebadors amb 100 μl de tampó TE. A continuació es prepara una dilució (1/70) amb el mateix tampó TE i es valora a l'espectre a una absorbància de 260 nm. Es calcula la concentració de l'encebador segons la següent fórmula:

$$\text{Concentració d'encebadors } (\mu\text{M}) = A_{260} \times 70 \times \frac{100}{(1.5 N_A + 0.71 N_C + 1.20 N_G + 0.84 N_T)}$$

Les característiques de cada encebador es presenten en la **Taula 6**.



Gen Gen bank	Encebadors	Fragment amplificat (pb)	Volum RT / MgCl <sub>2</sub>	Condicions PCR	Nº de cicles
COX-1 GenBank: S67721	S: 5'gtcattccctgtgttactatcc-3' A: 5'ctcccctctcagcagcaatcg-3'	461	2.5 µl / 1 mM	96°C 30" 60°C 1' 72°C 1"	35
COX-2 GenBank: S67722	S: 5'acttgctcacttcggtgagtcattc-3' A: 5'-ttgattagtagctagggtaatg-3'	582	2.5 µl / 1 mM	96°C 30" 60°C 1' 72°C 1'	35
5-LO GenBank: 03960	S: 5'-tacattacctcagcctcattg-3' A: 5'-gtccactccctttcactatca-3'	468	4 µl / 0 mM	94°C 30" 58°C 1' 72°C 30"	35
FLAP GenBank: X52196	S: 5'-gggctgatgtatctgttcgtg-3' A: 5'-gcggggagatcgctggtgta-3'	211	2 µl / 0.5 mM	96°C 30" 55°C 30" 72°C 45"	35
GAPDH GenBank: X02231	S: 5'-tccctcaagattgtagca-3' A: 5'-agatccacaacggatacatt-3'	309	2.5 µl / 1 mM	96°C 30" 60°C 1' 72°C 1'	35

S: sentit, A: antisentit, pb: parell de bases.

**Taula 6.** Encebadors i condicions de les PCRs.

### 3.3.4.1.1 Electroforesi en gel d'agarosa

#### Reactius

- Tampó TAE 50x (Tris EDTA 0.5 M pH 8)
- Bromur d'etidi
- Tampó de càrrega: 30% de glicerol + 0.25% blau de bromofenol.
- Gel d'agarosa a l'1.5%

Es prepara un gel d'agarosa al 1.5%. Es pesa 0.75 g d'agarosa i es dissol en 1 ml de TAE 50x i fins arribar a 50 ml amb aigua destil·lada per tal de tenir TAE 1x. S'escalfa l'agarosa al microones i es deixa refredar abans d'afegir bromur d'etidi (7.5 µl) i evocar-la al llit d'electroforesi (col·locar prèviament les pintes al llit d'electroforesi per tal que quan es polimeritzi el gel quedin els pous definits).

Introduir el gel a la cubeta d'electroforesi i cobrir amb TAE 1x. Es barregen les mostres amb una goteta de tampó de càrrega. A l'hora de carregar es pipeteja el marcador de pes molecular en el primer pou i les mostres en els pous següents. Es connecta la cubeta d'electroforesi a la font i es posa a un voltatge de 60 V. Un cop han corregut les mostres en el gel es visualitza el gel en un transil·luminador de raigs ultraviolats.

### 3.3.4.2 PCR a temps real

#### Material

- Trizol (*Invitrogen*)
- Bioanalyzer 2100 (*Agilent*)
- Master mix (*Applied Biosystems*)
- Assay-on-demand Gene Expression Product number Rn00440945\_m1, Pparg (*Applied Biosystems*)
- Assay-on-demand Gene Expression Product number Rn00667869\_m1, Actb (*Applied Biosystems*)
- ABI Prism 7900 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*)

S'extreu el RNA pel mètode del Trizol (Veure apartat 3.3.1) i seguidament es mesura la integritat del RNA en el bioanalyzer de la Unitat de genòmica. A continuació es retrotranscriu el RNA utilitzant 1 µg de RNA (veure apartat 3.3.3) i es procedeix a l'anàlisi de l'expressió del mRNA del PPAR $\gamma$  per PCR a temps real. S'utilitzen els encebadors i les sondes dels assajos "assay-on-demand" segons les instruccions de Applied Biosystems. Les condicions tèrmiques que s'utilitzen són 50°C durant 2 min, 95°C durant 10 min, 40 cicles de 95°C durant 15 s (desnaturalització) i 60°C durant 60 s (anellament/extensió). S'analitzen les quantitats d'expressió del mRNA de PPAR $\gamma$  com a *cycle threshold* (Ct) per duplicat i es normalitzen envers la  $\beta$ -actina com a control gènic.

## 3.4 PROTEÏNA

### 3.4.1 EXPRESSIÓ PROTEICA

#### 3.4.1.1 Extracció de proteïna total

#### Material

- Politró (Ultra-Turrax T 25 basic IKA, Werke)
- Tampó de lisi:
  - 20 mM Tris-HCl pH 7.4
  - 1% triton X-100
  - 10% glycerol
  - 137 mM NaCl
  - 2 mM EDTA
- Afegir en el moment just d'utilització els inhibidors de proteases:
  - 100 µM PMSF

1 µg/ml leupeptina

1 µg/ml pepstatina A

1 µg/ml aprotinina

S'homogenitza el teixit hepàtic amb el tampó de lisi i seguidament es centrifuga el lisat a 3000 g durant 5 minuts. Es recull el sobrenadant i es descarta el pellet. A continuació es valora la concentració de la proteïna total per l'assaig MicroBCA™ .

#### **3.4.1.2 Extracció de proteïna nuclear (Mètode d'Schriberg)**

##### Material

- Centrifuga (*Kubota 2100*)

- Microcentrifuga (*Centrifuge 5415 R Eppendorf*)

- Agitador orbital (*Eppendorf*)

- DPBS<sup>-</sup>

- HEPES (*Merck*)

- KCl

- EDTA

- EGTA (*Sigma*)

- Inhibidors de proteases: DTT, PMSF, pepstatina, leupeptina, aprotinina

- NP-40

- NaCl

##### Tampons

###### *Tampó A*

10 mM HEPES pH 7.9

10 mM KCl

0.1 mM EDTA

0.1 mM EGTA

Afegir en el moment just d'utilització els inhibidors de proteases i DTT:

0.5 mM PMSF

1 µg/ml leupeptina

1 µg/ml pepstatina

1 µg/ml aprotinina

1 mM DTT

###### *Tampó C*

20 mM HEPES pH 7.9

400 mM NaCl

1 mM dTT

1 mM EDTA

1 mM EGTA

Afegir en el moment just d'utilització els inhibidors de proteases i DTT:

1 mM PMSF

1 µg/ml leupeptina

1 µg/ml pepstatina

1 µg/ml aprotinina

1 mM DTT

Es renten les cèl·lules (hepatòcits) amb 10 ml de DPBS<sup>-</sup>. Seguidament es centrifuguen a 800 g durant 5 minuts. El pellet obtingut es resuspen en 1 ml de DPBS<sup>-</sup> i es passa a un tub de 1.5 ml (eppendorf). A continuació es centrifuga durant 15 segons en una microcentrifuga i es descarta el sobrenadant. A continuació es resuspen el pellet suaument amb 400 µl de *tampó A* fred (4°C). Es deixen les cèl·lules 15 minuts en gel i després s'afegeixen 25 ml de NP-40 (0.5%) i s'agita el tub durant 10 segons. Es centrifuga l'homogenat durant 30 segons i es guarda el sobrenadant a -80°C (el sobrenadant conté la proteïna citoplasmàtica). A continuació es resuspèn el pellet (que conté la fracció nuclear) amb 50 ml de *tampó C* fred i s'agita el tub bruscament durant 15 minuts en un agitador orbital. Seguidament es centrifuga a 11000 g durant 5 minuts (microcentrifuga). El sobrenadant que conté les proteïnes de l'extracte nuclear es recupera amb molt de compte en un tub nou i es congela l'extracte nuclear a -80°C fins a posterior utilització.

### 3.4.1.3 Valoració de proteïna

#### 3.4.1.3.1 Bradford

Les proteïnes es valoren per l'assaig comercial basat en el mètode de Bradford (BIORAD). Es construeix una recta patró amb BSA amb un rang de concentracions de 25 µg/ml a 1.563 µg/ml per duplicat (volum de cada dilució 1600 µl). Les dilucions de la recta patró es preparen amb el *tampó* de lisi utilitzat per l'extracció de proteïnes a la mateixa dilució que es diluiran les mostres. Es realitzen dues dilucions de les mostres amb aigua. S'incuben tant els punts de la recta patró com les mostres amb 200 µl del colorant Bradford. Es llegeixen les concentracions a l'espectre a una longitud d'ona de 595 nm.

### 3.4.1.3.1 MicroBCA

#### Material

- Albúmina sèrica bovina (BSA) (*Sigma*)
- MicroBCA Protein Assay Reagent kit (*Pierce*)

El procediment es desenvolupa en microplaca (rang de treball lineal de 2-40 µg/ml). Cal preparar una corva estàndard amb BSA (0.5 – 200 µg/ml) i seguir les instruccions del kit a l'hora de pipetejar els estàndards, les mostres i els reactius. Es llegeix l'absorbància a l'espectre a una longitud d'ona de 562 nm.

### 3.4.1.4 Western blott

#### 3.4.1.4.1 PPAR $\alpha$

#### Reactius

- Solució de poliacrilamida (30% acrilamida: 0.85% bisacrilamida) (BioRad)
- Upper buffer pH 6.8, 0.5 M Tris base
- Lower buffer pH 8.8, 1.5 M Tris base
- TEMED (BioRad)
- Persulfat d'amoni 10% (PSA, Biorad)
- SDS 10%
- ECL (Amersham)
- Tampó de càrrega 6x: 2% SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% blau de bromofenol
- Tampó d'electroforesi 1x: 25 mM Tris-HCl, pH 6.8; 192 mM glicina, 0.1% SDS (es prepara una solució stock 10x)
- Tampó de transferència 1x: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM glicina (es prepara una solució stock 10x). Just en el moment de la transferència s'afageix el metanol (200 ml metanol, 700 ml d'aigua, 100 ml tampó de transferència 1x)
- Marcadors de pes molecular pre-tenyits (*Kaleidoscope* i *Broad Range*, BioRad)
- Anticossos PPAR $\alpha$  (Alexis, San Diego) i  $\alpha$ -SMA (Sigma, St Louis, MO)
- Tampó TBS 1x (*Tris-buffered saline*): 20 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.5 M NaCl (Es prepara un stock 10x)
- Tampó T-TBS 1x (*Tween Tris-buffered saline*): 0.25-0.5% tween; 20 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.5 M NaCl
- Tampó de bloqueig: 5% llet en pols desnatada i 0.5% Tween 20.
- Tampó de rentat: 0.1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl

- Solució de blau de Coomassie (Bio-Safe G250 BioRad)
- Solució de Ponceau S (Sigma)

Per la determinació de la proteïna del PPAR $\alpha$  es barregen 10  $\mu$ g de proteïna, procedent d'hepatòcits, amb el tampó de càrrega. S'escalfen les mostres a 100°C durant 10 minuts i es posen en gel a 4°C abans de carregar. Cal haver preparat anteriorment un gel de poliacrilamida desnaturalitzant al 10%.

<b>Gel separador (10%)</b>	
Acrilamida	2.5 ml
Lower buffer	2.5 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
Aigua destilada	4.8 ml
10% PSA	60 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

<b>Gel concentrador</b>	
Acrilamida	0.9 ml
Lower buffer	1.2 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
Aigua destilada	7.22 ml
10% PSA	570 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

Un cop polimeritzat el gel es carreguen les mostres i es fa córrer en l'aparell Mini PROTEAN III (Bio-Rad) entre 100-120 V fins que el blau del front surt i la proteïna d'interès ens queda més o menys a la meitat del gel.

Tot seguit es prepara la transferència. Es talla una membrana de PVDF de 6 x 8 cm i dos papers Whatman de 7 x 9 cm. S'activa la membrana amb metanol durant 2 minuts i es renta seguidament amb aigua. Tant la membrana com els papers Whatman s'hidraten en el tampó de transferència (**Figura 28**).

Seguidament es procedeix a muntar la transferència. Es col·loquen les capes en el sandwich segons el següent ordre:

1. Ànode (costat negre del casset)
2. Espongeta
3. Paper Whatman
4. Gel de poliacrilamida (hidratar-lo abans amb el tampó de transferència)
5. Membrana de PVDF
6. Paper Whatman

7. Espongeta
8. Càtode (costat blanc del casset)

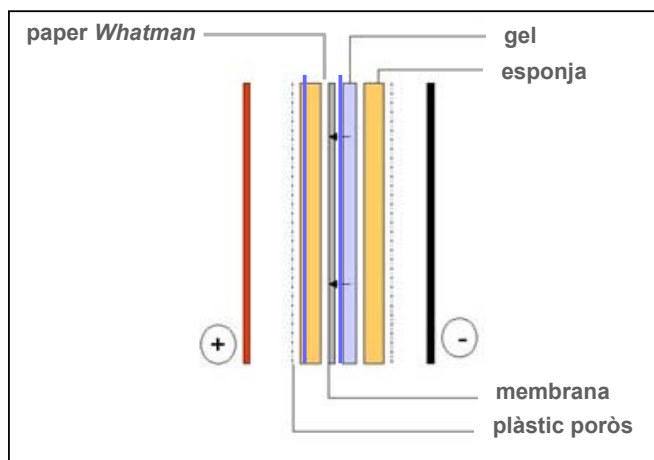


Figura 28. Esquema de l'ordre de preparació de la transferència.

Un cop s'ha muntat el *sandwich* es col·loca en la cubeta de transferència amb el tampó de transferència i un bloc de gel. Es transfereix el gel durant 18 hores a 4°C. Es para la transferència i es tenyeix el gel amb blau de Coomassie comercial (BioRad, no cal destenyir-lo). La membrana es tenyeix amb Ponceau S per tal d'observar l'eficiència de la transferència. Sense destenyir, es bloqueja la membrana amb el tampó de bloqueig durant una hora a temperatura ambient i seguidament es procedeix a incubar amb l'anticòs primari. L'anticòs del PPAR $\alpha$  és un anti-sèrum anti-murí i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient, en agitació i a una dilució 1/500 en 0.25% de TTBS i 0.1% de llet en pols. Després de l'incubació amb l'anticòs primari es renta la membrana tres vegades durant 5 minuts amb el tampó de rentat a temperatura ambient i en agitació. Seguidament s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient, en agitació, a una dilució de 1/2000 en 0.25% de TTBS i 0.1% de llet en pols. L'anticòs secundari pel PPAR $\alpha$  és un *horseradish* unit a peroxidasa específic de conill i produït en sumera. Després de l'incubació amb l'anticòs secundari es renta 5 vegades durant 5 minuts amb el tampó de rentat a temperatura ambient en agitació. Finalment s'incuba la membrana amb ECL durant 30 segons i es revela el film.

#### 3.4.1.4.2 $\alpha$ -SMA

##### Material

Veure el material utilitzat en l'apartat 3.4.1.4.1.

Per la determinació de l'expressió de la proteïna del  $\alpha$ -SMA es barregen 50  $\mu$ g de proteïna amb el tampó de càrrega per la determinació dels nivells de proteïna de  $\alpha$ -SMA. S'escalfen les mostres a 100°C durant 10 minuts i es posen en gel. Es prepara un gel de poliàcrilamida desnaturalitzant al 12%.

<b>Gel separador (12%)</b>	
Acrilamida	3 ml
Lower buffer	2.5 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
Aigua destilada	4.8 ml
10% PSA	60 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

<b>Gel concentrador</b>	
Acrilamida	0.9 ml
Lower buffer	1.2 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
Aigua destilada	7.22 ml
10% PSA	570 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

A continuació es procedeix igual que a l'apartat 3.4.1.4.1 amb les següents modificacions:

1) L'anticòs primari per la  $\alpha$ -SMA és un anticòs monoclonal de ratolí i s'incuba durant 2 hores a una dilució 1/5000 en 0.5% de TTBS i 0.1% de llet en pols.

2) L'anticòs secundari per la  $\alpha$ -SMA és un *horseradish* unit a peroxidasa específic de ratolí i produït en cabra i s'incuba durant 2 hores a una dilució 1/10000 en 0.5% de TTBS i 0.1% de llet en pols.

### 3.4.2 ACTIVITAT PROTEICA: ZIMOGRÀFIA

#### Reactius

- Tampó d'homogeneïtzació: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) que conté un 0.15 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin i 10  $\mu$ g/ml pepstatin
- Tampó de rentat: 2.5% Triton X-100
- Tampó d'incubació: 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.02%  $\text{NaN}_3$  i 2  $\mu$ M ZnCl
- Tampó d'equilibrat: 3% glicerol, 10% acid acètic i 40% metanol



S'homogeneïtzen al politró les mostres de fetge amb tampó d'homogeneització a 4°C. Es centrifuguen els homogenats a 10000 g durant 20 minuts a 4°C i es recullen els sobrenadants. A continuació es determina el contingut de proteïna pel mètode de Bradford (Veure apartat 4.1.3.1). Es carreguen 50 µg de proteïna per mostra i es fa córrer un gel al 7% SDS-PAGE amb un 0.13% de gelatina. Després de l'electroforesi, es renten els gels dues vegades durant 15 minuts en tampó de rentat amb l'objectiu d'eliminar l'SDS que conté el gel i s'incuba a 37°C durant 22 hores el tampó d'incubació. Es tenyeixen els gels amb Blau de Coomassie i es destenyeixen amb tampó d'equilibrat. Al destenyir apareixen les bandes degradades de la gelatina corresponents a l'activitat de les diferents metaloproteases. S'escanegen les bandes de 62, 72 i 92 kDa, corresponents als diferents pesos moleculars de les formes activades i latents de les MMPs. Es quantifiquen les activitats segons la degradació de les bandes en el gel utilitzant un programa d'anàlisi d'imatge (Phoretix software).

### **3.5 DETERMINACIÓ D'EICOSANOIDS**

#### **3.5.1 HPLC**

##### **3.5.1.1 Sep-Pak d'extractes cel·lulars**

###### Material

- PGB<sub>2</sub> (*Cayman Chemical*)
- Rotovapor (*Büchi*)
- Columnes de sílica C<sub>18</sub> (*Waters*)
- Sep-pak (*Waters*)

S'afegeix PGB<sub>2</sub> a les mostres procedents de lisats cel·lulars la qual actuarà com a estàndard. Es centrifuguen les mostres a 400 g a 4°C durant 15 minuts i es rotoevapora el sobrenadant. A continuació es resuspèn el pellet en metanol-aigua (1:45 vol/vol) vortexant en un flascó rodó de vidre. S'acidifica la mostra a pH 3.5 i es passen les mostres per les columnes de sílica C<sub>18</sub> del Sep-Pak. S'elueixen els materials de la columna primer amb hexà seguit de metilformiat i per acabar amb metanol. Els eicosnoids del nostre interès elueixen a la fase de metilformiat que serà la fase que recollirem. A continuació es concentra el metilformiat a sota corrent de N<sub>2</sub> i es resuspèn amb MeOH per tal de que no s'oxidi la mostra. Finalment es congelen les mostres per la posterior anàlisi per HPLC.

### 3.5.1.2 Determinació de derivats de la 5-LO per HPLC

#### Material

- Sistema d'HPLC en fase reversa (*Waters*)
- Sistema de control integrat (model 600E) equipat amb *996 Photodiode Array Detector* i anàlisis de software HPLC Millennium (*Waters*)
- Columna d'HPLC Tracer Supelcosil (5 µm, 4.5×250 mm) (*Sigma*)

Cal purgar l'aparell d'HPLC abans de començar a punxar les mostres. Cal purgar-lo amb les dues fases que s'utilitzaran durant la carrera de les mostres. Una vegada l'aparell està purgat i ha assolit la pressió necessària es punxen les mostres al HPLC. L'elució de les mostres es dona amb un gradient de metanol / H<sub>2</sub>O / àcid acètic (65:35:0.01; v/v/v, pH 3.5) com a fase 1 ( $t_0$  -20 min) i un gradient lineal amb metanol / àcid acètic (99.9:0.1, v/v) com a fase 2 (20-45 min) a un flux de 1.0 ml/min. Es determina la concentració del metabòlit d'interès comparant-lo amb l'estàndard (PGB<sub>2</sub>).

### 3.5.2 EIAs

Les determinacions es van fer amb els kits comercials d'EIA seguint les instruccions del fabricant:

- PGE<sub>2</sub> i LTB<sub>4</sub>: *Cayman Chemical*
- 15-epi-LXA<sub>4</sub>: *Neogen*
- CINC-1: *Assay Designs*

Per la 15d-PGJ<sub>2</sub> es fa una extracció prèvia del teixit hepàtic per Sep-Pak.

#### Material

- Columnas de sílica C<sub>18</sub> de fase reversa (*Waters*)
- Kit comercial d'EIA de 15d-PGJ<sub>2</sub> (*Assay Designs*)
- Etilacetat

S'homogenitza el teixit hepàtic amb tampó fosfat 0.1 M i s'acidifica la mostra a pH 3.5. Es transfereix seguidament a la columna de sílica C<sub>18</sub> de fase reversa i s'elueixen els materials amb metilacetat. Es concentra la mostra a sota corrent de N<sub>2</sub> i es determinen els nivells de 15d-PGJ<sub>2</sub> amb el kit d'EIA comercial.

### **3.6 ESTUDIS *IN VITRO***

#### **3.6.1 ASSAIG DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR**

##### Material

- MTT (Sigma)
- RPMI sense roig de fenol

Es plaquegen les cèl·lules (KCs i HSCs) en plaques de 24 pous amb 1 ml de medi. Es cultiven les cèl·lules amb els fàrmacs durant els temps desitjats. Seguidament s'afegeixen 100 µl de MTT (5 mg/ml en RPMI 1640/Iscove's sense roig de fenol) a cada pou i s'incuba durant 3-4 hores. Es para la reacció amb 1 ml d'isoamil alcohol. Es pipeteja amunt i avall 2 o 3 vegades per tal de desenganxar els cristalls que es puguin formar al fons del pou. S'agita la placa a alta velocitat durant 20 minuts per tal de dissoldre els cristalls i es llegeix en un lector de plaques d'ELISA a una longitud d'ona de 570 nm el més aviat possible després de l'agitació.

#### **3.6.2 ASSAIGS D'APOPTOSI**

##### **3.6.2.1 Tinció amb iodur de propidi**

##### Material

- Microscopi de fluorescència (*Nikon Eclipse E600*)
- Iodur de propidi (*Sigma*)
- RNase (*Gibco*)

Es renten les cèl·lules dues vegades amb DPBS després de les incubacions respectives i es fixen amb formaldehid al 3% durant 10 minuts a temperatura ambient. A continuació es permeabilitzen amb metanol al 100% fred durant 20 minuts. Tot seguit es renten les cèl·lules tres vegades i es tenyeixen durant 10 minuts amb iodur de propidi (50 µg/ml) dissolt en una solució de DPBS que conté 200 µg/ml RNase A. Es munten les preparacions posant el cubre-objectes amb una gota de moviol. S'analitza la morfologia nuclear de les cèl·lules per microscopia de fluorescència.

##### **3.6.2.2 Tinció amb Diff-Quik**

Es confirma l'apoptosi en cèl·lules de Kupffer i CRL-2192 per microscopia òptica en preparacions de *citospin* tenyides amb Diff-Quik® (*Dade Behring*) (el protocol es va realitzar seguint les instruccions del fabricant).

### 3.6.3 ASSAIG DE TRANSACTIVACIÓ

#### Material

- Plàsmid PPAR $\gamma$ -GAL4 (cedit pel Dr. R. Evans, *Salk Institute, La Jolla, USA*)
- Constructe luciferasa reporter (cedit pel Dr. R. Evans, *Salk Institute, La Jolla, USA*)
- Vector d'expressió  $\beta$ -gal pCMV
- *Effectene*<sup>®</sup> *transfection reagent*
- cèl·lules COS 7
- DMEM
- Lumat LB 9507 luminometer (*Berthold*)

Es plaquegen les cèl·lules COS7 ( $1.5 \times 10^4$  cèl·lules/pou) en plaques de 12 pous i es co-transfecten amb 1 ml de DMEM que conté 0.3  $\mu$ g de constructe luciferasa reporter MH100-tk-luc, 0.1  $\mu$ g de PPAR $\gamma$ -GAL4 i 0.002  $\mu$ g del vector d'expressió  $\beta$ -gal pCMV (el plàsmid de control intern que conté el promotor del citomegalovirus) utilitzant el reactiu de transfecció *Effectene*<sup>®</sup>. Al cap de trenta hores després de la transfecció s'elimina el medi i es renten les cèl·lules dues vegades amb DPBS amb  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  abans d'afegir els compostos a estudiar. Es cultiven les cèl·lules durant 18 hores amb 1 ml de DMEM sense sèrum amb vehicle (0.5% etanol), 3  $\mu$ l d'extractes lipídics dissolts en DMSO, concentracions creixents de 15d-PGJ<sub>2</sub> (1, 3 i 10  $\mu$ M) i SC-236 (3 i 10  $\mu$ M) sol o en combinació amb 15d-PGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M). Finalment es mesura l'activitat de la luciferasa i  $\beta$ -gal en el luminòmetre.

#### 3.6.3.1 Extracció lipídica: mètode de *Bligh and Dyer*

S'homogenitzen les mostres hepàtiques (0.2-0.5 g) en 1 ml Tris/HCl (30 mM pH 7.4) i s'afegeix a continuació 3.75 ml cloroform/metanol (1:2, v/v). Es barreja durant 10 minuts i s'afegeix 1.25 ml cloroform i es barreja durant 1 minut. S'afegeix 1.25 ml d'aigua i es barreja durant un altre minut. Es deixen reposar les mostres durant 30 minuts a temperatura ambient i després es recull la fase orgànica inferior. S'afegeixen 1.88 ml de cloroform a la fase aquosa residual i es barreja de nou, es centrifuga a 800 g durant 5 minuts a temperatura ambient i es recull la fase inferior de nou i s'ajunta amb la primera fase orgànica es concentra a sota corrent de N<sub>2</sub>. A continuació es dissol l'extracte lipídic en metanol/aigua (1:45, v/v) i es transfereix el contingut a una xeringa i s'acidifica a pH 3.5 i es carrega en una columna de sílica C<sub>18</sub> de fase reversa. Tot seguit s'elueixen els materials de la columna amb hexà i es concentren a sota corrent de

N<sub>2</sub>. El concentrat lipídic es resuspèn en DMSO i s'analitza en l'assaig de transactivació del PPAR<sub>γ</sub>.

### **3.7 ESTUDIS IN VIVO**

#### **3.7.1 ANIMALS I DISSENY EXPERIMENTAL**

L'estudi comprèn l'administració de dos tipus de règims diferents els quals es defineixen en els següents dos estudis:

##### **ESTUDI A**

L'estudi es va realitzar en 60 rates mascle *Wistar* que es van sotmetre a un protocol d'inducció a la fibrosi mitjançant la inhalació de tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>) i en 30 rates control (animals no tractats amb el programa d'inducció a fibrosi per CCl<sub>4</sub>).

Els animals tractats amb CCl<sub>4</sub> i els control es van dividir aleatòriament en dos grups que rebien:

- L'inhibidor selectiu de COX-2, SC-236 (6 mg/kg p.c. per setmana) (n=30 grup CCl<sub>4</sub>, n=15 grup control)
- Placebo (0.5% carboximetilcel·lulosa) (n=30 grup CCl<sub>4</sub>, n=15 grup control)

Les rates es van sacrificar a les 6, 8 i 10 setmanes després d'iniciar-se l'administració de l'hepatotòxic .

##### **ESTUDI B**

L'estudi es va realitzar en 16 rates mascle *Wistar* que es van sotmetre a un protocol d'inducció a la fibrosi igual que en el protocol A amb l'única diferència que s'administrava l'SC-236 (6 mg/kg p.c.) tres cops per setmana (n=10 grup CCl<sub>4</sub>, n=6 grup placebo).

En els dos règims els animals es van sacrificar sota anestèsia amb ketamina a les 6, 8 i 10 setmanes de l'inducció del programa de fibrosi.

#### **3.7.2 HISTOLOGIA**

Totes les mesures histològiques de teixit hepàtic es van portar a terme en el departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona a sota la direcció de la Dra. Rosa Miquel. Es va procedir a les tincions histològiques d'hematoxilina-eosina i tricròmic de Masson amb la posterior valoració i quantificació dels nivells de fibrosis.